

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Einsatz neuer Allergene und Testverfahren im Basophilenaktivierungstest bei
Patienten mit Insektengiftallergien**

Sebastian Waldherr

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Bernadette Eberlein

2. apl. Prof. Dr. Knut Brockow

Die Dissertation wurde am 27.01.2023 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.08.2023 angenommen.

Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit:

Vortrag auf einem Kongress:

Waldherr S, Grosch J, Hilger C, Bilò B, Kler S, Pascal M, Lesur A, Dittmar G, Biedermann T, Darsow U, Brockow K, Ollert M, Schmidt-Weber C, Blank S, Eberlein B

Assessment of homologous phospholipases (Polistes and bee venom PLA2) and hyaluronidases (Pol d 2, Api m 2, Ves v 2b) in patients with bee and yellow jacket venom allergy by basophil activation testing

Posterpräsentation auf dem FAAM EuroBAT Digital 2020, 16. Oktober 2020, Manchester

Publikation

Grosch J, Eberlein B, Waldherr S, Pascal M, San Bartolome C, De La Roca Pinzon F, Dittmar M, Hilger C, Ollert M, Biedermann T, Darsow U, Bilò B, Schmidt-Weber C, Blank S. **Characterization of new allergens from the venom of the European paper wasp *Polistes dominula***. *Toxins (Basel)*. 2021;13(8):559

In der vorliegenden Arbeit wird zum besseren Lesefluss das generische Maskulinum verwendet.
Die genannte Form bezieht sich gleichermaßen auf alle Geschlechtsidentitäten.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Inhaltsverzeichnis..... | IV |
| Abkürzungsverzeichnis..... | VIII |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Hymenoptereingiftallergien..... | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie..... | 1 |
| 1.1.2 Ordnung der Hymenoptera..... | 1 |
| 1.1.3 Zusammensetzung von Hymenoptereingiften..... | 3 |
| 1.1.4 Pathogenese..... | 7 |
| 1.1.5 Klinik der Stichreaktion und Anaphylaxie..... | 9 |
| 1.2 Allergiediagnostik..... | 11 |
| 1.2.1 Überblick..... | 11 |
| 1.2.2 Anamnese..... | 11 |
| 1.2.3 Hauttests..... | 11 |
| 1.2.4 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper..... | 12 |
| 1.2.5 Zelluläre In-vitro-Tests..... | 15 |
| 1.3 Basophilenaktivierungstest..... | 16 |
| 1.4 Therapie der Hymenoptereingiftallergie..... | 17 |
| 1.4.1 Prophylaxe und Behandlung akuter Reaktionen..... | 17 |
| 1.4.2 Spezifische Immuntherapie..... | 19 |
| 1.5 Problemstellungen und Zielsetzungen der Studie..... | 21 |
| 1.5.1 Erprobung neuer Allergene in der Diagnostik von Allergien gegen <i>Polistes dominula</i> | 21 |
| 1.5.2 Neue Testverfahren im Basophilenaktivierungstest..... | 21 |
| 2 Material und Methoden..... | 23 |
| 2.1 Probanden und Kontrollen..... | 23 |

-Inhaltsverzeichnis-

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2 | Routinediagnostik | 24 |
| 2.2.1 | Anamnese | 24 |
| 2.2.2 | Intrakutantest | 24 |
| 2.2.3 | Spezifische IgE-Antikörper | 25 |
| 2.3 | Basophilenaktivierungstest Flow CAST® | 26 |
| 2.3.1 | Reagenzien, Materialien und Geräte | 26 |
| 2.3.2 | Allergene | 29 |
| 2.3.3 | Versuchsschema zur Erprobung homologer Allergene | 30 |
| 2.3.4 | Durchführung | 30 |
| 2.3.5 | Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung | 33 |
| 2.3.6 | Prinzip der Analyse | 35 |
| 2.4 | Basophilenaktivierungstest Dura Clone IF Basophil Activation® | 38 |
| 2.4.1 | Reagenzien, Materialien und Geräte | 38 |
| 2.4.2 | Allergene | 39 |
| 2.4.3 | Versuchsschema zum Vergleich der Tests der Firmen Bühlmann und Beckman Coulter | 40 |
| 2.4.4 | Durchführung | 41 |
| 2.4.5 | Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung | 44 |
| 2.4.6 | Prinzip der Analyse | 44 |
| 2.5 | Statistik und Auswertung der Daten | 47 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | Erprobung homologer Allergene im Flow CAST® | 49 |
| 3.1.1 | Probandenkollektiv | 49 |
| 3.1.2 | Klinische Charakterisierung der Probanden | 49 |
| 3.1.3 | Auswertung des Flow CAST® | 51 |
| 3.1.4 | Phospholipasen Api m 1 und PDV PLA2 | 52 |
| 3.1.4.1 | Charakterisierung der Studienpopulation | 52 |

-Inhaltsverzeichnis-

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.4.2 | Phospholipase Api m 1 (von <i>Apis mellifera</i>) | 53 |
| 3.1.4.3 | Phospholipase PDV PLA2 (von <i>Polistes dominula</i>)..... | 55 |
| 3.1.5 | Hyaluronidasen Api m 2, Ves v 2b und Pol d 2 | 56 |
| 3.1.5.1 | Charakterisierung der Studienpopulation | 56 |
| 3.1.5.2 | Hyaluronidase Api m 2 (von <i>Apis mellifera</i>)..... | 56 |
| 3.1.5.3 | Hyaluronidase Ves v 2b (von <i>Vespula spp.</i>) | 58 |
| 3.1.5.4 | Hyaluronidase Pol d 2 (von <i>Polistes dominula</i>)..... | 59 |
| 3.1.6 | Aktivierung durch rApi m 1 im Vergleich zum Gesamtextrakt des Bienengifts | 61 |
| 3.2 | Vergleich von Testverfahren für den Basophilenaktivierungstest | 64 |
| 3.2.1 | Probandenkollektiv..... | 64 |
| 3.2.2 | Klinische Charakterisierung | 64 |
| 3.2.3 | Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation® | 66 |
| 3.2.4 | Patienten mit hohen Werten in der Negativkontrolle | 66 |
| 3.2.5 | Ergebnisse beider Tests | 68 |
| 3.2.6 | Vergleich der Durchführungszeiten..... | 76 |
| 3.2.7 | Kostenvergleich | 78 |
| 4 | Diskussion | 79 |
| 4.1 | Erprobung homologer Allergene im Flow CAST® | 79 |
| 4.1.1 | Herausforderung der Unterscheidung von Allergien gegen <i>Vespula spp.</i> und <i>Polistes spp.</i> | 79 |
| 4.1.2 | Phospholipasen Api m 1 und PDV PLA2 | 80 |
| 4.1.3 | Hyaluronidasen Api m 2, Pol d 2 und Ves v 2 | 84 |
| 4.1.4 | Klinische Relevanz und Ausblick | 87 |
| 4.1.5 | Vergleich der Aktivierung durch Api m 1 und HBV..... | 89 |
| 4.2 | Vergleich von Testverfahren für den Basophilenaktivierungstest | 92 |
| 4.2.1 | Übersicht über erhältliche Basophilenaktivierungstests..... | 92 |
| 4.2.2 | Etablierung des Dura Clone IF Basophil Activation® | 94 |

-Inhaltsverzeichnis-

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.3 | Gating des Dura Clone IF Basophil Activation® | 98 |
| 4.2.4 | Quantitativer und qualitativer Vergleich der beiden Tests | 100 |
| 4.2.5 | Praktikabilität in der Routinediagnostik | 104 |
| 4.2.6 | Klinische Relevanz und Ausblick | 105 |
| 5 | Zusammenfassung | 107 |
| 6 | Summary | 108 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | 109 |
| 8 | Tabellenverzeichnis | 113 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 115 |
| 10 | Anhang | 130 |
| 11 | Lebenslauf | 146 |
| 12 | Danksagung | 147 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| AUC | area under the dose-response curve (Fläche unter der Kurve) |
| Abb. | Abbildung |
| BAT | Basophilenaktivierungstest |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CCD | Cross-reactive carbohydrate determinant |
| CRD | Component-resolved diagnostics |
| DS | Doppelsensibilisierung / doppelsensibilisiert |
| DW | Dry weight (Trockengewicht) |
| FACS | Fluorescence-Activated-Cell-Sorter |
| FcεRI | FcεRI-Rezeptor |
| fMLP | N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin |
| GI | Gastrointestinal |
| HBV | Honey Bee Venom |
| HRP | horseradish peroxidase (Merretichperoxidase) |
| IRP30 | Immune Responsive Protein 30 |
| LOA | Limits of Agreement (Übereinstimmungsgrenzen) |
| MNC | Mononukleäre Zellen |
| MUXF3 CCD | Kohlenhydrat-Determinante aus Bromelin |
| PAF | Plättchenaktivierender Faktor |
| PDV | <i>Polistes dominula</i> Venom |
| PLA1 | Phospholipase A1 |
| PLA2 | Phospholipase A2 |
| %P | Prozentpunkte |

-Abkürzungsverzeichnis-

| | |
|----------|--|
| RAST | Radio-Allergo-Sorbent-Test |
| SD | Standardabweichung |
| SDC | Smallest Detectable Change |
| Sf9 | Spodoptera frugiperda |
| sIgE | Spezifisches Immunglobulin der Klasse E |
| SIT | Spezifische Immuntherapie |
| sog. | sogenannt |
| spp. | species (Plural) |
| vgl. | vergleiche |
| YJV | Yellow Jacket Venom |
| YJV-only | Studienpopulation aus Wespengiftallergikern und Bienengiftallergikern ohne Sensibilisierung auf Api m 1 |
| VEGFC | Vascular Endothelial Growth Factor C |
| z.B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Hymenopterengiftallergien

1.1.1 Epidemiologie

Hymenopterengiftallergien sind in Deutschland und ganz Europa weit verbreitet. Neben Arznei- und Nahrungsmittelallergien gehören sie zu den häufigsten Auslösern einer Allergie vom Soforttyp (Typ I) (138). Während etwa ein Viertel der Bevölkerung bereits gesteigerte Lokalreaktionen als Folge von Insektenstichen präsentiert, kommt es bei bis zu 3,5 % sogar zu systemischen Reaktionen (120).

Die schwerste Manifestation einer IgE-abhängigen allergischen Soforttypreaktion ist die Anaphylaxie, die letal verlaufen kann. So versterben in Europa jährlich etwa 200 Menschen aufgrund einer von Insektenstichen ausgelösten Anaphylaxie (86). Auf Deutschland entfallen hiervon etwa 20 Fälle pro Jahr (120). Da die Symptome der Anaphylaxie jedoch häufig nicht als solche erkannt werden, ist davon auszugehen, dass die Dunkelziffer deutlich höher liegt (94).

Je nach Wohnort geben weltweit zwischen 54–94 % befragter Erwachsener an, dass sie in ihrem Leben mindestens einmal von einem Insekt gestochen wurden (1). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bei bis zu 25 % der erwachsenen Bevölkerung positive Hauttests und eine Sensibilisierung gegenüber Insektengift (Nachweis von spezifischem Immunglobulin der Klasse E, sIgE) vorliegen (16, 94, 120).

Vor diesem Hintergrund ist zu beachten, dass das Risiko einer systemischen Reaktion als Folge auf einen Insektenstich unter anderem vom Alter, dem stechenden Insekt und dem Vorliegen atopischer Krankheiten abhängt (138). Daneben konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass auch Mastozytosen beziehungsweise (bzw.) erhöhte Serumtryptasespiegel relevante Risikofaktoren darstellen (120).

1.1.2 Ordnung der Hymenoptera

Die für die Insektengiftallergien verantwortlichen Insekten entstammen fast ausschließlich der Ordnung der Hymenopteren (Hautflügler). Ein Teil ihres Stammbaums ist in Abbildung (Abb.) 1 zu sehen. Hymenopteren unterteilen sich in die Familien Apidae, Vespidae, Scoliidae und Formicidae (in Abb. 1 nicht dargestellt) (10).

-Einleitung-

Während zu den Apidae die als (Honig-)Biene bekannte *Apis mellifera* und die Bombinae (Hummeln) gezählt werden, besteht die Familie der Vespidae (Faltenwespen) aus den Vespinae (Papierwespen) und den Polistinae (Feldwespen). Zu ersteren gehören die *Vespula species* (spp.) – allen voran die im Folgenden als Wespen bezeichneten *Vespula vulgaris* (Kurzkopfwespe) und *Vespula germanica* – sowie die *Dolichovespulae* (Langkopfwespen) und *Vespa* (Hornissen) (10).

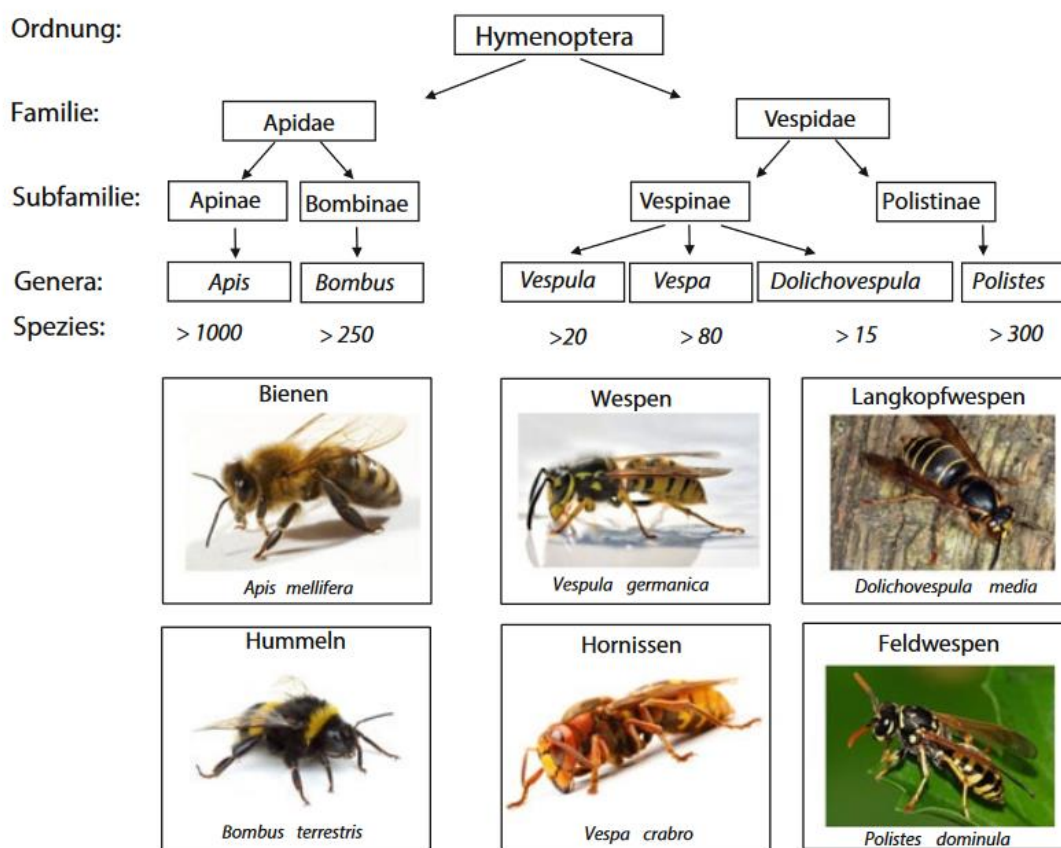


Abbildung 1: Häufigste Auslöser der Insektengiftallergie innerhalb der Hymenoptera (62)

Während in Australien und den USA vor allem die Feuerameise (*Solenopsis invicta*) aus der Familie der Formicidae den relevanten Auslöser von Hymenoptereingiftallergien darstellt, spielen in Europa vorrangig die Honigbiene (*Apis mellifera*) und Wespen (*Vespulae spp.*) eine tragende Rolle. Gerade letztere bilden für den Menschen eine besondere Gefahrenquelle, da sie von Speisen und Müll stark angelockt werden (86).

Eine größer werdende Rolle in Europa wird auch der als (Haus-)Feldwespe bekannten *Polistes dominula* zuteil. Die ursprünglich aus wärmeren Regionen im Süden Europas und Norden Afrikas stammende Spezies breitet sich aufgrund des Klimawandels in nördlichere Lebensräume aus und kommt damit zunehmend in denselben Territorien vor wie *Vespula spp.* (32, 58, 127).

1.1.3 Zusammensetzung von Hymenopterengiften

Einer allergischen Reaktion auf Hymenopterengift geht in der Regel ein Insektenstich voraus. Lediglich weibliche Hymenopteren können stechen. Anders als Wespen verlieren Bienen bei einem Stich ihren Giftapparat, welcher dann in der Haut steckend bis zu einer Minute lang Gift abgibt. Damit lässt sich auch die mit etwa 140 µg deutlich größere Giftmenge eines Bienenstichs erklären. Wespen verlieren den Stachel meist nicht und können mehrfach stechen. Sie geben bei einem Stich nur etwa 3 µg Gift ab. Bei Feldwespen (*Polistes*) liegt die Giftmenge bei 4,2–17 µg (59, 96).

Hymenopterengifte bestehen aus niedermolekularen Substanzen wie biogenen Aminen, kleinen Peptiden und vielen Proteinen, die potenziell allergen wirken (15). Zu den biogenen Aminen zählen unter anderem Histamine, die für eine juckende Schwellung an der Einstichstelle verantwortlich sind. Außerdem wirken sie vasodilatatorisch und erhöhen die Gefäßpermeabilität, sodass sie zusammen mit einigen Enzymen zur besseren Ausbreitung des Hymenopterengifts beitragen (86).

Allergische Reaktionen werden meist von allergenen Proteinen, teils Peptiden, ausgelöst und ihnen liegt das Vorhandensein von spezifischem IgE-Antikörpern zugrunde (86). Je nach Häufigkeit des Vorkommens von sIgE-Antikörpern gegen ein Allergen wird von Major- und Minorallergenen gesprochen. Per definitionem handelt es sich um ein Majorallergen, wenn es bei mindestens 50 % der betroffenen Allergiker eine IgE-Sensibilisierung auslöst. Anzumerken ist jedoch, dass eine sIgE-Sensibilisierung allein noch keinen Rückschluss auf die klinische Relevanz zulässt (14, 16).

In den letzten Jahrzehnten wurde zunehmend an der molekularen Zusammensetzung von Hymenopterengiften geforscht und eine Vielzahl von Allergenen beschrieben. Dies hat als sogenannte (sog.) „component-resolved diagnostics“ (CRD) Einzug in die Routinediagnostik gefunden. Hierbei wird das Wissen über die unterschiedlichen Allergene der Hymenopteren-Spezies genutzt (15, 63, 88). In den Tabellen 1-3 ist eine Auflistung der bisher bekannten Allergene von *Apis mellifera* (Honey Bee Venom; HBV), *Vespula spp.* (Yellow Jacket Venom; YJV) und *Polistes dominula* (*Polistes dominula* Venom; PDV) abgebildet.

***Apis mellifera* (Honeybee Venom, HBV)**

Mit bereits insgesamt zwölf identifizierten und beschriebenen Allergenen ist das HBV das bisher am besten charakterisierte Hymenopterengift (vergleiche (vgl.) Tabelle 1). Den größten Anteil am

-Einleitung-

Trockengewicht machen hierbei die beiden Allergene Api m 1 (Phospholipase A2) und Api m 4 (Melittin) mit 12 bzw. 50 % aus (86, 130).

Melittin ist ein Peptid bestehend aus 26 Aminosäuren, das aufgrund seiner Membrantoxizität zu Zytolyse, Mastzellzerstörung und Vasodilatation führt (14). Daneben ist es hauptverantwortlich für die Aktivierung des Schmerzempfindens (26). Api m 4 zählt mit einer Sensibilisierung von 17–54 % zu den Minorallergenen (10, 14).

Das Majorallergen Api m 1 wirkt als Phospholipase A2 vor allem zytotoxisch durch Zell- und Hämolyse und führt darüber hinaus zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Histaminen. Als Markerallergen (siehe Kapitel 1.2.4) ist es in der Diagnostik von HBV-Allergien von vorrangiger Bedeutung (14).

Daneben spielen unter anderem Api m 2 (Hyaluronidase), Api m 3 (Saure Phosphatase) und Api m 10 (Icarapin) als Majorallergene eine entscheidende Rolle (15, 71). Während Hyaluronidasen für eine bessere Verbreitung des Hymenopterengifts an der Einstichstelle sorgen, ist die Funktion von Sauren Phosphatasen und Icarapin in Hymenopterengiften noch nicht eindeutig geklärt (14).

Tabelle 1: Allergene von HBV (14, 15)

| Allergen | Name | % of DW | Sensibilisierung (%) | Verfügbar in CRD |
|---|------------------------|---------|----------------------|------------------|
| Honeybee (<i>Apis mellifera</i>) | | | | |
| Api m 1 | Phospholipase A2 | 12 | 57-97 | Ja |
| Api m 2 | Hyaluronidase | 2 | 28-60 | Ja |
| Api m 3 | Saure Phosphatase | 1-2 | 28-63 | Ja |
| Api m 4 | Melittin | 50 | 17-54 | Ja |
| Api m 5 | Dipeptidylpeptidase IV | < 1 | 16-70 | Ja |
| Api m 6 | Proteaseinhibitor | 1-2 | - | Nein |

-Einleitung-

| | | | | |
|----------------------|-----------------------------|-----|-------|------|
| Api m 7 | Protease | - | - | Nein |
| Api m 8 | Carboxylesterase | - | - | Nein |
| Api m 9 | Carboxypeptidase | - | - | Nein |
| Api m 10 | Icarapin | < 1 | 35-73 | Ja |
| Api m 11.0101 | Major Royal Jelly Protein 8 | - | - | Nein |
| Api m 11.0201 | Major Royal Jelly Protein 8 | - | - | Nein |
| Api m 12 | Vitellogenin | - | - | Ja |

HBV, Honey Bee Venom; DW, Dry weight/Trockengewicht; CRD, Component-resolved diagnostics

***Vespula vulgaris* (Yellow Jacket Venom, YJV)**

Bei den Allergenen des YJV spielen allen voran Ves v 1 (Phospholipase A1, PLA1), Ves v 2 (Hyaluronidase) und Ves v 5 (Antigen 5) eine wichtige Rolle, von denen Ves v 1 und Ves v 5 den größten Anteil am Trockengewicht stellen (68). Daneben sind noch die Allergene Ves v 3 (Dipeptidylpeptidase IV) und Ves v 6 (Vitellogenin) beschrieben (18, 19).

Ves v 1 erfüllt als Phospholipase innerhalb des YJV eine ähnliche Funktion wie Api m 1 und wirkt vorrangig zytotoxisch und proinflammatorisch (14, 68). Die Hyaluronidase Ves v 2 weist eine hohe Sequenzhomologie zu Api m 2 auf (15), ihr wird aber nur geringe klinische Relevanz zugesprochen (65). Kolarich et al. gelang es neben der bereits bekannten aktiven Form Ves v 2.0101 die inaktive Form Ves v 2.0201 zu identifizieren, die eine Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms aufweist. Es ist davon auszugehen, dass sie die vorherrschende Isoform darstellt (72).

Das von Blank et al. beschriebene Ves v 3 ist stark sequenzhomolog zur Dipeptidylpeptidase IV des HBV (Api m 5) (18), ebenso die Vitellogene Ves v 6 und Api m 12 (19).

Tabelle 2: Allergene von YJV (14, 15)

| Allergen | Name | % of DW | Sensibilisierung (%) | Verfügbar in CRD |
|--|----------------------------------|---------|----------------------|------------------|
| Yellow Jacket (<i>Vespula vulgaris</i>) | | | | |
| Ves v 1 | Phospholipase A1 | 6-14 | 39-66 | Ja |
| Ves v 2.0101 | Hyaluronidase | 1-3 | - | Nein |
| Ves v 2.0201 | Hyaluronidase (<i>inaktiv</i>) | - | - | Nein |
| Ves v 3 | Dipeptidylpeptidase IV | - | - | Nein |
| Ves v 5 | Antigen 5 | 5-10 | 82-98 | Ja |
| Ves v 6 | Vitellogenin | - | - | Nein |

YJV, Yellow Jacket Venom; DW, Dry weight/Trockengewicht; CRD, Component-resolved diagnostics

Europäische Feldwespe (*Polistes dominula* venom, PDV)

Die Zusammensetzung des PDV ist der des YJV recht ähnlich. Als wichtigste Allergene sind die drei Majorallergene Pol d 1 (Phospholipase A1), Pol d 3 (Dipeptidylpeptidase IV) und Pol d 5 (Antigen 5) zu nennen (15, 84, 122). Außerdem weist auch das PDV mit Pol d 2 eine Hyaluronidase auf (56). Die Protease Pol d 4 stellt bisherigen Studien zufolge aller Voraussicht nach ein Minorallergen dar (14).

Pol d 5 ist sequenzhomolog zum Antigen 5 der *Vespula vulgaris* (Ves v 5). Obwohl beide Majorallergene darstellen, ist die Funktion von Antigen 5 bis heute nicht abschließend geklärt (14, 121). Die Hyaluronidase Pol d 2 ist sequenzhomolog zu Ves v 2. Mögliche Kreuzreaktivität der beiden Allergene gegenüber Api m 2 ist noch Gegenstand aktueller Forschung (14).

Tabelle 3: Allergene von PDV (14, 15)

| Allergen | Name | % of DW | Sensibilisierung (%) | Verfügbar in CRD |
|---|------------------------|---------|----------------------|------------------|
| European paper wasp (<i>Polistes dominula</i>) | | | | |
| Pol d 1 | Phospholipase | - | 87 | Ja |
| Pol d 2 | Hyaluronidase | - | - | Nein |
| Pol d 3 | Dipeptidylpeptidase IV | - | - | Nein |
| Pol d 4 | Protease | - | - | Nein |
| Pol d 5 | Antigen 5 | - | 72 | Ja |

PDV, *Polistes dominula* Venom; DW, Dry weight/Trockengewicht; CRD, Component-resolved diagnostics

1.1.4 Pathogenese

Unter einer Allergie versteht man eine gestörte Immunreaktion des Organismus auf eine exogene Substanz, die eigentlich als harmlos erkannt werden sollte. Im Zuge dieser Reaktion kommt es zu pathologischen Symptomen, die das klinische Erscheinungsbild einer Allergie bzw. Anaphylaxie prägen (9, 102).

Zu unterscheiden ist dabei zwischen einer Sensibilisierung und einer allergischen Reaktion. Die Sensibilisierung geht der Allergie voraus und verläuft klinisch stumm. In der Regel kommt es erst bei erneutem Antigenkontakt zu einer Reaktion mit allergischer Symptomatik (102).

Im Zentrum des Pathomechanismus stehen dabei unter anderem Immunglobuline der Klasse E, Mastzellen und basophile Granulozyten mit sog. FcεRI-Rezeptoren (FcεRI). Im Zuge der Primärexposition mit dem exogenen Allergen kommt es unter Beteiligung antigenpräsentierender Zellen wie zum Beispiel (z.B.) dendritischer Zellen zu einer B-Zell-Aktivierung mit einem Immunglobulinwechsel zu IgE (Abbildung 2). Das Vorhandensein von sIgE ist von zentraler Bedeutung für das Auftreten einer Allergie vom Soforttyp. Die sIgE binden mit ihrem Fc-Teil an FcεRI auf Mastzellen und basophilen Granulozyten (9, 78).

-Einleitung-

Bei einer Sekundärexposition kommt es nun durch die Bindung des exogenen Allergens an die sIgE (Allergen-IgE-FcεRI-Komplex) zu einer Quervernetzung. Diese löst eine Signalkaskade aus, die aufgrund einer Calcium-Freisetzung zur Mastzell- und Basophilendegranulation führt. Hierbei werden Histamine, Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine, Heparin, plättchenaktivierender Faktor (PAF) und proteolytische Enzyme freigesetzt, die für die allergische Symptomatik verantwortlich sind (9, 78).

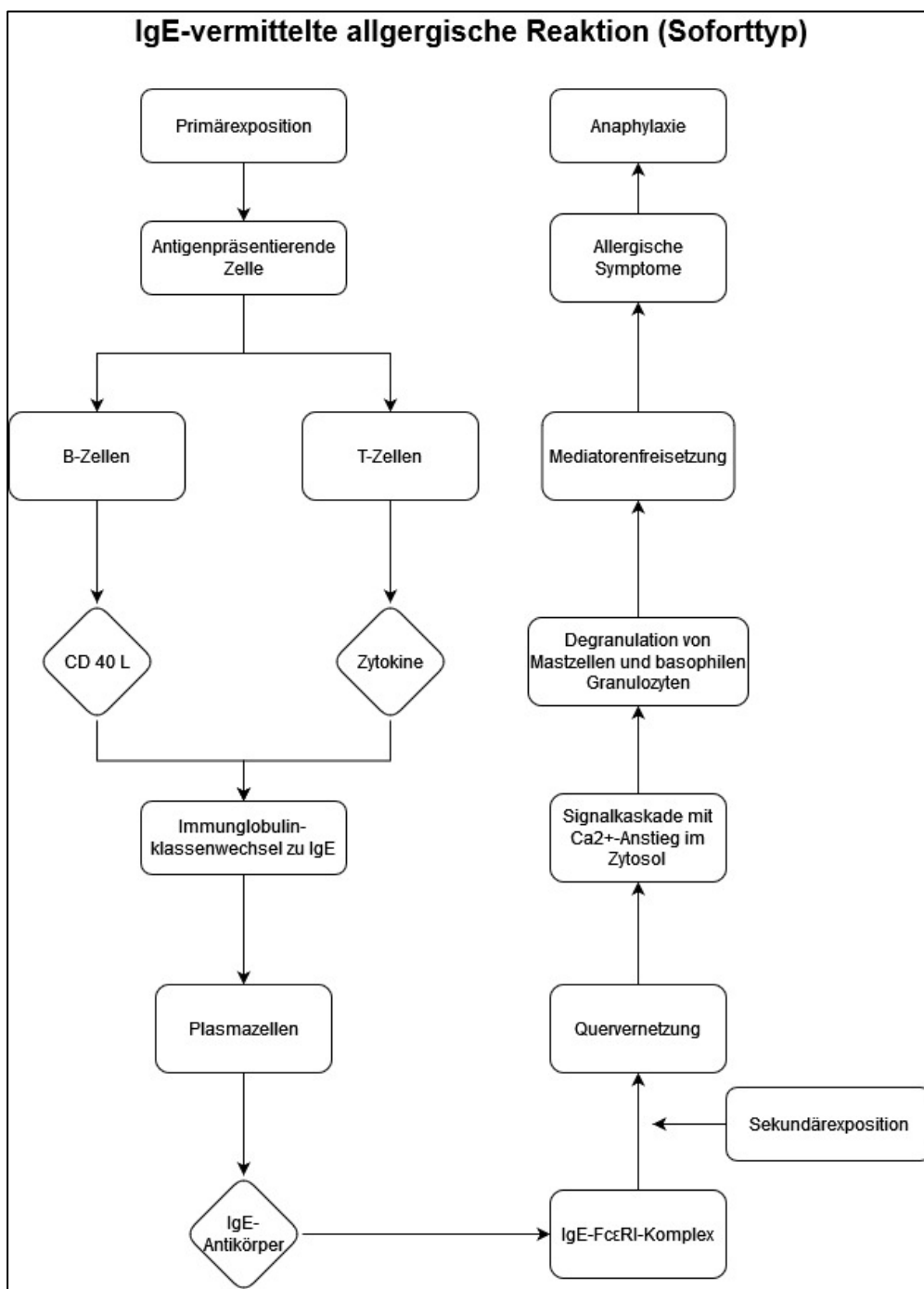


Abbildung 2: Pathomechanismus der IgE-vermittelten allergischen Reaktion (Soforttyp Allergie) (78)

Die freigesetzten Stoffe führen unter anderem zu einer Bronchialkonstriktion und Kontraktion des Gastrointestinaltrakts (GI-Trakt), was Atemnot und GI-Symptome zur Folge hat, und einer gesteigerten Gefäßpermeabilität und Vasodilatation, die sich in Schwellungen, Quaddeln, Juckreiz und vermehrter Magensäureproduktion äußern können (104).

1.1.5 Klinik der Stichreaktion und Anaphylaxie

Klinisch lässt sich zwischen lokalen und systemischen Reaktionen unterscheiden. Lokal kommt es in Folge von Insektenstichen aufgrund der in den Hymenopterenengiften enthaltenen Stoffen zu einer juckenden und brennenden Rötung sowie Schwellung. Im Falle eines enoralen Stichs kann bereits die lokale Stichreaktion aufgrund eines möglichen Larynxödems lebensgefährlich verlaufen. (94).

Die systemische Stichreaktion entspricht einer Allergie vom Typ I nach Coombs und Gell (Allergie vom Soforttyp) (104). Hierbei kommt es innerhalb weniger Minuten zum Auftreten potenziell lebensbedrohlicher Symptome. Grund hierfür liegt in einer hämatogenen Anströmung oder ausgedehntem Schleimhautkontakt der Allergene, die zu einer akuten Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten führen (10, 97).

Als Folge davon kommt es zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen, erhöhter Vasopermeabilität bei vorherrschender Vasodilatation und Vagusaktivierung. Klinisch zeigt sich dies in Symptomen wie Flush, Urtikaria, Angioödem, Bronchospasmus, Dyspnoe, Hypoxämie, Vomitus und Hypotonie, die bis zum anaphylaktischen Schock führen und damit letal enden kann (10, 102, 128).

Die Anaphylaxie ist bisher nicht einheitlich definiert. Allgemein beschreibt sie eine akute systemische Reaktion, deren Symptome den ganzen Körper betreffen können und die potenziell tödlich verlaufen kann (49). Andere Definitionen setzen eine Organbeteiligung oder das Auftreten eines kritischen Blutdruckabfalls sowie respiratorische Einschränkungen voraus (93, 117).

Nach der vorherrschenden Klassifikation von Ring und Meßmer kann die Anaphylaxie in die Grade I bis IV unterteilt werden (Tabelle 4). Die Zuordnung zum entsprechenden Grad erfolgt stets anhand des schwersten aufgetretenen Symptoms, wobei kein Symptom obligat auftreten muss (49, 105).

Tabelle 4: Klassifikation der Anaphylaxie (nach Ring und Messmer, 1977) (49, 103, 105)

| Schweregrad | | Symptome | | | |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--|
| | | Haut | GI-Trakt | Respirationstrakt | Herz-Kreislauf-System |
| I | Leichte Allgemeinreaktion | Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem | - | - | - |
| II | Ausgeprägte Allgemeinreaktion | Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem | Übelkeit, Krämpfe | Rhinorrhoe, Heiserkeit, Dyspnoe | Tachykardie (Anstieg > 20/min), Blutdruckabfall (> 20 mmHg systolisch), Arrhythmie |
| III | Bedrohliche Allgemeinreaktion | Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem | Erbrechen, Defäkation | Larynxödem, Bronchospasmus, Zyanose | Schock, Bewusstlosigkeit |
| IV | Vitales Organversagen | Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem | Erbrechen, Defäkation | Atemstillstand | Herz-Kreislauf-Stillstand |

Bei einer Anaphylaxie Grad I kann es zu Flush-Symptomatik, Juckreiz, Urtikaria oder einem Angioödem kommen. Grad II schließt gastrointestinale und respiratorische Beschwerden wie Übelkeit oder Dyspnoe ein. Einschränkungen des Herz-Kreislaufsystems wie Tachykardie oder Hypotension sind möglich. Bei den Graden III und IV verstärken sich die respiratorischen Beschwerden. Larynxödem, Bronchospasmus und/oder Zyanose können auftreten. Daneben sind ein vollständiger Atemstillstand, das Auftreten eines Schocks bzw. ein Kreislaufstillstand möglich (49, 105).

Neben diesen spezifischen, den Anaphylaxiegrad definierenden Symptomen können in allen Stadien auch unspezifische und nicht objektivierbare Symptome auftreten. Patienten berichten unter anderem von metallischem Geschmack, Palmar- und Plantarparästhesien, Hitzewallungen, pectoralem Engegefühl, Palpationen, Schwindel und Angst (49, 103).

1.2 Allergiediagnostik

1.2.1 Überblick

Die Allergiediagnostik besteht aus einem mehrstufigen Verfahren, in dessen Vordergrund die Anamnese steht. Daneben erfolgt der Nachweis einer Sensibilisierung durch Hauttests oder dem Nachweis von spezifischem IgE im Serum der Patienten. Sollten diese Schritte noch keine eindeutige Diagnose ermöglichen, kann auf verschiedene zelluläre In-vitro-Testverfahren zurückgegriffen werden (96). Anders als bei Nahrungsmittelallergien sollte die Stichprovokation bei Insektengiftallergien nicht zur Diagnostik herangezogen werden (96, 97, 108, 113).

1.2.2 Anamnese

Im Zuge der Anamnese werden neben Alter, Geschlecht, Beruf und Freizeitverhalten des Patienten die Anzahl der Insektenstiche und der vermutete Auslöser, also die Art des stechenden Insekts, erhoben. Anhand der geschilderten klinischen Symptomatik erfolgt eine Zuordnung zum entsprechenden Anaphylaxie-Grad (siehe Kapitel 1.1.5) (96). Häufig fällt Patienten die genaue Identifikation der Hymenopteren-Art schwer, gerade die Unterscheidung zwischen Bienen und Wespen bzw. Wespe und *Polistes* kann Schwierigkeiten bereiten (4). Abhilfe können Fragen nach dem Verhalten des Insekts oder dem Verbleib des Stachels nach dem Stich schaffen (97, 136).

Zusätzlich sollte das Vorhandensein von Risikofaktoren für eine schwere Anaphylaxie abgeklärt werden. Im Rahmen der Medikamentenanamnese ist unter anderem die Einnahme von ACE-Hemmern zu prüfen. Daneben steigt das Risiko mit dem Vorliegen einer erhöhten basalen Serumtryptasekonzentration zum Beispiel im Rahmen einer Mastozytose, einer chronischen Urtikaria oder malignen Neoplasien (109, 111). Daher sollte im Anschluss an die Anamnese bei Patienten mit Stichanaphylaxie in jedem Fall eine Labordiagnostik der basalen Serumtryptasekonzentration erfolgen (96).

1.2.3 Hauttests

Sobald der Verdacht auf eine Insektengiftallergie besteht, ist eine Hauttestung indiziert. Unabhängig von der Art des Tests beruht das Prinzip darauf, dass in der Dermis liegende Mastzellen mit dem Allergen in Kontakt gebracht werden und daraufhin eine lokale Erythem- und Quaddelbildung auslösen (107).

-Einleitung-

Zur Diagnose einer Insektengiftallergie wird die zweimalige Durchführung eines Hauttests empfohlen. Er sollte frühestens eine Woche nach Stichereignis erfolgen und nach vier bis sechs Wochen wiederholt werden (52, 97, 107). Für den möglichen Fall einer akuten anaphylaktischen Reaktion sollte die Testung stets unter Notfallbereitschaft durchgeführt werden (10).

Da es sich bei den Hauttests um In-vivo-Testungen handelt, gibt es mögliche (relative) Kontraindikationen. So ist die Anwendung bei Patienten mit akutem oder chronischem Ekzem, während Schwangerschaft, im Säuglings- und Kleinkindalter oder bei Sekundärinfektionen der Haut stets abzuwägen (107).

Zu unterscheiden sind unter anderem Prick-Test und Intrakutantest. Der Prick-Test stellt das Mittel der ersten Wahl dar (107). Dabei wird Insektengiftextrakt in Konzentrationen von 1 bis 300 µg/ml auf die Hautoberfläche aufgetragen und die Epidermis des Patienten anschließend mithilfe einer Lanzette angeritzt. Nach etwa 20 min wird der Test abgelesen. Der Test gilt bei einem mittleren Quaddeldurchmesser von über 3 mm als positiv (8, 97, 107).

Bei unauffälligem Prick-Test sollte ein Intrakutantest folgen, der als sensitiver in der Diagnose gilt (10, 107). Es werden Insektengiftextrakte in Konzentrationen von bis zu 1 µg/ml intrakutan appliziert. Als Positivkontrolle dient die Injektion von Histamin, als Negativkontrolle wird Kochsalz verwendet. Zeichen einer positiven Reaktion sind das Auftreten eines Erythems (in Folge der Vasodilatation), die Bildung einer Quaddel (durch gesteigerte Kapillarpermeabilität) oder das Vorkommen von Erythemhöfen (aufgrund der Gefäßerweiterung mit Axonreflex). Der Test ist als positiv zu werten, wenn 15 bis 20 min nach Applikation eine Quaddel größer als 5 mm im Durchmesser auftritt. Die Testkonzentration kann schrittweise gesteigert werden und der Test wird bei einer positiven Reaktion beendet (Endpunkttitration). Eine weitere Ablesung nach 6 bis 24 Stunden ist möglich (96, 97, 102, 107).

1.2.4 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper

Die In-vitro-Bestimmung von allergenspezifischem IgE (sIgE) zählt zur Routinediagnostik bei Verdacht auf Insektengiftallergie (101). Der Vorteil des nicht-invasiven Vorgehens liegt darin, dass es auch für Patientengruppen zugänglich ist, bei denen zum Beispiel aufgrund von atopischen Hautveränderungen eine Kontraindikation für eine Hauttestung vorliegt (83). Ähnlich wie für die Hauttestung wird auch die Bestimmung von sIgE zu zwei verschiedenen Zeitpunkten – in der ersten Woche und vier bis sechs Wochen nach Insektenstich – empfohlen (52, 97).

-Einleitung-

Eines der ersten Verfahren zur Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper war der Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST), der heute von neueren Verfahren wie dem ImmunoCAP abgelöst wurde. Dabei handelt es sich um ein vollautomatisiertes Testverfahren, das anstelle von Radioisotopen Enzyme und Fluoreszin als Marker verwendet und dessen Ergebnisse eine höhere Sensitivität aufweisen (64, 81).

Allgemein zu beachten ist, dass ein positiver Nachweis von sIgE zunächst nur auf eine Sensibilisierung hindeutet, deren klinische Relevanz in Zusammenschau mit Anamnese und weiterer Diagnostik bewertet werden muss (101).

Zur Bestimmung von allergenspezifischem IgE kommen sowohl Insektengiftextrakte als auch durch Reinigung gewonnene oder rekombinant hergestellte Allergene zum Einsatz. Gerade beim alleinigen Einsatz von Gesamtextrakten von Biene und Wespe kommt es im klinischen Alltag häufig zum Problem von doppelt positiven Resultaten. Diese können entweder auf einer genuinen Doppelsensibilisierung (DS) beruhen oder durch Kreuzreaktivität hervorgerufen werden (15, 62).

Mögliche Ursachen für eine Kreuzreaktivität können Antikörper gegen Proteinepitope von homologen Allergenen oder aber IgE gegen kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinanten (cross-reactive carbohydrate determinants; CCD) sein. Bei CCD handelt es sich um Kohlenhydratepitope (Kohlenhydratseitenketten auf Proteinen), die auf mehreren Allergenen vorhanden und gegen die Antikörper gerichtet sein können (15, 62, 101).

Die Anwesenheit von Anti-CCD-IgE-Antikörpern verringert daher die Spezifität der IgE-Detektion. Aus diesem Grund sollte in der Bestimmung von sIgE auch das Vorkommen von Antikörpern gegen Bromelain (MUX F3 aus Bromelin) oder Merretichperoxidase (HRP) als Indikator für eine mögliche CCD-Kreuzreaktivität untersucht werden (57, 101).

Durch die Einführung von Insektengift-Einzelallergenen konnten in den letzten Jahrzehnten weitere Fortschritte in der In-vitro-Testung erzielt werden. Im Rahmen der sogenannten „component-resolved diagnostics“ (CRD) wird das Vorhandensein von sIgE gegen einzelne Allergene anstelle der Gesamtextrakte bestimmt (15, 63, 88, 130).

Mithilfe der Identifikation von Markerallergenen der jeweiligen Insektenarten kann im Rahmen der CRD das Problem von Kreuzreaktivität aufgrund homologer Proteinepitope gelöst werden. Bei Markerallergenen handelt es sich um Allergene, zu denen es keine homologen Äquivalente in anderen Insektenarten gibt und die aufgrund der damit fehlenden Kreuzreaktivität eine genaue Unterscheidung von Allergien gegen unterschiedliche Hymenopterenarten erlauben (14).

-Einleitung-

Zur Unterscheidung zwischen Bienen- und Wespengiftallergie stehen im Bienengift (HBV) die Markerallergene Api m 1, Api m 3, Api m 4 und Api m 10 und im Wespengift (YJV) die Allergene Ves v 1 und Ves v 5 zur Verfügung (Abbildung 3). Das Vorliegen von sIgE gegen solche Markerallergene deutet auf eine genuine Sensibilisierung hin. (14, 15).

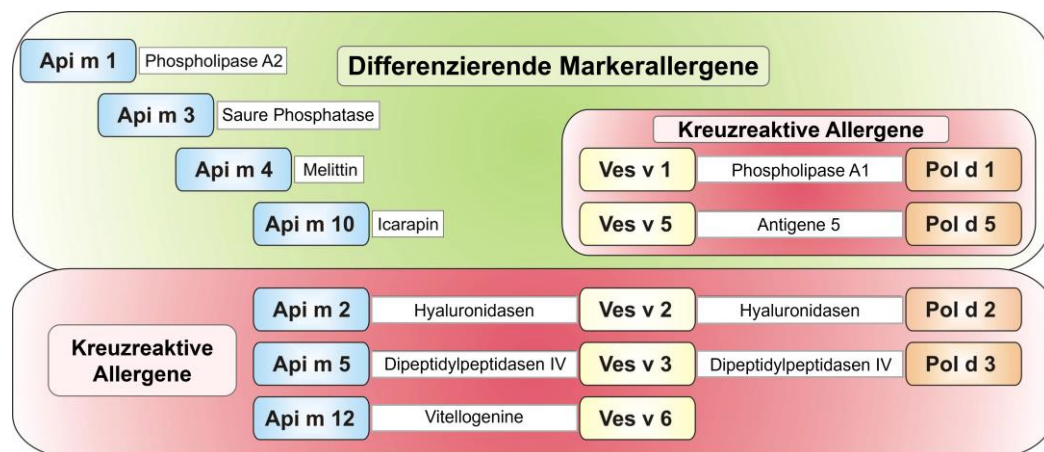


Abbildung 3: Differenzierende Markerallergene und kreuzreaktive Allergene in der „component-resolved diagnostic“ (15)

Daneben besteht durch den Einsatz von molekularbiologisch hergestellten CCD-freien Varianten der Allergene die Möglichkeit, klinisch relevante Sensibilisierungen gegen Proteinepitope festzustellen, die möglicherweise von Anti-CCD-IgE-Antikörpern überlagert werden (15, 62, 88).

Der große Vorteil der CRD liegt insgesamt in einer besseren Unterscheidung zwischen genuiner Insektengiftallergie und Kreuzreaktivität. So erhöht eine kombinierte Testung auf verschiedene Allergene die diagnostische Sensitivität (15). So konnten in der Unterscheidung zwischen Allergien gegen das Gift der Honigbiene (*Apis mellifera*) und Allergien gegen Wespengift der *Vespula spp.* große Fortschritte verzeichnet werden (15, 62).

Im Gegensatz dazu ist es bisher auch mithilfe der CRD kaum möglich, verlässlich zwischen Allergien gegen *Vespula spp.* und *Polistes dominula* zu unterscheiden. Grund hierfür liegt in der vorhandenen Kreuzreaktivität der Insektengifte sowie der bisher bekannten Allergene beider Arten (Abb. 3). So kann bei doppelt positiven Ergebnissen oft keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob eine genuine Doppelsensibilisierung oder eine Kreuzreaktivität vorliegt (15, 62).

Dies ist besonders relevant im Süden Europas (vor allem im Mittelmeerraum), wo beide Insektenarten nebeneinander leben. Doppelsensibilisierungen von YJV und PDV kommen hier deutlich häufiger vor als zwischen YJV und HBV (124). Darüber hinaus breitet sich die Feldwespe zunehmend in nördlichere Breitengrade aus und erobert damit Territorien, die bisher nur von

Vespula spp. bewohnt wurden, weshalb auch hier zunehmende Doppelsensibilisierungen zu erwarten sind (58).

Bisher stehen in der Diagnostik der Polistesallergie lediglich die beiden Allergene Pol d 1 und Pol d 5 kommerziell zur Verfügung (14). In den letzten Jahren wurden zudem weitere Allergene beschrieben. Zuletzt erfolgte eine genauere Charakterisierung der Dipeptidylpeptidase IV von *Polistes dominula* (Pol d 3) (122). Trotz dieser Fortschritte bleibt die Diagnose bei vermeintlicher Doppelsensibilisierung gegen YJV und PDV erschwert. Anders als bei HBV/YJV konnten bisher keine Markerallergene zur Abgrenzung von Wespen und Feldwespen gefunden werden (14, 62, 121).

1.2.5 Zelluläre In-vitro-Tests

Mithilfe zellulärer Allergenstimulationstests können IgE-vermittelte, zelluläre Sensibilisierungen nachgewiesen werden. Besonders wenn eine Bestimmung von sIgE oder eine Hauttestung nicht möglich ist oder unklare Befunde abzuklären sind, bilden zelluläre In-vitro-Tests einen wertvollen Bestandteil der Allergiediagnostik. Allgemein beruhen sie auf dem Nachweis von Mediatoren oder zellulären Antigenen auf der Zelloberfläche, die als Marker für eine allergische Reaktion und einer IgE-vermittelten Sensibilisierung dienen (42, 101).

Histaminfreisetzungstest

Hierbei wird die Histamin-Ausschüttung von peripheren Leukozyten (unter anderem basophile Granulozyten) als Reaktion auf eine Inkubation mit verschiedenen Allergenverdünnungen gemessen. Als Probe dienen heparinisiertes Vollblut oder isolierte Zellen. Die Messung erfolgt fluorometrisch oder mittels Immunoassay und wird in Relation zu einer 100 %-Kontrolle und einem Leerwert gesetzt. Aufgrund der Komplexität ist der Test kein Teil der Routinediagnostik und eher wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten (42, 101).

Leukotrienfreisetzungstest

Beim Leukotrienfreisetzungstest erfolgt ein Priming von Leukozyten mittels Interleukin-3. Anschließend wird die Probe mit Allergenen verschiedener Konzentrationen inkubiert und die in der Zellmembran von basophilen Granulozyten gebildeten und freigesetzten Sulfidoleukotriene mittels ELISA gemessen. Die Auswertung erfolgt im Vergleich zu einer Negativ- und Positivkontrolle. Ähnlich wie der Histaminfreisetzungstest findet auch dieser Test aufgrund der aufwendigen Durchführung vor allem in Forschungsfragen Anwendung (29, 42, 101).

Basophilenaktivierungstest

Die Grundlage des Basophilenaktivierungstests (BAT) liegt in der Änderung der Zelloberflächenmarker auf basophilen Granulozyten in Folge einer allergeninduzierten Zellstimulation. Durch durchflusszytometrischen Nachweis dieser als Aktivierungsmarker bezeichneten Oberflächenproteine kann eine Aussage über das Ausmaß der Stimulation getroffen werden. Als Aktivierungsmarker können unter anderem CD63 und CD203c dienen. Da der Basophilenaktivierungstest einen wichtigen Teil dieser Arbeit darstellt, wird er im Kapitel 1.3 gesondert besprochen (42, 45, 101).

1.3 Basophilenaktivierungstest

Beim Basophilenaktivierungstest handelt es sich um eine zelluläre Zusatzuntersuchung, die in Ergänzung zur Routinediagnostik eingesetzt werden kann. Sie kommt vor allem zum Einsatz, wenn Anamnese, Hauttestung und die Bestimmung des spezifischen IgEs keine eindeutige Diagnosefindung ermöglichen. Dies kann der Fall sein, wenn ein niedriges Gesamt-IgE die sIgE-Bestimmung einschränkt oder Kontraindikationen zur Hauttestung vorliegen (42, 45, 60, 69). Darüber hinaus stellt der BAT ein wichtiges Mittel zur weiteren Untersuchung bei vermeintlich doppelpositiven Patienten dar (33, 35, 38, 40).

Der BAT ermöglicht die Analyse und Quantifizierung der Aktivierung basophiler Granulozyten nach Stimulation durch Allergene mittels Durchflusszytometrie (22, 101). Grundlage zur Entwicklung des Tests in den 1990er-Jahren bildete die Beschreibung von CD63 als Aktivierungsmarker auf basophilen Granulozyten. Die Hochregulierung von CD63 auf der Zelloberfläche basophiler Zellen nach IgE-Rezeptoraggregation korreliert mit der Histaminfreisetzung und somit der Aktivierung der Zellen im Zuge einer allergischen Reaktion (47, 70, 116).

Neben CD63 kann auch CD203c als Aktivierungsmarker herangezogen werden. Da CD203c anders als CD63 ein basophilen-spezifischer Marker ist, kann er außerdem zur notwendigen Markierung basophiler Zellen genutzt werden. Weitere Identifizierungsmarker stellen CCR3, CRTH2 in Kombination mit Anti-CD3, Anti-IgE und CD123 mit Anti-HLA-DR dar (36, 42, 47, 60).

Als Probe können sowohl isolierte Basophile als auch Vollblut genutzt werden. Im klinischen Alltag bietet die Nutzung von Vollblut aufgrund des geringeren Aufwands und des damit

-Einleitung-

möglichen Zeitersparnis deutliche Vorteile (47). Es ist möglich, die Probe bis zu 24 Stunden vor Durchführung des BATs zu lagern (129).

In einem ersten Schritt werden die Zellen der Probe gefärbt und mit den zu untersuchenden Allergenen inkubiert. Zur Färbung der basophilen Granulozyten werden Fluorochrome mit daran gebundenen Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene verwendet. Sie dienen der Identifikation und Messung der Aktivierung. Anschließend folgen eine Erythrozytenlyse, die Zellfixation und eine Waschung der Zellen (22, 43). Die abschließende durchflusszytometrische Analyse zur Messung des Anteils an aktivierten Basophilen wird in Kapitel 2.3.5 beschrieben.

Zur Auswertung der Ergebnisse werden zusätzlich eine Negativkontrolle (Puffer) und ein bis zwei Positivkontrollen durchgeführt. Für die Stimulationskontrolle können Anti-IgE-Antikörper, Antikörper gegen FcεRI oder N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) genutzt werden. Bei fMLP handelt es sich um ein bakterielles Peptid, das als Aktivator der MAPK-Kaskade und Phospholipase C eine IgE-unabhängige Aktivierung verursacht (43, 60, 101)

Die Negativkontrolle sollte unter 5 % liegen. Höhere Werte in der Negativkontrolle können auf eine zeitnahe Exposition des Patienten gegenüber dem relevanten Allergen vor Probenentnahme hinweisen. Daneben können eine fehlerhafte Lagerung der Probe oder Verunreinigungen durch Endotoxine oder Pyrogene höhere Werte verursachen (30, 47).

Die Positivkontrolle sollte für ein auswertbares Ergebnis in der Regel mehr als 10 % betragen (22). Etwa 5-10 % der getesteten Patienten gelten als Non-Responder. Bei ihnen kommt es im Zuge der IgE-vermittelten Aktivierung zu keiner Hochregulierung von CD63 und CD203c und die Positivkontrolle erreicht damit nicht den geforderten Cut-off-Wert (43).

Der Basophilenaktivierungstest gilt als wichtiges Instrument zur Diagnostik der Insektengiftallergie. In Studien wird eine Sensitivität von mehr als 90 % erreicht (37, 42, 48, 115). Weiterhin ist ein Einsatz des BATs in der Verlaufskontrolle der spezifischen Immuntherapie denkbar und Gegenstand aktueller Forschung (46, 48, 60).

1.4 Therapie der Hymenoptereingiftallergie

1.4.1 Prophylaxe und Behandlung akuter Reaktionen

Im Zentrum der Therapie von Insektengiftallergien steht ähnlich wie bei anderen Allergien die Allergenkarenz, konkret das Vermeiden von Stichereignissen (96). Patienten sollten über die

-Einleitung-

Lebens- und Verhaltensweisen von Hymenopteren unterrichtet werden und gewisse Verhaltensregeln befolgen. Die Flugzeiten von Bienen und Wespen erstrecken sich in der Regel von März bis August (Biene) bzw. August bis September (Wespe). In diesen Monaten sollten besonders blumige Orte und Abfalleimer gemieden werden. Vom Barfußlaufen und dem Verzehr von Speisen im Freien wird abgeraten (20, 97).

Darüber hinaus sollten Patienten eine Anleitung zum Umgang und zur Selbstbehandlung im Falle eines erneuten Stichs erhalten (96). Insektengiftallergiker mit systemischer Soforttypreaktion in der Vergangenheit sind angehalten zu den Flugzeiten der Hymenopteren ein Notfallset mit sich zu führen, das Medikamente enthält, die bei erneutem Stich vom Patienten anzuwenden sind (Tabelle 5) (49, 103).

Tabelle 5: Bestandteile eines Notfallsets und Wirkungsweise der Medikamente (49, 103)

| Medikament | Wirkung | Besonderheiten |
|-----------------------------------|---|-------------------------------|
| Adrenalin (intramuskulär) | Vasokonstriktion, Erhöhung der Herzfrequenz, Erweiterung der Bronchien, Hemmung der Histaminfreisetzung | Autoinjektor |
| Glukokortikoid (oral) | Verhinderung biphasischer oder protrahierter Anaphylaxie-Symptome | 100 mg Prednisolonäquivalent |
| H1-Antihistaminikum (oral) | Verringerung von Pruritus, Urtikaria, Flush und Rhinorrhoe | Bis 4-fache Tagesdosis |
| β2-Agonist (inhalativ) | Bronchodilatation | Vor allem bei Asthmapatienten |

Die Behandlung akuter Reaktionen auf ein Stichereignis richtet sich nach der jeweiligen klinischen Symptomatik. Bei örtlichen Stichreaktionen sollte an der Stichstelle ein stark wirksames Glukokortikoid topisch angewandt werden sowie die orale Einnahme eines H1-blockierenden Antihistaminikums erfolgen (95, 96). Bei anaphylaktischen Reaktionen erfolgt die Therapie nach Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) (103).

1.4.2 Spezifische Immuntherapie

Die spezifische Immuntherapie (SIT) bzw. Hyposensibilisierung stellt die Behandlung der ersten Wahl und die einzige kausale Therapie bei Patienten mit systemischen Soforttypreaktionen dar (96). Ihre Wirkung beruht auf der Induktion von immunologischen Toleranzmechanismen durch die regelmäßige Gabe von Allergenen. Hierdurch werden spezifische Immunantworten und eine weitere Verstärkung von allergischen Immunreaktionen verhindert (92). Die SIT schützt Patienten mit Insektengiftanaphylaxie vor potenziell lebensbedrohlichen allergischen Symptomen. Darüber hinaus verbessert sie nachweislich deren Lebensqualität (11, 89).

Indikation und Kontraindikationen

Die Indikation zur Hyposensibilisierung wird bei Erwachsenen mit systemischer Stichreaktion vom Soforttyp und einer nachgewiesenen Sensibilisierung gestellt. Im Einzelfall ist die Indikationsstellung auch ohne Nachweis einer Sensibilisierung möglich. Frauen im gebärfähigen Alter sollten die Therapie vor Eintritt einer Schwangerschaft beginnen (92, 96).

Bei Vorliegen von dauerhaften Kontraindikationen sollte eine individuelle Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen, da die Vorteile eines Therapieerfolgs die möglichen Risiken übersteigen könnten. Als Kontraindikationen zählen unter anderem schwere kardiovaskuläre Krankheiten, maligne Neoplasien oder immunmodulierende Therapien. ACE-Hemmer und β -Blocker sollten wenn möglich abgesetzt oder auf andere Medikation umgestellt werden (96, 97).

Durchführung

Bei der SIT erfolgen repetitive, subkutane Injektionen von Hymenopterengift nach unterschiedlichen Anwendungsschemata. Heutzutage findet meist das sog. Rush-Verfahren Anwendung. Dabei werden im Rahmen einer stationären Schnellhyposensibilisierung innerhalb von 2-5 Tagen mehrmals täglich steigende Konzentrationen eines wässrigen Allergenpräparats bis zum Erreichen der Erhaltungsdosis von 100 μ g appliziert. In der anschließenden Erhaltungsphase von mindestens 3-5 Jahren wird in regelmäßigen Abständen (im ersten Jahr alle 4 Wochen, danach alle 4-6 Wochen) ein Depotpräparat injiziert (92, 96). Nach Ablauf dieser Zeit kann die Behandlung beendet werden, wenn es weder bei den Injektionen noch bei einer Stichprovokation zu systemischen anaphylaktischen Nebenwirkungen kommt (134).

Nebenwirkungen

In der initialen Steigerungsphase kommt es meist zu Rötung und Schwellung an der Applikationsstelle (96). Bei 3–50 % der Patienten kommt es darüber hinaus zu systemischen Nebenwirkungen (110). Diese werden häufiger bei Bienengifthyposensibilisierungen beobachtet. Die Gründe hierfür sind bisher unklar (85, 112).

Wirksamkeit

Die SIT bei Hymenoptereingiftallergien erzielte in mehreren Studien eine hohe Wirksamkeit. So liegt die Effektivität einer abgeschlossenen Bienengifthyposensibilisierungen bei 77-84 %. Für Wespengiftallergiker ist von einer Effektivität von 91-96 % auszugehen (112, 134). Zu beachten ist, dass während der SIT 10-20 % der Bienengiftallergiker und 2-10 % der Wespengiftallergiker noch nicht vor erneuter Stichanaphylaxie geschützt sind (110).

Nach Absetzen der SIT geht der Schutz vor anaphylaktischen Stichereignissen bei bis zu 15 % der Patienten wieder verloren (53). Die Wirksamkeit der Therapie ist dosisabhängig. Im Falle eines Therapieversagens (zum Beispiel beim Auftreten von systemischen Nebenwirkungen) ist eine Steigerung der Erhaltungsdosis auf 200 µg sinnvoll (114).

Bisher gibt es keine aussagekräftigen Laborparameter zur Überprüfung des Therapieerfolgs. Goldstandard ist die Stichprovokation etwa 6-18 Monate nach Erreichen der Erhaltungsdosis. Diese sollte nur bei Patienten mit stabilem Gesundheitszustand und stets unter Notfallbereitschaft durchgeführt werden. Bei systemischer Soforttypreaktion auf die Stichprovokation ist die Therapie mit gesteigerter Erhaltungsdosis fortzusetzen (96, 102, 113).

Eingeschränkte diagnostische Abgrenzung nahverwandter Hymenopterenarten

Für eine gezielte und erfolgreiche SIT ist es nötig, das allergieauslösende Insekt genau zu bestimmen (15). Sowohl Patienten als auch Ärzte haben jedoch oft Schwierigkeiten das stechende Insekt zu identifizieren (3, 4). Eine SIT mit dem falschen Insektengift könnte mögliche de-novo-Sensibilisierungen, potenziell mehr Nebenwirkungen, fehlenden Schutz oder Mehrkosten zur Folge haben (66). Im Falle einer fälschlich diagnostizierten Doppelsensibilisierung ist die Durchführung einer nicht notwendigen SIT denkbar (15).

1.5 Problemstellungen und Zielsetzungen der Studie

1.5.1 Erprobung neuer Allergene in der Diagnostik von Allergien gegen *Polistes dominula*

Kürzlich gelang es der Forschungsgruppe von Blank et al. des Helmholtz Zentrums München, neue Allergene von *Polistes dominula* zu beschreiben und rekombinant herzustellen (54, 56). Zu diesen Allergenen zählen eine Phospholipase A2 (PDV PLA2) und die Hyaluronidase Pol d 2. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte nun eruiert werden, ob diese beiden Allergene dazu beitragen können, die bisher noch immer erschwerte Diagnostik der Feldwespenallergie insbesondere in Abgrenzung zur YJV-Allergie zu verbessern.

Mithilfe des Basophilenaktivierungstests, der ein hilfreiches Instrument in der Beurteilung neuer Allergene in Bezug auf ihre In-vitro-Reaktivität bei sensibilisierten Patienten darstellt, sollten die Allergene PDV PLA2 und Pol d 2 im BAT weiter charakterisiert und mögliche immunologische IgE-Kreuzreaktivität mit den homologen Allergenen Api m 1 (sequenzhomolog zu PDV PLA2) sowie Api m 2 und Ves v 2b (sequenzhomolog zu Pol d 2) untersucht werden. Hierdurch sollte eine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Anwendung dieser Allergene in der Diagnostik der Insektengiftallergie in der Zukunft denkbar und sinnvoll ist.

1.5.2 Neue Testverfahren im Basophilenaktivierungstest

Vorhandensein verschiedener Testverfahren im BAT

Seit der ersten Beschreibung des Basophilenaktivierungstests wurden zunehmend mehr Marker ausgemacht, die für den Test genutzt werden können (42, 116). So stehen mittlerweile mit CCR3, CD203c, CRTH2 in Kombination mit Anti-CD3, Anti-IgE und CD123 mit Anti-HLA-DR eine Reihe von Identifizierungsmarkern zur Verfügung. Als Aktivierungsmarker können sowohl CD63 als auch CD203c genutzt werden (36, 42). Aus der Bandbreite der Marker für den BAT ergibt sich eine Vielzahl von Möglichkeiten, diese für Testverfahren zu kombinieren (36, 39).

Eine seit Jahren sehr etablierte Kombination besteht aus CCR3 zur Identifizierung basophiler Zellen und CD63 als Aktivierungsmarker. Nach diesem Prinzip funktioniert auch der Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz (22). Dieser Test wird schon seit einiger Zeit erfolgreich in der Diagnostik und für Forschungsfragen an der Klinik und

Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München eingesetzt (36, 121).

Etablierung des Dura Clone IF Basophil Activation® und Vergleich mit dem Flow CAST®

Die Firma Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornien, USA hatte mit dem Dura Clone IF Basophil Activation® im Jahr 2018 ein neues Testverfahren für den Basophilenaktivierungstest vorgestellt. Dieses war bisher noch nicht für die klinische Diagnostik, aber zu Forschungszwecken kommerziell erhältlich (6).

Anders als der Flow CAST® bedient dieser Test mehr Marker zur Identifizierung der basophilen Granulozyten. So kommen CD45, CD3, CRTH2 und CD203c als Identifizierungsmarker und sowohl CD63 als auch CD203c als Aktivierungsmarker zum Einsatz (6).

Eine weitere Besonderheit ist, dass der Dura Clone IF Basophil Activation® nicht mit einem Färbereagenz arbeitet, sondern die mit Fluorochromen konjugierten Antikörper an den Boden der Reagenzgefäße gebunden sind. Hierdurch muss kein Färbereagenz händisch zur Probe pipettiert werden (6).

Der Vorteil würde in einer einfacheren Durchführung des Tests durch den Wegfall von Pipettierschritten und der Reduktion von möglichen Fehlerquellen in der Anwendung liegen. Außerdem soll die sonst übliche Waschung nicht notwendig sein.

Damit wurde die Hypothese aufgestellt, dass der neue Dura Clone IF Basophil Activation® schneller in der Anwendung ist und die qualitative Aussagekraft der Ergebnisse mit der von bereits etablierten Testverfahren übereinstimmt. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es daher, das neue Testverfahren zu etablieren und die Hypothese anhand eines Vergleichs mit dem Flow CAST® zu prüfen. Daraus abgeleitet sollte abschließend eine Beurteilung der Praktikabilität des Dura Clone IF Basophil Activation® für einen Einsatz in der Routinediagnostik erfolgen. Vor diesem Hintergrund wurden auch die Kosten der beiden Testverfahren verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden und Kontrollen

An der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München wurden insgesamt 34 Personen (17 Frauen, 17 Männer) im Alter von 22-77 Jahren mit einer nachgewiesenen Bienen- bzw. Wespengiftallergie untersucht.

Das Gesamtkollektiv wurde in zwei Studiengruppen geteilt. Vier Studienteilnehmer waren in beide Gruppen eingeschlossen. Die erste Gruppe bestand aus 21 Personen (13 Frauen, 8 Männer) im Alter von 22-74 Jahren. In dieser Gruppe wurden die neuen Allergene erprobt. Die zweite Gruppe bestand aus 17 Personen (6 Frauen, 11 Männer) im Alter von 28-77 Jahren. An ihnen wurden die Testverfahren verglichen.

Einschlusskriterium für alle Probanden war das Vorliegen von spezifischem IgE gegen Bienen- oder Wespengift sowie den Komponenten Api m1 und Api m2. Darüber hinaus war aufgrund einer positiven Anamnese auf eine Allergie vom Soforttyp mit systemischer Reaktion Grad I-IV (nach Ring und Messmer), einem positiven Ergebnis im Intrakutan-Test (Bienen- und Wespengift) und dem Vorliegen von spezifischem IgE die Indikation für eine Hyposensibilisierung gestellt worden. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme standen die Personen entweder kurz vor oder noch innerhalb des ersten Jahres der spezifischen Immuntherapie.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Personen, deren Therapiebeginn schon länger als ein Jahr zurücklag, sowie Personen, die in den zwei Wochen vor Probenentnahme Glukokortikoide eingenommen hatten oder unter einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen Immunglobulin E (z.B. Omalizumab) standen. Eine Einnahme von Antihistaminika stellte keinen Ausschlussgrund dar.

Da alle Personen im Rahmen ihrer spezifischen Immuntherapie zugleich Patienten der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein waren, konnte auf die schon vorab erhobenen Befunde (Anamnese, Hauttestung und Bestimmung des spezifischen IgE) zurückgegriffen werden.

Als Kontrollgruppe für die Erprobung der Allergene dienten 4 Personen (3 Frauen, 1 Mann) im Alter von 23-62 Jahren, bei denen anamnestisch in der Vergangenheit keine allergischen Reaktionen auf Insektenstiche vorlagen. Außerdem zeigten sich keine spezifischen IgE auf Bienen- oder Wespengift sowie deren Allergenkomponenten. Um eine mögliche Sensibilisierung

auf Bienen- oder Wespengift zu vermeiden, wurde aus ethischen Gründen auf die Durchführung einer Hauttestung verzichtet. Auch die Kontrollpersonen hatten in den zwei Wochen zuvor keine Glukokortikoide eingenommen.

Nach ausführlicher Aufklärung der Probanden und deren eindeutiger und schriftlicher Einverständniserklärung erfolgte die venöse Blutentnahme einer EDTA-haltigen Monovette.

Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München und nach genehmigtem Ethikantrag (5478/12).

2.2 Routinediagnostik

2.2.1 Anamnese

Alle Patienten wurden anamnestisch anhand eines standardisierten Fragebogens auf Stichereignisse in der Vergangenheit befragt. Art des Insekts, zeitlicher Zusammenhang und Schwere der Immunreaktion standen hierbei im Vordergrund. Ebenso wurden die aktuelle Medikation, Vorerkrankungen, Risiko für eine atopische Diathese und die Familienanamnese festgehalten. Anhand der Symptomschwere erfolgte eine Einteilung der anaphylaktischen Reaktion gemäß Ring und Meßmer.

2.2.2 Intrakutantest

Zur Abklärung der vorliegenden Allergie wurde im Anschluss ein Intrakutantest durchgeführt. Hierfür mussten gegebenenfalls Antihistaminika und Kortikosteroide im Vorfeld abgesetzt werden.

Als Testallergene wurden Bienengift- und Wespengiftseren der Hersteller ALK-Abello GmbH (Hamburg, Deutschland) und Bencard Allergie GmbH (München, Deutschland) in aufsteigenden Konzentrationen (beginnend bei 0,0001 µg/ml) intrakutan injiziert. Die Konzentration wurde in einem Abstand von 15 min so lange gesteigert, bis im Vergleich zur Negativkontrolle eine mindestens 3 mm große Quaddel auftrat oder eine Konzentration von 0,1 µg/ml erreicht wurde. Sollte bis zur höchsten Konzentration keine Quaddel aufgetreten sein, galt der Test als negativ.

Als Negativkontrolle diente 0,9%ige isotonische Kochsalzlösung (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland). Für die Positivkontrolle erfolgte die Injektion einer 0,1%ige Histaminlösung (Bencard Allergie GmbH, München, Deutschland).

2.2.3 Spezifische IgE-Antikörper

Neben Anamnese und Intrakutantestung erfolgte bei allen Patienten eine serologische Untersuchung auf das Vorliegen allergen-spezifischer IgE-Antikörper. Nach Entnahme einer Blutprobe erfolgte mithilfe des Immuno-CAP-Systems Phadia (Hersteller: Thermo Fischer Scientific, Uppsala, Schweden) und/oder des Immulite 2000 XPi (Hersteller: Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) die quantitative Bestimmung der Antikörper gegen Bienen- und Wespengift sowie gegen die rekombinanten Allergene der Biene Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5, Api m 10 und der rekombinanten Allergene der Wespe Ves v 1 und Ves v 5. Darüber hinaus wurde auch das Vorliegen von Antikörpern gegen die Kohlenhydrat-Determinante aus Bromelin (MUXF3 CCD) untersucht, um die Möglichkeit von Kreuzreaktionen zu evaluieren.

Das Immuno-CAP-System bestimmt spezifisches IgE nach dem Prinzip eines Sandwich-Fluoreszenz-Enzym-Immunassay. Hierbei werden Allergene unter Erhaltung ihrer dreidimensionalen Struktur kovalent innerhalb eines Cellulose-Polymers gebunden. An diese Allergene binden allergenspezifische Antikörper aus dem zu untersuchenden Patientenserum. Im Anschluss werden vom System enzym-markierte Antikörper gegen IgE hinzugefügt, die an die spezifischen IgE-Antikörper binden. Mithilfe der nachfolgenden Fluoreszenzreaktion kann die allergenspezifische IgE-Konzentration gemessen werden (135). Das Vorliegen von spezifischen IgE-Antikörpern wird den CAP-Klassen 1-6 zugeteilt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Spezifische IgE-Klasseneinteilung im Immulite 2000 XPi und Immuno-CAP Phadia

| Klasse | Immulite 2000 (DPC) | Immuno-CAP (Phadia) | Beurteilung |
|------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 0 | < 0,10 kU/L | < 0,10 kU/L | negativ |
| 0/1 | 0,10–0,34 kU/L | 0,10–0,34 kU/L | grenzwertig |
| 1 | 0,35–0,69 kU/L | 0,35–0,69 kU/L | sehr schwach positiv |
| 2 | 0,70–3,49 kU/L | 0,70–3,49 kU/L | schwach positiv |
| 3 | 3,50–17,49 kU/L | 3,50–17,49 kU/L | positiv |
| 4 | 17,50–52,49 kU/L | 17,50–49,99 kU/L | stark positiv |
| 5 | 52,50–99,99 kU/L | 50,00–99,99 kU/L | sehr stark positiv |
| 6 | >= 100,00 kU/L | >= 100,00 kU/L | sehr stark positiv |

2.3 Basophilenaktivierungstest Flow CAST®

2.3.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

Reagenzien

Für die Durchführung des Basophilenaktivierungstest wurde der Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, verwendet.

Die darin enthaltenen Reagenzien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Reagenzien im Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG (22)

| Reagenz | Inhalt | Bezeichnung | Rekonstitution |
|--|-------------------------|-------------|---|
| Stimulationspuffer (enthält Kalzium, Heparin, IL3) | 1 Flasche lyophilisiert | B-CCR-STB | mit 50 ml H ₂ O lösen |
| Stimulationskontrolle Anti-FcεRI mAK | 1 Flasche lyophilisiert | B-CCR-STCON | mit 1,5 ml B-CCR-STB lösen |
| Stimulationskontrolle fMLP | 1 Flasche lyophilisiert | B-CCR-FMLP | mit 1,5 ml B-CCR-STB lösen |
| Färbe-Reagenz Anti-CD63-FITC Anti-CCR3-PE mAK | 1 Flasche 2,2 ml | B-CCR-SR | gebrauchsfertig |
| Lysereagenz 10x konzentriert | 1 Flasche 25 ml | B-CCR-LYR | mit 225 ml deionisiertem Wasser verdünnen |
| Wasch-Puffer | 1 Flasche 100 ml | B-CCR-WB | gebrauchsfertig |

Weiterhin wurden zur Durchführung des BATs folgende Reagenzien benutzt:

- Deionisiertes, zweifach destilliertes Wasser zur Rekonstitution (Klinikapotheke, Klinikum Rechts der Isar, München)
- FACS-Flow: Becton-Dickinson (BD) BiosciencesGmbH, Heidelberg, Deutschland
- FACS-Rinse: Becton-Dickinson (BD) BiosciencesGmbH, Heidelberg, Deutschland
- FACS-Clean: Becton-Dickinson (BD) BiosciencesGmbH, Heidelberg, Deutschland

Materialien

Tabelle 8: Materialien

| Materialien | | | |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------------------|
| Name | Größe | Firma | Stadt/Land |
| Blutentnahme | | | |
| Safety-Multifly Kanüle | 21G / 0,8 mm | Sarstedt | Nürnbrecht, Deutschland |
| S-Monovette EDTA KE | 7,5 ml | Sarstedt | Nürnbrecht, Deutschland |
| Pipetten und Pipettenspitzen | | | |
| Reference 2 | 0,5–10 µl | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Reference | 50 µl | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Reference | 50–200 µl | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Reference | 100–1000 µl | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Repeater 4780 | | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen 0,5 - 20 µl | 0,5-20 µl | neoLab GmbH | Heidelberg, Deutschland |
| Pipettenspitze 200 µl | 200 µl | Sarstedt | Nürnbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitze 1000 µl, blau | 1000 µl | Sarstedt | Nürnbrecht, Deutschland |
| Combitips | 500 µl | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Combitips | 5 ml | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Combitips | 50 ml | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| | | | |

-Material und Methoden-

| Weitere Materialien | | | |
|------------------------------|--------|----------------------------------|-------------------------|
| Probenröhre 75 x 12 mm | 5 ml | Sarstedt | Nürnbrecht, Deutschland |
| Falcon konische Röhrchen | 15 ml | Corning Science Mexico | Tamaulipas, Mexico |
| Falcon Rundbodenröhrchen | 5 ml | Becton-Dickinson BiosciencesGmbH | Heidelberg, Deutschland |
| Eppendorfcups | 1,5 ml | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Multiply-µStip Pro 8er Kette | 0,2 ml | Sarstedt | Nürnbrecht, Deutschland |
| Laborglasflasche | 250 ml | Duran Group GmbH | Wertheim, Deutschland |
| Glaszylinder | 50 ml | Hirschmann | Stuttgart, Deutschland |
| Styroporbox | | | |

Geräte

Tabelle 9: Geräte

| Geräte | | |
|--------------------------|--------------------|-------------------------|
| Name | Firma | Stadt/Land |
| Kühlgerät Bosch Cooler | Bosch GmbH | Gerlingen, Deutschland |
| Vortexer Vortex Genie 2 | Bender & Hobein AG | Zürich, Schweiz |
| Brutschrank Typ B 40 | Memmert GmbH | Schwabach, Deutschland |
| Zentrifuge Universal 32R | Hettich GmbH | Tuttlingen, Deutschland |

| | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Durchflusszytometer FACSCalibur | Becton-Dickinson BiosciencesGmbH | Heidelberg, Deutschland |
| Computer | Apple Macintosh | Kalifornien, USA |
| Software BD CellQuest Pro | Becton-Dickinson BiosciencesGmbH | Heidelberg, Deutschland |

2.3.2 Allergene

Im Basophilenaktivierungstest wurden sowohl Bienen- und Wespengiftgesamtextrakt als auch rekombinante Allergene verwendet. Für die Gesamtextakte und das gereinigte natürliche Allergen Api m 1 der Honigbiene (*Apis mellifera*) wurde auf kommerziell erhältliche Allergene zurückgegriffen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Allergene

| Allergene | | | |
|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Name | Inhalt | Herkunft | Stadt/Land |
| Honey Bee Venom (HBV) | Bienengift | Bühlmann Laboratories AG | Schönenbuch, Schweiz |
| Yellow Jacket Venom (YJV) | Wespengift | Bühlmann Laboratories AG | Schönenbuch, Schweiz |
| Api m 1 | Phospholipase A2 der Honigbiene | Latoxan | Portes-lès-Valence, Frankreich |

Daneben kamen Allergene zum Einsatz, die vom Helmholtz Zentrum in München, Deutschland, zu Forschungszwecken rekombinant hergestellt wurden. Die Herstellung erfolgte mithilfe von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen (17). Hierbei handelte es sich um die Phospholipase A2 (PLA2) der *Polistes dominula* (PDV PLA2) und die Hyaluronidasen der *Polistes dominula* (Pol d 2), der *Apis mellifera* (Api m 2) und der *Vespula spp.* (Ves v 2b). Die rekombinant hergestellten Allergene lagen aliquotiert in lyophilisierter Form vor und wurden zur Verwendung in 100µl Stimulationspuffer gelöst.

2.3.3 Versuchsschema zur Erprobung homologer Allergene

Um die homologen Allergene zu untersuchen, wurden die Patienten der ersten Gruppe in zwei Studienpopulationen unterteilt (siehe Kapitel 2.1). In der ersten Untergruppe wurden Patienten mit einer Sensibilisierung auf Api m 1 und YJV-sensibilisierte Patienten eingeschlossen. Eine Doppelsensibilisierung war dabei kein Ausschlussgrund. Die zweite Untergruppe beinhaltete Api m 2- und YJV-sensibilisierte Patienten. Auch hier war eine Doppelsensibilisierung möglich. Bei entsprechendem Sensibilisierungsprofil war ein Einschluss in beide Studiengruppen möglich. Alle Patienten wurden auf HBV und YJV untersucht. In der ersten Untergruppe wurden die Phospholipasen PDV PLA2 und Api m 1 verglichen, während in der zweiten Untergruppe die Hyaluronidasen Api m 2, Ves v 2b und Pol d 2 zum Einsatz kamen.

2.3.4 Durchführung

Der Basophilenaktivierungstest Flow CAST von Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, weist *in vitro* die Expression von CD63 (Aktivitätsmarker) auf der Oberfläche von Basophilen und damit deren IgE-abhängige Aktivierung nach. Für die Durchführung des Tests wurden die im Test-Kit enthaltenen Reagenzien zunächst entsprechend dem Flow CAST Manual vorbereitet (22).

Die Allergene wurden vor ihrer Verwendung in Stimulationspuffer gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Vorbereitung

- Rekonstitution des Stimulationspuffers durch Lösen in 50 ml ultrareinen Wassers (H₂O), anschließend Aliquotieren in Rundbodenröhrchen (5ml) und Lagerung bei -20°C
- Rekonstitution der Stimulationskontrollen durch Lösen in jeweils 1,5 ml rekonstituiertem Stimulationspuffer, anschließend Aliquotieren zu je 120 µl in Eppendorfcups und Lagerung bei -20°C
- Verdünnung des Lysereagens in 225 ml deionisiertem Wasser und Lagerung bei 6-8 °C
- Lösen von Api m 1 (Firma Latoxan, Portes-lès-Valence, Frankreich) in 1 ml Stimulationspuffer, anschließend Aliquotierung zu je 5 µl und Lagerung bei -20°C
- Rekonstitution der Allergene PDV PLA2, Api m 2, Ves v 2b und Pol d 2 in je 100 µl Stimulationspuffer, anschließend Aliquotierung zu je 5 µl und Lagerung bei -20°C
- Lösen von HBV und YJV in 250 µl Stimulationspuffer

-Material und Methoden-

Die Reagenzien des Flow CAST und die Allergene konnten aliquotiert bei entsprechender Kühlung (-20°C: Stimulationspuffer, Stimulationskontrollen, Allergene; 6-8°C: Lysereagenz) bis zu 6 Monate aufbewahrt werden. HBV und YJV wurden vor jeder Durchführung neu gelöst und direkt verwendet.

Verdünnungsreihe

Die Bienen- und Wespengiftextrakte wurden in einer in der Diagnostik üblichen Konzentration von 284 ng/ml angewandt. Alle weiteren Allergene wurden einer Verdünnungsreihe nach ausgehend von 1000 ng/ml eingesetzt. Daneben wurden für jeden Patienten zwei Leerwerte und jeweils eine Positivkontrolle mit Anti-FcεRI-Antikörper sowie fMLP bestimmt. Hieraus ergaben sich folgende Proben zur Bestimmung der basophilen Aktivierung (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht untersuchter Kontrollen und Allergene in der Testung neuer Allergene

| Nr. | Inhalt | Konz. | Nr. | Inhalt | Konz. |
|-----|----------------|------------|-----|----------|------------|
| 1 | Leerwert | - | 17 | Api m 2 | 1000 ng/ml |
| 2 | Leerwert | - | 18 | Api m 2 | 200 ng/ml |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | - | 19 | Api m 2 | 40 ng/ml |
| 4 | fMLP | - | 20 | Api m 2 | 8 ng/ml |
| 5 | HBV | 284 ng/ml | 21 | Api m 2 | 1,6 ng/ml |
| 6 | YJV | 284 ng/ml | 22 | Ves v 2b | 1000 ng/ml |
| 7 | PLA 2 | 1000 ng/ml | 23 | Ves v 2b | 200 ng/ml |
| 8 | PLA 2 | 200 ng/ml | 24 | Ves v 2b | 40 ng/ml |
| 9 | PLA 2 | 40 ng/ml | 25 | Ves v 2b | 8 ng/ml |
| 10 | PLA 2 | 8 ng/ml | 26 | Ves v 2b | 1,6 ng/ml |
| 11 | PLA 2 | 1,6 ng/ml | 27 | Pol d 2 | 1000 ng/ml |
| 12 | Api m 1 | 1000 ng/ml | 28 | Pol d 2 | 200 ng/ml |
| 13 | Api m 1 | 200 ng/ml | 29 | Pol d 2 | 40 ng/ml |
| 14 | Api m 1 | 40 ng/ml | 30 | Pol d 2 | 8 ng/ml |

-Material und Methoden-

| | | | | | |
|----|---------|-----------|----|---------|-----------|
| 15 | Api m 1 | 8 ng/ml | 31 | Pol d 2 | 1,6 ng/ml |
| 16 | Api m 1 | 1,6 ng/ml | | | |

Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurden die aliquotierten Allergene zunächst in einem entsprechenden Verhältnis in Stimulationspuffer gelöst, sodass eine Konzentration von 4400 ng/ml entstand. Da im BAT aufgrund des Verhältnisses der Reagenzien eine Verdünnung um den Faktor 4,4 erfolgt, lag damit eine Endkonzentration von 1000 ng/ml vor (C1). Für die weiteren Proben erfolgte die Verdünnungsreihe gemäß folgendem Schema:

- Gabe von 200 µl Stimulationspuffer zu 50 µl C1 → 200 ng/ml (C2)
- Gabe von 200 µl Stimulationspuffer zu 50 µl C2 → 40 ng/ml (C3)
- Gabe von 200 µl Stimulationspuffer zu 50 µl C3 → 8 ng/ml (C4)
- Gabe von 200 µl Stimulationspuffer zu 50 µl C4 → 1,6 ng/ml (C5)

Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die Proberöhrchen mit 50 µl des Probereagens (zweimal Stimulationspuffer als Leerwerte, Anti-FcεRI mAK und fMLP als Positivkontrollen und jeweils fünf Konzentrationen der zu untersuchenden Allergen) befüllt.

Anschließend erfolgte die schrittweise Zugabe von 100 µl Stimulationspuffer, 50 µl Patienten-Vollblut und 20 µl Färbereagens. Nach kurzer Mischung mithilfe des Vortexers auf mittlerer Stufe wurden die Röhrchen für 25 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Durch Zugabe von 2 ml vorgewärmtem Lysereagens wurde die Reaktion gestoppt und die Erythrozyten gelöst. Nach fünfminütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde im Anschluss abgegossen und es erfolgte eine Suspension der Zellen in 300 µl Waschpuffer. Bis zur Auswertung am FACS-Gerät wurden die Röhrchen im Dunkeln gelagert.

Durch die Farbmarkierung der basophilen Granulozyten mithilfe Anti-CCR3-PE mAK gelang bei der durchflusszytometrischen Auswertung die Selektion der Basophilen von den übrigen Lymphozyten. Pro Analyse wurden mindestens 300 Basophile selektiert und auf Aktivierung untersucht. Die Ermittlung des prozentualen Anteils der aktivierten Basophilen erfolgte durch die Messung der CD63-Expriemierung (farblich durch Anti-CD63-FITC markiert).

2.3.5 Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung

Ein Durchflusszytometer, auch FACS (engl. Fluorescence-Activated-Cell-Sorter), ermöglicht die Analyse von Zellen unter anderem anhand ihrer Form und Struktur. Die Messung erfolgt auf dem Prinzip der optischen Emission. Durch verschiedene Parameter können Rückschlüsse auf die Form (relative Größe), Struktur (relative Granularität) und die Färbung (durch vorherige Markierung mit Fluorochromen) der Zellen gezogen werden (12, 24).

Ein FACS besteht aus drei Komponenten (Abbildung 4):

Im Flüssigkeitssystem wird dafür gesorgt, dass die Zellen einzeln in die Messkammer eintreten. Durch hydrodynamische Fokussierung reihen sich die Zellen hintereinander an, sodass sie individuell analysiert werden können (24, 125).

Das optische System besteht aus einem oder mehreren Lasern, einer Sammeloptik mit Spiegeln und Filtern zur Erhöhung der Messspezifität und mehreren Detektoren, die das optische Signal erfassen (24, 125).

An den Detektoren erfolgt die Signalverarbeitung. Trifft ein Lichtstrahl auf einen Detektor (in der Regel sog. Photomultiplier, die das Signal verstärken), entsteht elektrischer Strom, der als Signal erfasst werden kann und in der Messsoftware graphisch dargestellt wird. Die Darstellung erfolgt meist mittels Punktdiagramm, bei dem jede Zelle als eigener Punkt gezeigt wird (24, 106, 125).

In der Messkammer trifft der Laser auf die zu analysierende Zelle, wobei es zu zwei Streuphänomenen kommt:

- Die Vorwärtsstreuung, die 20° zur Lichtachse einfällt (Forward Scatter; FSC), gibt Auskunft über die relative Größe der Zelle.
- Die Seitwärtsstreuung, die 90° zur Lichtachse einfällt (Side Scatter; SSC), gibt Auskunft über die relative Granularität der Zelle.

Durch diese beiden Eigenschaften können bereits die verschiedenen Zellarten des Blutes unterschieden werden (12, 24, 106).

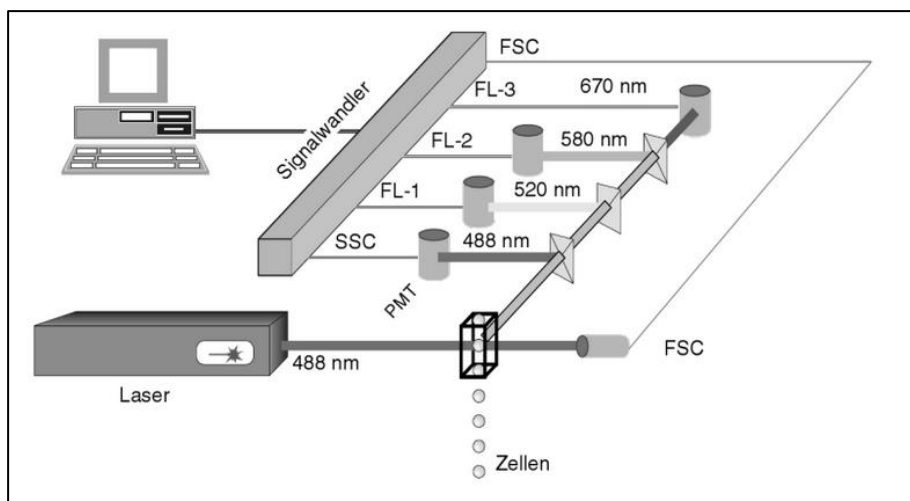


Abbildung 4: Aufbau eines Durchflusszytometers (106)

FSC, Forward Scatter; SSC, Side Scatter; PMT, Photomultiplier; FL-1-3, Fluoreszenzen bei verschiedenen Wellenlängen

Zusätzlich lassen sich vor der Analyse gezielt Zellepitope mit Fluorochromen markieren. In Kombination mit dem Einsatz verschiedenfarbiger Laser und Filter können so weitere Eigenschaften wie zum Beispiel die CD63-Expression analysiert werden (12, 106).

Die Fluorochrome werden hierfür mit Antikörpern gegen definierte Epitope (z.B. CD-Moleküle) konjugiert, sodass sie nur an Zellen binden, die diese Oberflächenmerkmale erfüllen. Fluorochrome absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren dabei Licht einer längeren Wellenlänge. Dieser Vorgang kann mithilfe von Fluoreszenzdetektoren erfasst werden. Bei der Verwendung von Fluorochromen mit ähnlichen Emissionsprofilen erfolgt eine rechnerische Kompensation (12, 106).

Der Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, benutzt folgende Fluorochrome (22):

- Fluorescein Isothiocyanate konjugiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes CD63 (Anti-CD63-FITC)
- Phycoerythrin konjugiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen den humanen Chemokinrezeptor CCR3 (Anti-CCR3-PE)

Das FACSCalibur der Firma Becton-Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland, enthält folgende Laser (106):

- Blauer Laser der Wellenlänge 488 nm (Blau)
- Roter Laser der Wellenlänge 633 nm (Rot)

2.3.6 Prinzip der Analyse

Die gemessenen Streu- und Fluoreszenzeigenschaften jeder einzelnen analysierten Zelle werden gespeichert und zur graphischen Auswertung in einem sog. Dotplot (einer Punktwolkendarstellung) abgebildet (106). Die Auswertung erfolgte in dieser Studie mithilfe der Softwares BD CellQuest Pro und BD FACSDiva der Becton-Dickinson BiosciencesGmbH, Heidelberg, Deutschland.

Durch das Setzen von definierten Auswertfenstern (sog. Gating) können Subpopulationen, die anhand bestimmter Eigenschaften definiert werden, genauer untersucht werden (106). Nach diesem Prinzip kann die Population an analysierten Granulozyten im SSC / FSC nach den Eigenschaften Größe und Granularität definiert und separat betrachtet werden (Abbildung 5, Dotplot oben links). Durch Gegenüberstellung von SSC und anti-CCR3-PE können hiervon wiederum die Basophilen separiert werden (Abbildung 5, Dotplot oben rechts, roter Kasten). CCR3 ist ein Chemokinrezeptor, der als Oberflächenantigen auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten exprimiert wird (39).

Diese Gruppe wird im Anschluss auf ihre Aktivierung untersucht. Aktivierte Basophile exprimieren vermehrt CD63 (Glykoprotein gp53) (116). CD63 wird im Basophilenaktivierungstest mithilfe von Anti-CD63-FITC markiert, sodass in einem letzten Auswertungsschritt die Gegenüberstellung von CCR3-markierten Zellen (als Identifizierungsmarker) und CD63-markierten Zellen (als Aktivierungsmarker) möglich ist (Abbildung 5, Dotplot unten). CCR3-markierte Zellen werden dabei auf der Abszisse abgebildet und CD63-markierte Zellen auf der Ordinate.

Durch Negativ- und Positivkontrollen kann in einer Quadranten-Analyse ein Quadrant mit aktivierten (also CD63-positiven) Basophilen definiert werden (Abbildung 5, orangefarbener Kasten). Diese haben ein hohes Signal für Anti-CCR3 und Anti-CD63. Die auf diese Weise definierte Gruppe der aktivierten Basophilen wird ins relative Verhältnis zur Gesamtpopulation der Basophilen gesetzt, sodass sich ein Prozentwert als Maß der Aktivierung ergibt (Abbildung 5, Auswertung rechts unten).

In den Abbildungen 5-7 sind Beispiele für durchflusszytometrische Analysen von Proben des Flow CAST® nach Stimulation mit der Positivkontrolle Anti-FcεRI mAK, einer Negativkontrolle mit Stimulationspuffer und einem Allergen (YJV) zu sehen.

-Material und Methoden-

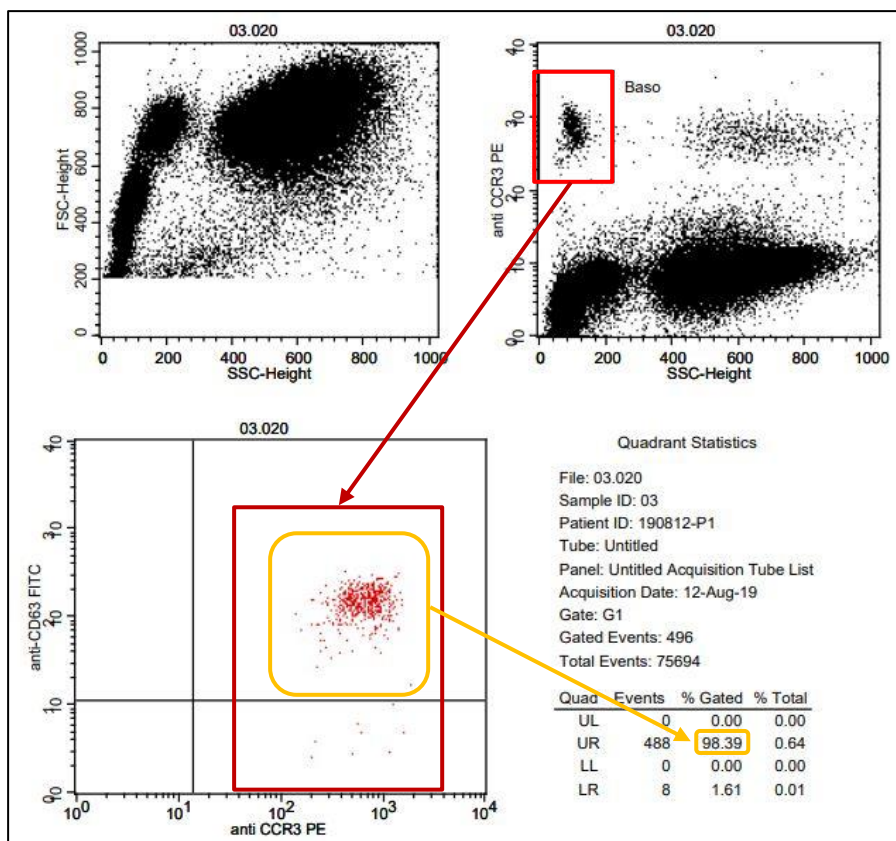


Abbildung 5: Beispiel für eine Auswertung des Flow CAST® (Software: BD FACSDiva; Patient: 190812-P1; Probe: Positivkontrolle mit Anti-FcεRI mAK)

UL, upper left; UR, upper right; LL, lower left; LR, lower right; events, Anzahl gemessener Basophiler (%)

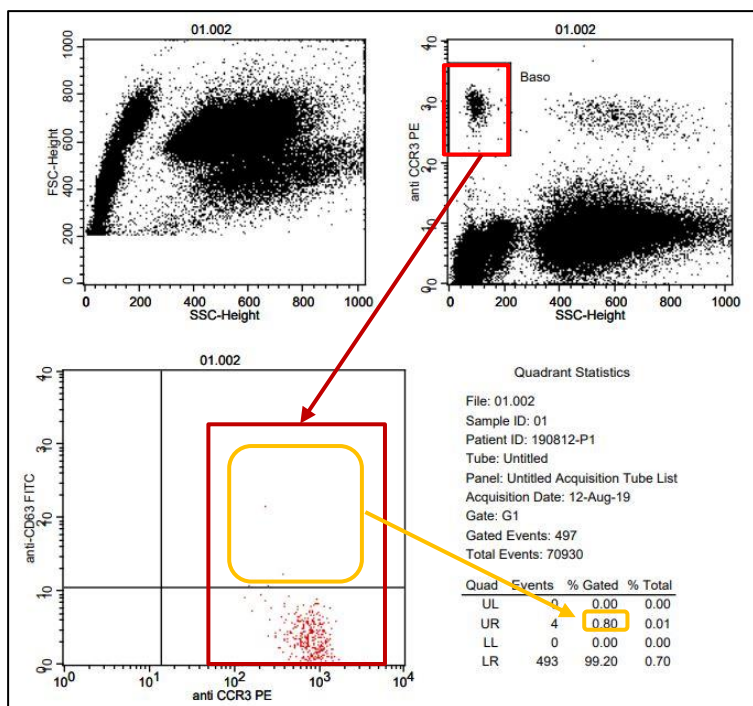


Abbildung 6: Beispiel für eine Auswertung des Flow CAST® (Software: BD FACSDiva; Patient: 190812-P1; Probe: Negativkontrolle mit Stimulationspuffer)

UL, upper left; UR, upper right; LL, lower left; LR, lower right; events, Anzahl gemessener Basophiler (%)

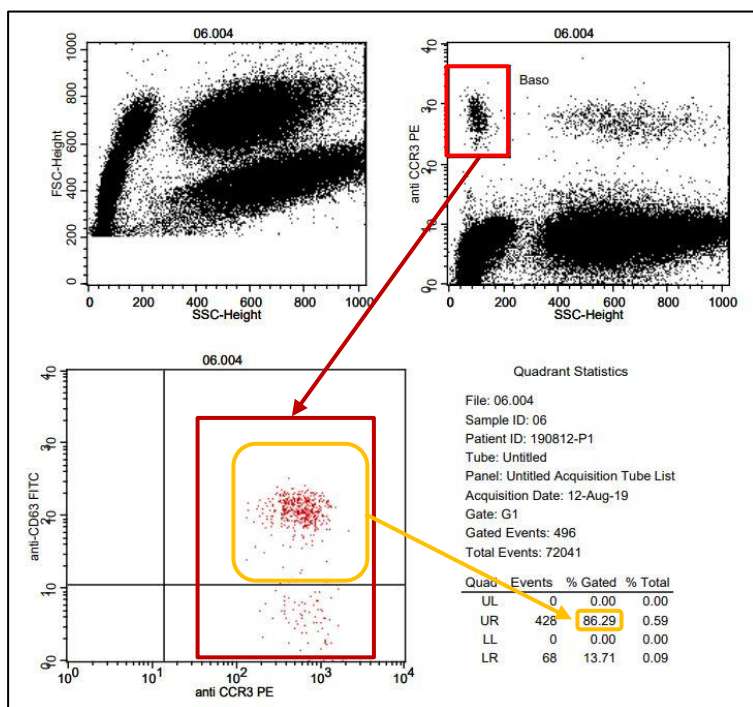


Abbildung 7: Beispiel für eine Auswertung des Flow CAST® (Software: BD FACSDiva; Patient: 190812-P1; Probe: Yellow Jacket Venom in einer Konzentration von 284 ng/ml)

UL, upper left; UR, upper right; LL, lower left; LR, lower right; events, Anzahl gemessener Basophiler (%)

2.4 Basophilenaktivierungstest Dura Clone IF Basophil Activation®

2.4.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

Reagenzien

In einem zweiten Teil der Studie wurde der Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, mit dem Dura Clone IF Basophil Activation® der Firma Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornien, USA verglichen. Beim Test-Kit der Firma Beckman Coulter werden die zur Farbmarkierung verwendeten Antikörper nicht über Reagenzien hinzugefügt, sondern liegen in den im Kit enthaltenen Röhrchen bereits fixiert vor (6).

Die für diesen BAT verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Reagenzien des DuraClone IF Basophil Activation®

| Reagenz | Inhalt | Herkunft | Stadt/Land |
|---|--|-------------------------|------------------------|
| Activation Solution (Puffer, enthält Kalzium) | 1 Flasche 100 ml | Beckman Coulter, Inc | Brea, Kalifornien, USA |
| OptiLyse C (enthält 1,5 % Formaldehyd) | 1 Flasche 5,5 ml | Beckman Coulter, Inc | Brea, Kalifornien, USA |
| PBS Dulbecco Phosphate Buffered Saline | 9,55 g/L (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺) | Biochrom GmbH | Berlin, Deutschland |

Materialien

Für den Dura Clone IF Basophil Activation® wurden analog die in Kapitel 2.3.1 aufgeführten Materialien verwendet. Das Kit enthält zwei Arten von Probenröhrchen, in denen bereits die mit Fluorochromen konjugierten Antikörper getrocknet und fixiert vorliegen. In Tabelle 13 sind diese Antikörper aufgeführt.

Tabelle 13: Rörchen und enthaltene Antikörper des Dura Clone Basophil Activation IF

| Reagenzgefäße des Dura Clone Basophil Activation IF | | |
|---|----------------|---|
| Rörchen | Anzahl pro Kit | Enthaltene Antikörper |
| Probenrörchen | 25 Rörchen | Anti-CD45; Anti-CD3; Anti-CRTH2, Anti-CD203c; Anti-CD63 |
| Positivkontrolle | 5 Rörchen | Anti-CD45; Anti-CD3; Anti-CRTH2, Anti-CD203c; Anti-CD63; Anti-IgE |

Geräte

Neben den in Kapitel 2.3.1 aufgeführten Geräten wurden zur Auswertung des Tests die in Tabelle 14 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 14: Weitere Geräte zur Durchführung des Dura Clone IF Basophil Activation

| Geräte | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Name | Firma | Stadt/Land |
| Durchflusszytometer FACSCanto | Becton-Dickinson BiosciencesGmbH | Heidelberg, Deutschland |
| Computer | Hewlett Packard | Palo Alto, USA |
| Software FlowJo | Becton-Dickinson BiosciencesGmbH | Heidelberg, Deutschland |

2.4.2 Allergene

Als Allergene wurden die bereits in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Gesamtextrakte der Biene (HBV) und Wespe (YJV) der Firma Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Schweiz, genutzt.

2.4.3 Versuchsschema zum Vergleich der Tests der Firmen Bühlmann und Beckman Coulter

Für den Vergleich der beiden Test-Kits der Firmen Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, und Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornien, USA wurde eine Studienpopulation aus Patienten gebildet, die sowohl auf HBV als auch YJV sensibilisiert waren. Die Patienten wurden jeweils im Flow CAST® und im Dura Clone IF Basophil Activation® auf die Gesamtextrakte von Honigbiene und Wespe getestet und die Ergebnisse wurden qualitativ und quantitativ verglichen. Hierbei erfolgte für den Dura Clone IF Basophil Activation® noch ein Vergleich der möglichen Gating-Varianten (vgl. Kapitel 2.4.6) und der Aktivierungsmarker CD63 und CD203c sowie ein Vergleich der Positivkontrolle Anti-IgE mit Anti-FcεRI mAK des Flow CAST®.

Darüber hinaus wurde die Durchführungszeit der beiden BATs gemessen, indem für alle Schritte der Durchführung die benötigte Zeit gestoppt wurde. Die Zeitmessung erfolgte mithilfe eines Smartphones (Huawei P20 lite, Shenzhen, China). Die definierten Schritte waren dabei folgende:

- Vorbereitung
- Dilution der Allergene
- Verdünnungsreihe
- Zusammenführung der Reagenzien (in der Studie als 1. Schritt benannt)
- 1. Inkubation
- Lyse
- 2. Inkubation (*lediglich Dura Clone IF Basophil Activation®*)
- Zuführen von PBS-Puffer (*lediglich Dura Clone IF Basophil Activation®*)
- 3. Inkubation (*lediglich Dura Clone IF Basophil Activation®*)
- Zuführen von PBS-Puffer (*lediglich Dura Clone IF Basophil Activation®*)
- Zentrifugation
- Resuspension
- Auswertung am FACS

Zuletzt erfolgte ein Kostenvergleich der Testverfahren. Zur Berechnung wurden die Marktpreise der Hersteller für die Test-Kits des Flow CAST® und des Dura Clone IF Basophil Activation® sowie die Reagenzien Activation Solution und Optilyse C herangezogen. Kosten für weitere

Reagenzien oder Verbrauchsmaterialien wurden zur Vereinfachung nicht berücksichtigt. Für den Vergleich wurden die Kosten je durchführbarer Test berechnet.

Untersuchung hoher Leerwerte bei Patienten im Dura Clone IF Basophil Activation®

Da sich im Dura Clone IF Basophil Activation® bei einigen Patienten eine Aktivierung in allen Proben und damit auch in den Negativkontrollen zeigte (siehe Kapitel 3.2.4), wurde das Versuchsschema einmalig um einen zusätzlichen Test erweitert. Ziel war es, die Ursache der generellen Aktivierung genauer zu untersuchen und dabei die Probenröhrchen mit fixierten Markern des Dura Clone IF Basophil Activation® als Fehlerquelle zu adressieren.

Hierzu wurde in einem gesonderten Ansatz mit dem Blut eines Patienten (P30) ein weiterer BAT durchgeführt, bei dem die Probe manuell mit Markern versehen und nicht auf die fixierten Marker des Dura Clone zurückgegriffen wurde. Die verwendeten Marker waren Anti-CCR3 (Brilliant Violet 510, Clone: 5E8, Hersteller: Biolegend, San Diego, USA), Anti-CD203c (PE/Cyanine 7, Clone NP4D6, Hersteller: Biolegend, San Diego, USA) und Anti-CD63 (V450, Clone H5C6, Hersteller: Becton-Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland). Als Reagenzien wurden die Activation Solution, Optilyse C und PBS-Puffer des Dura Clone IF Basophil Activation® und zusätzlich der Stimulationspuffer (zur Suspension von HBV und YJV) und die Positivkontrolle Anti-FcεRI mAK des Flow CAST® verwendet.

2.4.4 Durchführung

Auch der Basophilenaktivierungstest Dura Clone IF Basophil Activation® der Firma Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornien, USA, weist *in vitro* die Expression von CD63 (Aktivierungsmarker) auf der Oberfläche von Basophilen und damit deren IgE-abhängige Aktivierung nach. Daneben wird außerdem die Expression von CD203c nachgewiesen (Identifikations- und Aktivierungsmarker) (6).

Vorbereitung

Die Reagenzien OptiLyse C und Activation Solution lagen gebrauchsfertig vor und wurden vor Durchführung des Tests auf Zimmertemperatur erwärmt. Die Allergene wurden vor ihrer Verwendung in 250 µl Activation Solution gelöst.

Die Reagenzien des Dura Clone wurden entsprechend der Herstellerhinweise (OptiLyse C: 18-25°C; Activation Solution: 2-8°C) gelagert und im angegebenen Zeitraum verwendet. HBV und YJV wurden vor jeder Durchführung neu gelöst und direkt verwendet.

Verdünnungsreihe

Die Bienen- und Wespengiftextrakte wurden einer Verdünnungsreihe nach ausgehend von 284 ng/ml bzw. 625 ng/ml in drei Konzentrationen eingesetzt. Daneben wurden für jeden Patienten zwei Leerwerte und jeweils die Positivkontrollen gemäß Gebrauchsanweisung des Herstellers eingesetzt. So erfolgte die Positivkontrolle beim Flow CAST® mit Anti-FcεRI-Antikörper sowie fMLP. Im Röhrchen der Positivkontrolle des Dura Clone IF Basophil Activation® liegt ein gebundener Anti-IgE-Antikörper vor. Daneben wurde in einem weiteren Probenröhrchen noch der Anti-FcεRI mAK (Stimulationskontrolle des Flow CAST®) eingesetzt. FMLP als Positivkontrolle war beim Dura Clone IF Basophil Activation® nicht vorgesehen. Hieraus ergaben sich folgende Proben zur Bestimmung der basophilen Aktivierung (Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht der getesteten Kontrollen und Allergene im Testvergleich

| Flow CAST® | | | Dura Clone IF Basophil Activation® | | |
|------------|----------------|-----------|------------------------------------|----------------|-----------|
| Nr. | Inhalt | Konz. | Nr. | Inhalt | Konz. |
| 1 | Leerwert | - | 1 | Leerwert | - |
| 2 | Leerwert | - | 2 | Leerwert | - |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | - | 3 | Anti-FcεRI mAK | - |
| 4 | fMLP | - | 4 | Anti-IgE | - |
| 5 | HBV 1 | 284 ng/ml | 5 | HBV 1 | 625 ng/ml |
| 6 | HBV 2 | 57 ng/ml | 6 | HBV 2 | 125 ng/ml |
| 7 | HBV 3 | 11 ng/ml | 7 | HBV 3 | 25 ng/ml |
| 8 | YJV | 284 ng/ml | 8 | YJV | 625 ng/ml |
| 9 | YJV 2 | 57 ng/ml | 9 | YJV 2 | 125 ng/ml |
| 10 | YJV 3 | 11 ng/ml | 10 | YJV 3 | 25 ng/ml |

Zur Herstellung der Verdünnungsreihe für den Dura Clone wurden die Allergene zunächst in 250 µl Activation Solution gelöst (C1). Für die weiteren Proben erfolgte die Verdünnungsreihe gemäß folgendem Schema:

-Material und Methoden-

- Gabe von 100 µl Activation Solution zu 25 µl C1 → 125 ng/ml (C2)
- Gabe von 100 µl Activation Solution zu 25 µl C2 → 25 ng/ml (C3)

Die Verdünnungsreihe für den Flow CAST® wurde analog dazu mit Stimulationspuffer statt Activation Solution hergestellt.

Vorversuche zur Etablierung des Dura Clone IF Basophil Activation®

Laut Gebrauchsanweisung ist der Dura Clone IF Basophil Activation® der Firma Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornien, USA sowohl mit als auch ohne Waschung durchführbar (6). Daher wurde vorab ein erster Versuch (P15) ohne die sonst nach der Erythrozyten-Lyse geplante Waschung durchgeführt. Hier zeigte sich, dass dies zu einer erheblich längeren Analyse-Zeit führte (P15: Auswertung > 1 h; Mittelwert aller anderen Patienten: 25:10 min; siehe Anhang) und die Auswertung aufgrund des nicht ausgewaschenen Zell-Debris deutlich störanfälliger war. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde entschieden, den Dura Clone IF Basophil Activation® für die übrigen Patienten nur mit der optionalen Waschung durchzuführen

Versuchsdurchführung des Dura Clone IF Basophil Activation

Zunächst wurden in die Probenröhrchen zum Leerwert und das Positivkontroll-Röhrchen mit Anti-IgE Antikörper 50 µl Activation Solution gegeben. In Röhrchen Nr. 3 wurden 50 µl der Stimulationskontrolle (Anti-FcεRI mAK) und in die übrigen Röhrchen jeweils 50 µl der in Activation Solution gelösten Allergene gegeben.

Anschließend wurden die Proben für 6-8 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortexer gemischt und es erfolgte die Zugabe von 50 µl Vollblut. Nach kurzer Mischung mithilfe des Vortexers auf mittlerer Stufe wurden die Röhrchen für 25 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Durch Zugabe von 250 µl OptiLyse C und Mischung auf dem Vortexer wurde die Reaktion gestoppt und die Erythrozyten gelöst. Nach zehnminütiger Inkubation im Dunkeln bei Zimmertemperatur (Styroporbox) wurde die Lyse durch Zugabe von 250 µl PBS gestoppt.

Nach weiterer zehnminütiger Inkubation im Dunkeln bei Zimmertemperatur erfolgte die Zugabe von 3 ml PBS und die Röhrchen wurden für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde im Anschluss abgegossen und es erfolgte eine Suspension der Zellen in 300 µl PBS. Bis zur Auswertung am FACS-Gerät wurden die Röhrchen im Dunkeln gelagert.

2.4.5 Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung

Das Prinzip der Auswertung am FACS entspricht auch beim Dura Clone dem in Kapitel 2.3.5 vorgestellten.

Der Dura Clone Basophil Activation IF® der Firma Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornien, USA, benutzt folgende Fluorochrome (6):

- Krome Orange konjugiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes CD45 (CD45-KrO)
- R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7) konjugiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes CD3 (CD3-PC7)
- Alexa Fluor 647 konjugiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes CD294 (CRTH2) (CRTH2-AF647)
- R Phycoerythrin (PE) konjugiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes CD203c (CD203c-PE)
- Pacific Blue konjugiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes CD63 (CD63-PBE)

Das zur Auswertung des Dura Clone benutzte FACSCanto der Firma Becton-Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland, enthielt folgende Laser:

- Laser der Wellenlänge 405 nm (Violett)
- Laser der Wellenlänge 488 nm (Blau)
- Laser der Wellenlänge 633 nm (Rot)

2.4.6 Prinzip der Analyse

Analog zu dem in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Prinzip erfolgte auch beim Dura Clone die Auswertung und Analyse der Zellen durch das Setzen verschiedener Gates und genauere Betrachtung von Subpopulationen. Dadurch, dass der Dura Clone mehr Oberflächenantigene farblich markiert, ergaben sich verschiedene Möglichkeiten, die Population der basophilen Granulozyten zu detektieren.

Folgende Oberflächenantigene werden vom Dura Clone IF Basophil Activation farblich markiert und können daher für die Auswertung benutzt werden (6):

-Material und Methoden-

- CRTH2: Ein Prostaglandin-Rezeptor, der vornehmlich auf Th2-Lymphozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert wird.
- CD3: Ein Oberflächenantigen, das lediglich auf T-Lymphozyten und damit nicht auf Basophilen zu finden ist.
- CD203c: Das Antigen liegt auf basophilen Granulozyten, Mastzellen und CD34+-Progenitorzellen vor. Nach Aktivierung von basophilen Granulozyten wird die Expression hochreguliert, wodurch CD203c auch als Aktivierungsmarker herangezogen werden kann.
- CD63: CD63 liegt auf der Membran der lysosomalen Granula ruhender basophiler Granulozyten vor und wird bei Aktivierung (d.h. lysosomaler Sekretion) an der Zelloberfläche der basophilen Zellen detektierbar. Aus diesem Grund kann CD63 als Aktivierungsmarker im Basophilen-Aktivierungstest dienen.
- CD45: Dieses Oberflächenantigen wird auf allen Leukozyten (Lymphozyten sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten) exprimiert. Auf Erythrozyten und Thrombozyten ist es nicht zu finden.

Ruhende (also nicht-aktivierte) basophile Granulozyten sind demnach CD45+, CD3-, CRTH2+, CD203c+ (schwach positiv bis positiv) und CD63-. Aktivierte basophile Granulozyten dagegen zeigen sich als CD45+, CD3-, CRTH2+, CD203c+ (stark positiv) und CD63+.

In dieser Studie wurden die basophilen Granulozyten auf zwei verschiedene Arten selektiert und auf Aktivierung untersucht. In beiden Fällen wurde aus den im FACS untersuchten Zellen zunächst durch Gegenüberstellung von SSC und Anti-CD45 die Population der Leukozyten separiert (CD45+ mononukleäre Zellen; MNC). Aus diesen konnten dann im Gating von Anti-CD3 zu Anti-CRTH2 direkt die basophilen Granulozyten (CD3- und CRTH2+) gewonnen werden (Abbildung 8 obere Reihe). Alternativ wurden aus den CD45+ MNC in der Auswertung Anti-CD3 zu SSC die Lymphozyten (CD3+) herausgefiltert und in der übrigen Population (CD3-) durch eine Untersuchung auf Anti-CRTH2 und Anti-CD203c die basophilen Granulozyten bestimmt (CRTH2+ und CD203c+) (Abbildung 8 untere Reihe). In beiden Fällen erfolgte die Untersuchung auf Aktivierung durch Gegenüberstellung von Anti-CD63 und Anti-CD203c. Durch Negativ- und Positivkontrollen konnte in einer Quadranten-Analyse ein Quadrant als positiver (aktivierter) Bereich bestimmt werden (Q2). Die Angabe der Aktivierung erfolgte analog zu Kapitel 2.3.6 als relativer Anteil aktivierter basophiler Granulozyten an allen basophilen Granulozyten und wird im Quadranten Q2 als Zahl angegeben.

-Material und Methoden-

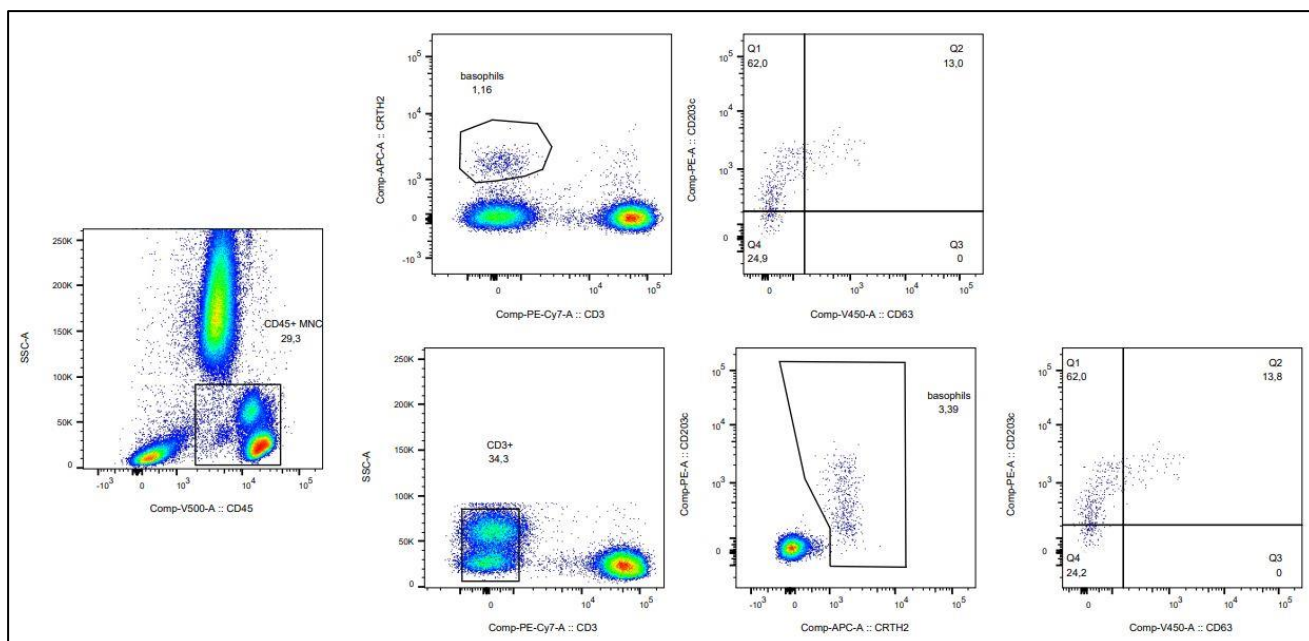


Abbildung 8: Beispiel für eine Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation® (Software: FlowJo; Patient: 200121-P22; Probe: Positivkontrolle mit Anti-IgE); oben: Gating 1 (ohne Verwendung von CD203c); unten: Gating 2 (mit Verwendung von CD203c)

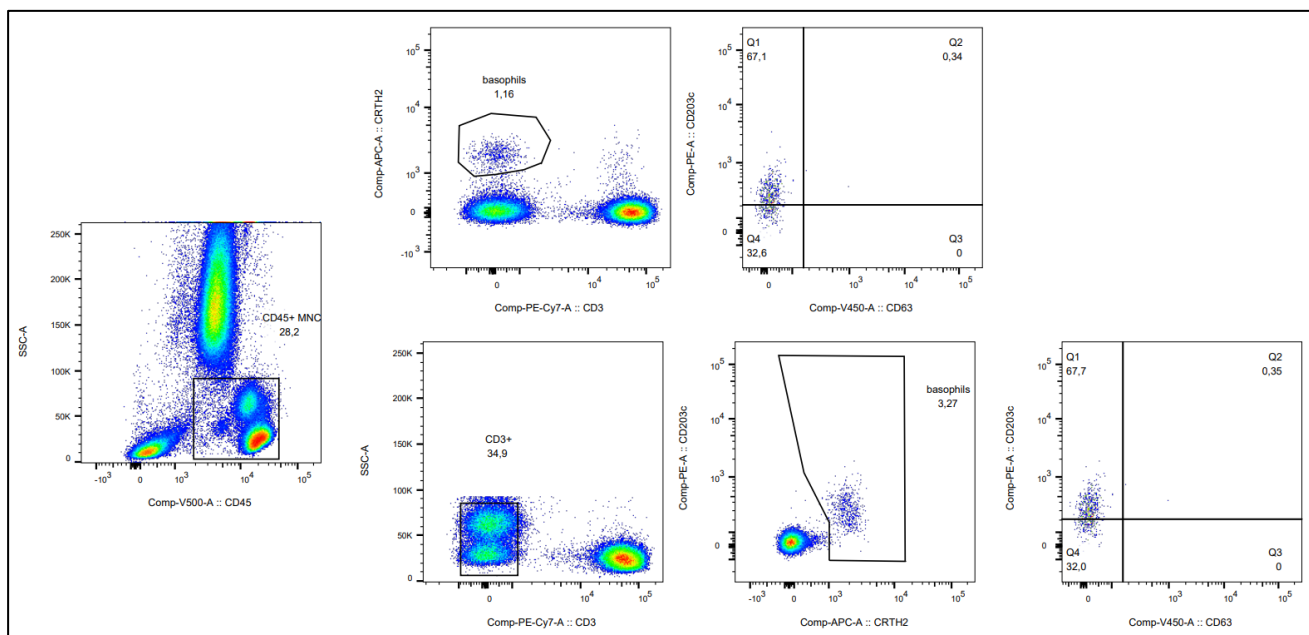


Abbildung 9: Beispiel für eine Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation® (Software: FlowJo; Patient: 200121-P22; Probe: Negativkontrolle); oben: Gating 1 (ohne Verwendung von CD203c); unten: Gating 2 (mit Verwendung von CD203c)

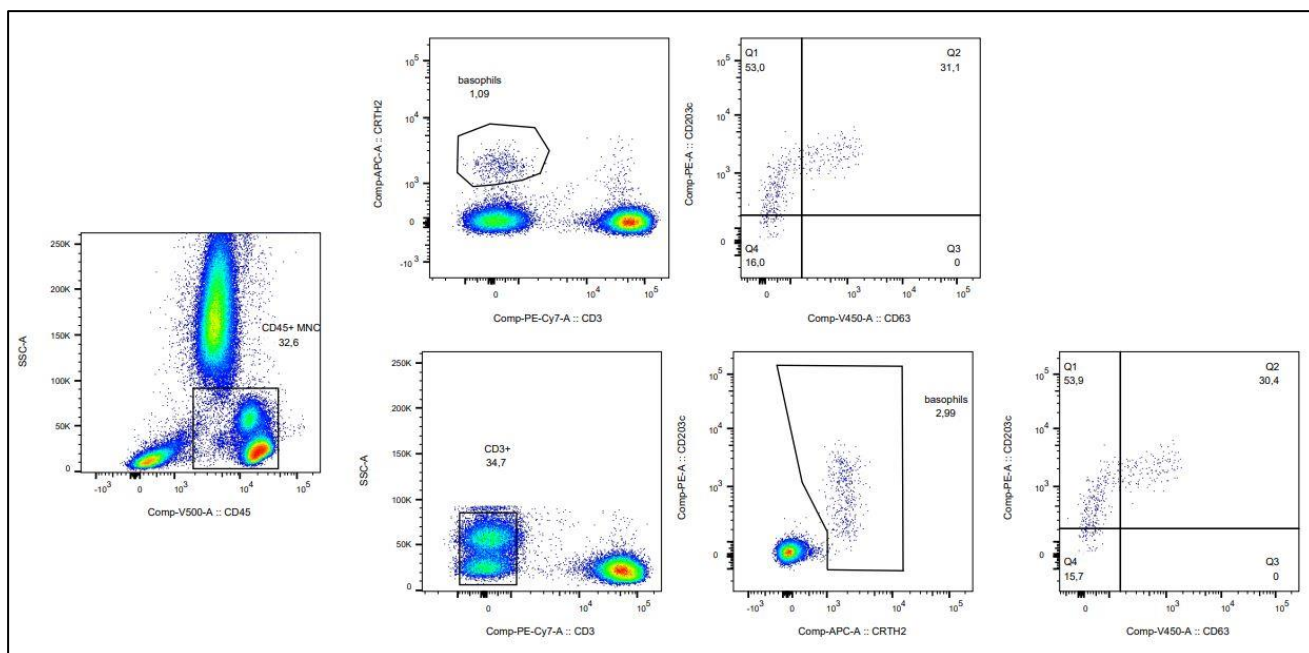


Abbildung 10: Beispiel für eine Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation® (Software: FlowJo; Patient: 200121-P22; Probe: Yellow Jacket Venom in einer Konzentration von 57 ng/ml); oben: Gating 1 (ohne Verwendung von CD203c); unten: Gating 2 (mit Verwendung von CD203c)

2.5 Statistik und Auswertung der Daten

Im Zuge der Auswertung wurden als Parameter der deskriptiven Statistik Maximum, Minimum, Mittelwert und Standardabweichung berechnet. In der Erprobung der homologen Allergene und für den Vergleich der Positivkontrollen der beiden Tests wurden zudem Boxplots mit Median, Minimum, Maximum und den Quartilen erstellt.

Zur Untersuchung der beobachteten Unterschiede in der Aktivierung durch Api m 1 und HBV wurden Zweistichproben T-Tests bei abhängigen Stichproben durchgeführt. Hierbei können Aussagen darüber getroffen werden, ob sich die Mittelwerte der Stichproben signifikant unterscheiden. Zweistichproben T-Tests kamen außerdem im Vergleich der Aktivierungsmarker CD63 und CD203c des Dura Clone IF Basophil Activation® und der Positivkontrollen zum Einsatz.

Für den Vergleich der beiden Test-Kits des Basophilenaktivierungstests erfolgte eine graphische Darstellung mittels Bland-Altman-Plots, die Rückschlüsse auf die Konkordanz zweier Messmethoden zulassen (bei Messungen von Variablen mit stetigen Ausprägungen). Hierbei wird die Differenz der Messwert-Paare auf der Y-Achse gegen den Mittelwert auf der X-Achse

aufgetragen. Zusätzlich wurden der Mittelwert der Differenzen sowie zwei Übereinstimmungsgrenzen ($d \pm 1,96 \times \text{Standardabweichung}$; Limits of Agreement; LOA) als horizontale Linien eingezeichnet. Auf diese Weise können Aussagen über die Streuung der Differenzen getroffen werden (13). Welche LOA als akzeptabel interpretiert werden, richtet sich stets nach der klinischen Fragestellung (51).

Da die Interpretation des BATs eine dichotome Aussage trifft (Aktivierung oberhalb oder unterhalb des Cut-offs), erfolgte außerdem eine Analyse mittels Cohens Kappa. Dieses Maß kann herangezogen werden, um Urteilsübereinstimmungen von Beurteilungen mit nominalen Ausprägungen zu bewerten und damit eine Aussage über die Interrater-Reliabilität zu liefern. Konkret gibt Cohens Kappa Auskunft über das Verhältnis von beobachteten Urteilsübereinstimmungen und der Wahrscheinlichkeit zufälliger Übereinstimmungen (79).

Cohens Kappa kann dabei Werte bis zu $\kappa=1$ annehmen. Dies ist der Fall, wenn beide Methoden in all ihren Urteilen übereinstimmen. Sollten die Übereinstimmungen der Methoden nur dem Ausmaß des mathematischen Zufalls entsprechen, nimmt Cohens Kappa einen Wert von 0 an (79). Die Interpretation von Cohens Kappa kann Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 16: Kategorisierung von Cohens-Kappa-Werten nach Landis/Koch (1977)(80)

| Wert von Cohens Kappa (κ) | Ausmaß der Übereinstimmung |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| < 0,00 | schlecht („poor“) |
| 0,00 - 0,20 | etwas („slight“) |
| 0,21–0,40 | ausreichend („fair“) |
| 0,41–0,60 | mittelmäßig („moderate“) |
| 0,61–0,80 | beachtlich („substantial“) |
| 0,81–1,0 | (fast) vollkommen („almost perfect“) |

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen IBM SPSS Statistics 20, GraphPad Prism 9 und Microsoft Office Excel 365. Sie wurde unterstützt durch das Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (Frau Birgit Waschulzik).

3 Ergebnisse

3.1 Erprobung homologer Allergene im Flow CAST®

3.1.1 Probandenkollektiv

Für die Erprobung der homologen Allergene von *Apis mellifera*, *Polistes dominula* und *Vespula spp.* wurden 21 Patienten in die Studienpopulation eingeschlossen. Die Patienten waren zwischen 22 und 74 Jahre alt. 13 Personen waren Frauen (Alter: 23-74 Jahre) und acht Personen waren Männer (Alter: 22-64 Jahre).

Der Altersmedian lag bei 49 Jahren (Frauen: 48 Jahre; Männer: 52 Jahre), der Mittelwert betrug 47,9 Jahre (Frauen: 48,4 Jahre; Männer: 47 Jahre) bei einer Standardabweichung von 14,3 Jahren (Frauen: 14,8 Jahre; Männer: 13,5 Jahre) (vgl. klinische Daten im Anhang).

3.1.2 Klinische Charakterisierung der Probanden

Diagnostizierte Allergie

Sieben Patienten hatten eine bestätigte Bienengiftallergie, von denen vier Patienten (P4, P7, P19 und P21) zusätzlich eine klinisch nicht relevante Sensibilisierung auf Wespengift zeigten. Bei sieben Patienten konnte die Diagnose einer Wespengiftallergie gestellt werden. Bei einem dieser Patienten (P10) lag neben der Wespengiftallergie im spezifischen IgE eine Sensibilisierung auf Bienengift vor, die aber keine klinische Relevanz hatte.

Bei sieben Patienten (P2, P5, P6, P15, P16, P18 und P20) lag eine genuine Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift mit klinisch relevanter Allergie auf beide Insektenarten vor. Hierbei waren bei einem Patienten (P6) ein Stichereignis durch eine Hornisse und eine damit vorliegende Hornissengiftallergie Ausgang für die weiterführende Allergiediagnostik. Diese bestätigte neben einer bereits bekannten Wespengiftallergie im Verlauf der Studie das Vorliegen einer Bienengiftallergie, womit der Patient in der finalen Auswertung der Studie als Wespen- und Bienengiftallergiker klassifiziert wurde. Einer der genuin doppelsensibilisierten Patienten (P16) hatte 18 Jahre zuvor bereits erfolgreich eine Hyposensibilisierung gegen Wespengift absolviert (vgl. klinische Daten im Anhang).

Schweregrad der Anaphylaxie nach Ring und Messmer

Bei allen Patienten wurde aufgrund der vorliegenden Hymenopterenengiftallergie und der in der Vergangenheit nach bisherigen Stichereignissen aufgetretenen Anaphylaxie die Indikation zur Hyposensibilisierung gestellt oder sie befanden sich bereits innerhalb des ersten Jahres der Therapie. Vier Patienten (P10, P11, P20 und P21) wurden ausgehend von ihren Symptomen nach vergangenen Stichereignissen dem Anaphylaxie Grad I nach Ring und Meßmer zugeordnet, zehn Patienten (P1, P4, P5, P9, P12, P14, P15, P16, P19) dem Anaphylaxie Grad II und vier (P2, P6, P7, P8) dem Anaphylaxie Grad III. Bei den übrigen drei Patienten war die Zuordnung anhand anamnestisch erhobener Symptome nicht eindeutig. Hiervon fielen zwei (P3 und P13) zwischen die Anaphylaxie Grade II und III und ein Patient (P17) zwischen die Anaphylaxie Grade III und IV (vgl. klinische Daten im Anhang).

Intrakutan-Testung

Bei allen Patienten wurde eine Intrakutan-Testung mit Bienen- und Wespengift durchgeführt. Die Ergebnisse waren konkordant mit der späteren Allergiediagnose. Daneben fiel bei einem Patienten (P4) die Testung positiv für Wespengift aus, auf das er sensibilisiert war, aber klinisch keine Allergie zeigte. Der Patient, der 18 Jahre zuvor eine Hyposensibilisierung gegen Wespengift absolviert hatte (P16), zeigte in der intrakutanen Testung ein negatives Ergebnis auf Wespengift. In insgesamt sechs Fällen (P2, P4, P5, P15, P18, P20) lag ein doppelpositives Ergebnis der intrakutanen Testung vor (vgl. klinische Daten im Anhang).

Spezifisches IgE

Mittels des Immuno-CAP-Systems oder des Immulite 2000 XPi wurde bei allen Patienten das Vorliegen von spezifischem IgE auf Bienen- bzw. Wespengift und rekombinanter Allergene untersucht. Hierbei erfolgte je nach Konzentration von spezifischem IgE eine Einteilung in die CAP-Klassen 0 bis 6 (vgl. Tabelle 6 aus Kapitel 2.2.3). 15 Patienten wiesen spezifisches IgE gegen Bienengift (Klasse 2: n=4, Klasse 3: n=5, Klasse 4: n=3 und Klasse 6: n=3) und 17 spezifisches IgE gegen Wespengift (Klasse 1: n=1, Klasse 2: n=8, Klasse 3: n=6, Klasse 4: n=1 und Klasse 5: n=1) auf. Bei einem dieser Patienten (P21) handelte es sich dabei um eine klinisch nicht relevante Sensibilisierung auf Wespengift (keine klinische Ausprägung einer Wespengiftallergie). Analog dazu war bei einem Patienten (P10) die Sensibilisierung auf Bienengift klinisch nicht relevant.

Bei zwölf Patienten lag spezifisches IgE gegen das rekombinante Allergen Api m 1 (Klasse 1: n=2, Klasse 2: n=4, Klasse 3: n=3, Klasse 4: n=2, Klasse 6: n=1), bei elf Patienten gegen Api m 2

(Klasse 1: n=1, Klasse 2: n=4, Klasse 3: n=3, Klasse 4: n=2, Klasse 5: n=1) und bei sieben Patienten gegen Api m 3 (Klasse 1: n=1, Klasse 2: n=3, Klasse 3: n=2, Klasse 4: n=1) vor. Gegen Api m 5 waren zehn Patienten (Klasse 1: n=2, Klasse 2: n=4, Klasse 3: n=4) und gegen Api m 10 waren sieben Patienten (Klasse 2: n=3, Klasse 3: n=3, Klasse 4: n=1) sensibilisiert. Bei einem Patienten (P11) wurden Antikörper gegen Api m 2 und Api m 5, nicht aber gegen das Bienengift nachgewiesen.

Unter den 14 Patienten mit der finalen Diagnose Bienengiftallergie (P2, P4, P5, P6, P7, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20 und P21) zeigten alle spezifisches IgE gegen Bienengift, zwölf gegen Api m 1 und zehn gegen Api m 2. Von den Patienten mit ausschließlicher Bienengiftallergie wies einer (P21) spezifisches IgE gegen Ves v 1 und einer (P14) gegen Ves v 5 auf.

Bei neun Patienten lag spezifisches IgE gegen das rekombinante Allergen Ves v 1 (Klasse 1: n=1, Klasse 2: n=5, Klasse 3: n=2, Klasse 4: n=1) und bei 13 Patienten gegen Ves v 5 (Klasse 1: n=1, Klasse 2: n=4, Klasse 3: n=7, Klasse 5: n=1) vor. Bei zwei Patienten (P3 und P14) wurden dabei Antikörper gegen Ves v 5, nicht aber gegen Wespengift nachgewiesen.

Unter den 14 Patienten mit der finalen Diagnose Wespengiftallergie (P1, P2, P3, P5, P6, P8, P9, P10, P11, P12, P15, P16, P18, P20) zeigten 13 spezifisches IgE gegen Wespengift, acht gegen Ves v 1 und zwölf gegen Ves v 5. Von den Patienten mit alleiniger Wespengiftallergie wiesen zwei (P2, P11) spezifisches IgE gegen Api m 2 vor.

Sieben Patienten wiesen außerdem spezifisches IgE gegen MUXF3 CCD auf, von denen bei drei (P4, P7 und P19) die Diagnose einer Bienengiftallergie mit klinisch nicht relevanter Sensibilisierung gegen Wespengift gestellt wurde (vgl. klinische Daten im Anhang).

Weitere Befunde

Bei einem Patienten (P6) lag eine Mastozytose vor, die auch im Immuno-CAP-System durch einen erhöhten Tryptase-Wert von 36,6 IU/ml auffiel. Drei Patienten (P12, P14 und P18) litten zusätzlich an einer Rhinokonjunktivitis allergica saisonalis, von denen einer (P12) in der Vergangenheit außerdem allergisch auf Penicillin und Chinolone reagiert hatte. Ein weiterer Patient (P20) gab in der Anamnese eine Nussallergie mit oralem Allergiesyndrom an.

3.1.3 Auswertung des Flow CAST®

Zur Auswertung der Ergebnisse des Basophilenaktivierungstests wurden für die Negativ- und Positivkontrollen und die Allergene Cut-off-Werte festgelegt. Eine Voraussetzung für das

Vorliegen eines gültigen BATs war eine Negativkontrolle unterhalb von 5 % und Stimulationskontrollen über 10 %. Dies entspricht den Cut-Off-Werten, die auch in der klinischen Diagnostik verwendet werden. Für das HBV und YJV wurden die vom Hersteller Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz vorgeschlagenen Cut-offs von 10 % berücksichtigt, auch die Cut-offs für die übrigen Allergene wurden auf > 10 % festgelegt.

Vor diesem Hintergrund schieden zwei der Patienten (P7 und P17) aus der Studie aus. Sie zeigten im Basophilenaktivierungstest keine Reaktion auf die Positivkontrolle Anti-FcεRI mAK oberhalb des definierten Cut-offs von 10 % (P7: 7,4 % und P17: 4,4 %). Als Non-Responder wurden sie daher in der Auswertung der Ergebnisse des BATs nicht berücksichtigt.

3.1.4 Phospholipasen Api m 1 und PDV PLA2

3.1.4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Zur Testung der Phospholipasen A2 der *Apis mellifera* (Api m 1) und *Polistes dominula* (PDV PLA2) wurde eine Studienpopulation gebildet, in die Wespengiftallergiker und Bienengiftallergiker mit Sensibilisierung auf Api m 1 eingeschlossen wurden. Insgesamt waren in dieser Gruppe 18 Patienten. Acht von diesen (P1, P2, P3, P8, P9, P10, P11, P12) waren lediglich auf Wespengift allergisch bzw. zeigten trotz Bienengiftallergie keine Sensibilisierung auf Api m 1. Sie werden im weiteren Verlauf als YJV-only-Gruppe bezeichnet. Die übrigen zehn Patienten (P4, P5, P6, P13, P14, P15, P16, P18, P19, P21) waren entweder Bienengiftallergiker (P4, P13, P14, P19, P21) oder gegen Bienen- und Wespengift genuin doppelsensibilisierte Patienten (P5, P6, P15, P16, P18) mit einer Sensibilisierung gegen Api m 1. Daher wird diese im Folgenden als Api m 1-Gruppe bezeichnet.

Die gemessenen Leerwerte aller eingeschlossenen Patienten betrug im Mittel (\pm Standardabweichung; SD) 1,0 (\pm 0,8) % (YJV-only-Gruppe: 0,8 (\pm 0,7) %; Api m 1-Gruppe: 1,2 (\pm 0,7) %). Die Aktivierung durch die spezifische Stimulationskontrolle Anti-FcεRI mAK lag bei 82,0 (\pm 17,8) % (YJV-only-Gruppe: 88,7 (\pm 10,1) %; Api m 1-Gruppe: 76,7 (\pm 20,6) %) und durch fMLP bei 43,1 (\pm 18,7) % (YJV-only-Gruppe: 43,1 (\pm 16,4) %; Api m 1-Gruppe: 43,1 (\pm 20,4) %).

In der YJV-only-Gruppe zeigten alle Patienten eine Aktivierung auf YJV oberhalb des Cut-offs von 10 %. Die mittlere Aktivierung betrug 77,5 (\pm 14,0) %. Lediglich P2 reagierte bei einer

bekannten HBV-Allergie positiv auf das HBV (Aktivierung von 35,1 %; mittlere Aktivierung der übrigen Patienten 1,1 (\pm 1,4) %).

In der Api m 1-Gruppe zeigten drei Patienten (P13, P14, P15) trotz Vorliegen einer Bienengiftallergie keine Aktivierung oberhalb des Cut-offs für HBV. Ein genuin doppelsensibilisierter Patient (P18) reagierte weder gegen HBV noch gegen YJV. Bei P4 und P21, die eine klinisch nicht relevante Sensibilisierung gegen Wespengift ohne Allergie vorwies, betrug die Aktivierungen durch YJV 11,6 % (P4) bzw. 22,8 % (P21). Bei den übrigen Patienten waren die Aktivierungen durch HBV und YJV konkordant zur vorliegenden Allergie. Insgesamt zeigten sechs Patienten (P4, P5, P6, P16, P19 und P21) für HBV und sechs Patienten (P4, P5, P6, P15, P16, P21) für YJV Werte oberhalb des Cut-offs (vgl. Ergebnisse im Anhang).

3.1.4.2 Phospholipase Api m 1 (von *Apis mellifera*)

Innerhalb der YJV-only-Patienten führte eine Stimulierung mit Api m 1 bei keinem der Patienten mit reiner Wespengiftallergie zu einer Aktivierung oberhalb des Schwellenwerts (mittlere Aktivierung über alle Konzentrationen (\pm SD): 1,3 (\pm 1,5) %). Lediglich Patient P2, der eine genuine HBV-/YJV-Doppelsensibilisierung (ohne sIgE auf Api m 1) aufwies, zeigte Aktivierungen durch Api m 1 oberhalb des Cut-offs (mittlere Aktivierung (\pm SD): 48,6 (\pm 17,0) % mit der höchsten Aktivierung (71,0 %) bei einer Konzentration von 1000 ng/ml (Abb. 11).

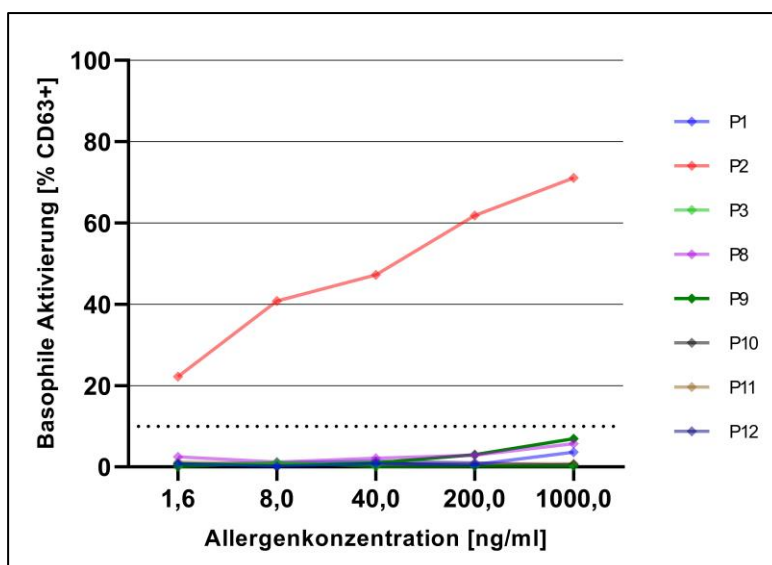


Abbildung 11: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 1 bei Wespengiftallergikern und Bienengiftallergikern ohne Api m 1-Sensibilisierung (YJV-only-Gruppe)

In der Api m 1-Gruppe dagegen wurden über alle Konzentrationen hinweg bei 8 von 10 Patienten Aktivierungen oberhalb des Schwellenwerts gemessen. Zwei der Patienten (P13 und P18) zeigten keinerlei Aktivierung auf Api m 1. Bei beiden lagen auch negative Werte für HBV vor (Abb.12).

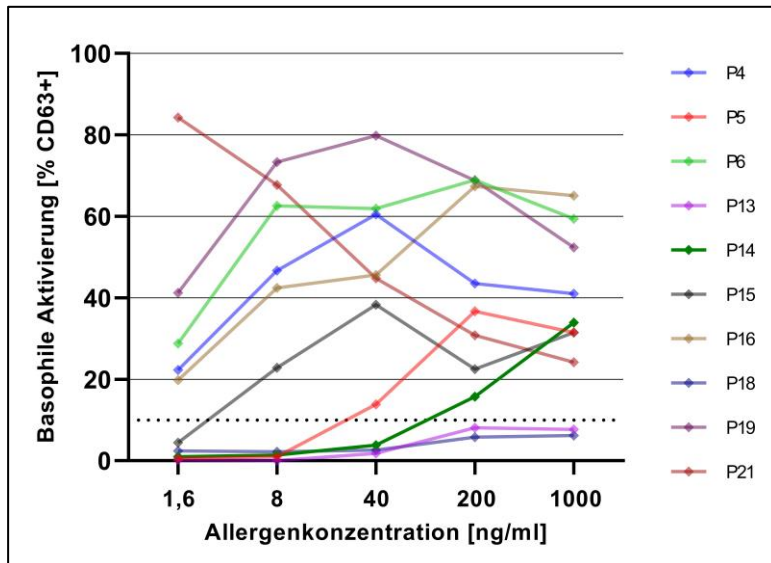


Abbildung 12: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 1 bei Api m 1-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 1-Gruppe)

Die Mittelwerte für die einzelnen Konzentrationen betragen: 35,3 (\pm 18,9) % bei 1000 ng/ml, 36,8 (\pm 23,5) % bei 200 ng/ml, 35,3 (\pm 26,8) % bei 40 ng/ml, 32,0 (\pm 28,5) % bei 8 ng/ml, 20,5 (\pm 25,2) % bei 1,6 ng/ml. In Abbildung 13 sind die gemessenen Aktivierungen für die einzelnen Konzentrationen in einem Boxplot veranschaulicht.

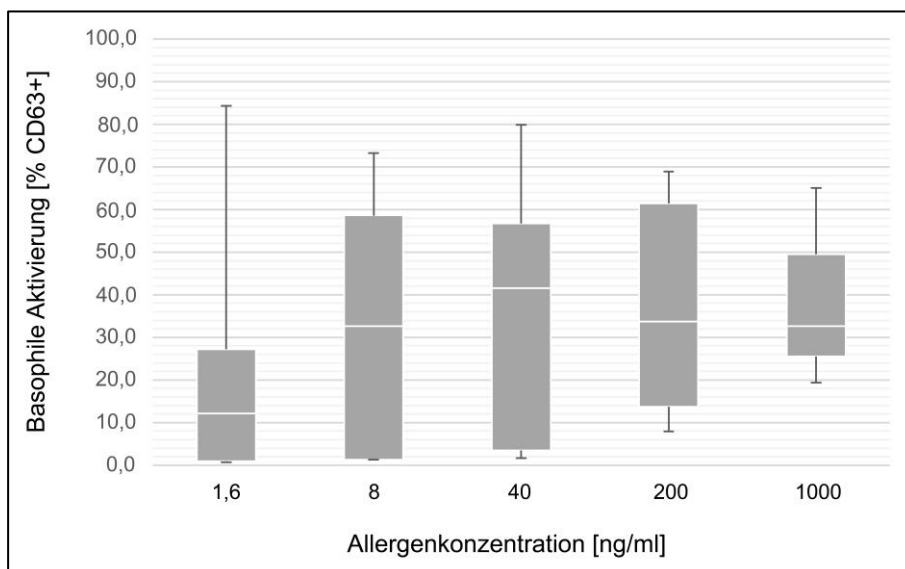


Abbildung 13: Verteilung der gemessenen basophilen Aktivierung durch aufsteigende Konzentrationen von Api m 1 in der Api m 1-Gruppe mit Median (weiße Linie), Minimum, Maximum und Quartilen

3.1.4.3 Phospholipase PDV PLA2 (von *Polistes dominula*)

Eine Stimulierung mit PDV PLA2 führte bei keinem der YJV-only-Patienten zu Aktivierungen oberhalb des Cut-offs (Mittelwerte: 1,4 (\pm 1,0) % bei 1000 ng/ml, 0,8 (\pm 1,2) % bei 200 ng/ml, 1,0 (\pm 0,9) % bei 40 ng/ml, 0,7 (\pm 1,0) % bei 8 ng/ml, 0,9 (\pm 1,2) % bei 1,6 ng/ml) (Abb. 14).

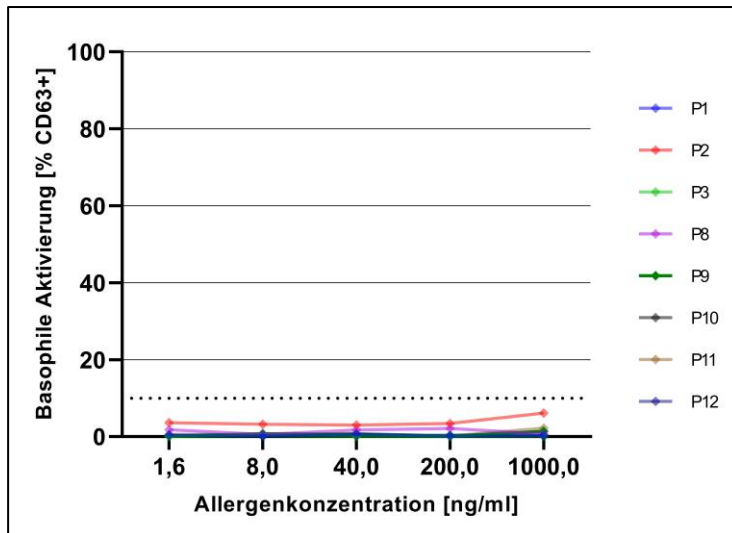


Abbildung 14: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von PDV PLA2 bei Wespengiftallergikern und Bienengiftallergikern ohne Api m 1-Sensibilisierung (YJV-only-Gruppe)

In der Api m 1-Gruppe betragen die mittleren Aktivierungen durch PDV PLA2 1,9 (\pm 3,0) % bei 1000 ng/ml, 0,9 (\pm 0,6) % bei 200 ng/ml, 1,2 (\pm 1,0) % bei 40 ng/ml, 0,9 (\pm 0,8) % bei 8 ng/ml, 1,2 (\pm 1,1) % bei 1,6 ng/ml. Sie lagen damit ebenfalls unterhalb des Cut-offs. Lediglich ein Patient reagierte mit 10,75 % auf die höchste Konzentration von PDV PLA2 (1000 ng/ml) (Abb.15).

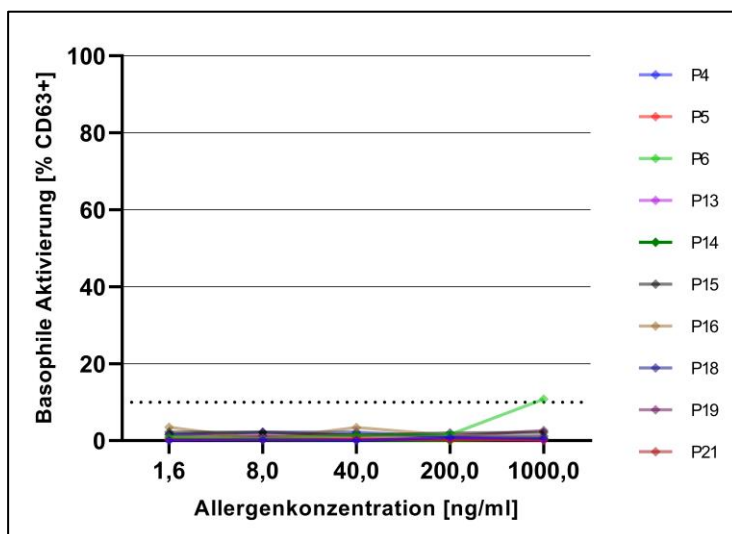


Abbildung 15: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von PDV PLA2 bei Api m 1-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 1-Gruppe)

3.1.5 Hyaluronidasen Api m 2, Ves v 2b und Pol d 2

3.1.5.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Zur Testung der Hyaluronidasen der *Apis mellifera* (Api m 2), *Vespula spp.* (Ves v 2b) und *Polistes dominula* (Pol d 2) wurde eine Studienpopulation gebildet, in die Wespengiftallergiker und Bienengiftallergiker mit Sensibilisierung auf Api m 2 eingeschlossen wurden. Insgesamt waren in dieser Gruppe 17 Patienten. Sieben von diesen (P1, P3, P8, P9, P10, P11, P12) waren lediglich auf Wespengift allergisch und entsprechen der YJV-only-Gruppe aus Kapitel 3.1.4. Die übrigen 10 Patienten (P2, P4, P5, P6, P13, P14, P15, P18, P19, P20) waren entweder Bienengiftallergiker (P4, P13, P14, P19) oder gegen Bienen- und Wespengift genuin doppelsensibilisierte Patienten (P2, P5, P6, P15, P18, P20) und wiesen alle eine Sensibilisierung gegen Api m 2 auf. Daher werden diese Patienten im Folgenden als Api m 2-Gruppe bezeichnet.

Die gemessenen Leerwerte aller eingeschlossenen Patienten betragen im Mittel (\pm SD) 0,8 (\pm 1,0) % (YJV-only-Gruppe: 0,7 (\pm 0,7) %; Api m 2-Gruppe: 1,5 (\pm 1,1) %). Die Aktivierung durch die spezifische Stimulationskontrolle Anti-Fc ϵ RI mAK lag bei 79,6 (\pm 21,5) % (YJV-only-Gruppe: 88,2 (\pm 10,7) %; Api m 2-Gruppe: 73,6 (\pm 24,8) %) und durch fMLP bei 41,9 (\pm 15,9) % (YJV-only-Gruppe: 39,3 (\pm 13,8) %; Api m 2-Gruppe: 43,8 (\pm 17,0) %).

In der Api m 2-Gruppe zeigten vier Patienten (P13, P14, P15, P20) trotz Vorliegen einer Bienengiftallergie keine Aktivierung oberhalb des Cut-offs für HBV. Einer der genuin doppelsensibilisierten Patienten (P18) reagierte weder gegen HBV noch gegen YJV. Bei P4, der eine klinisch nicht relevante Sensibilisierung gegen Wespengift ohne Allergie vorwies, betrug die Aktivierung durch YJV 11,6 %. Bei den übrigen Patienten dieser Gruppe waren die Aktivierungen durch HBV und YJV konkordant zur vorliegenden Allergie. Insgesamt zeigten fünf Patienten (P2, P4, P5, P6 und P19) für HBV und sechs Patienten (P2, P4, P5, P6, P15 und P20) für YJV Werte oberhalb des Cut-offs (vgl. Ergebnisse des Flow CAST® im Anhang).

3.1.5.2 Hyaluronidase Api m 2 (von *Apis mellifera*)

Bei sechs der sieben Patienten in der YJV-only-Gruppe zeigte eine Stimulation mit Api m 2 keine Aktivierung der Basophilen oberhalb des Cut-offs. Die mittlere Aktivierung in der gesamten YJV-only-Gruppe lag bei 3,3 (\pm 8,1) %. Bei P11 kam es ab einer Konzentration von 40 ng/ml zu einer Aktivierung oberhalb des Cut-offs. Dieser Patient zeigte auch im spezifischen IgE eine Sensibilisierung gegen Api m 2, es lag jedoch klinisch keine Bienengiftallergie vor. Über alle

Konzentrationen hinweg lag bei diesem Patienten der Mittelwert der Aktivierung (\pm SD) bei 17,9 (\pm 14,4) % (Abb. 16).

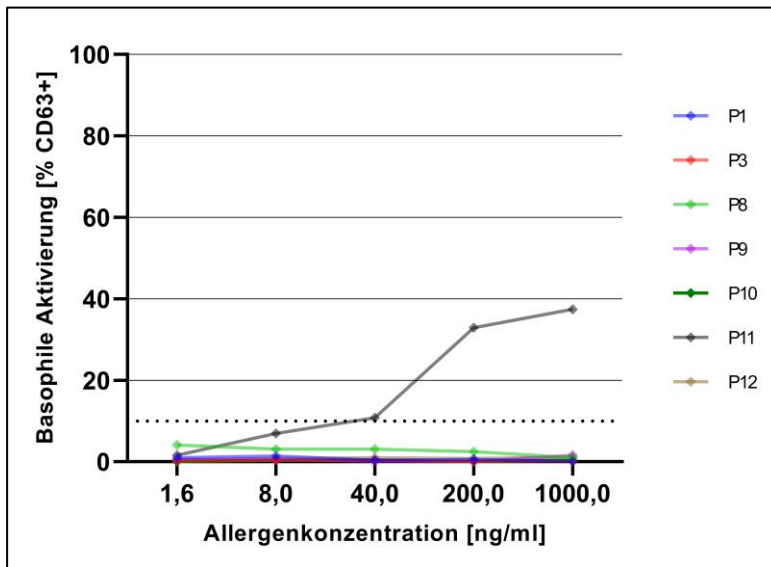


Abbildung 16: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 2 bei Wespengiftallergikern (YJV-only-Gruppe)

Von den Patienten der Api m 2-Gruppe kam es bei sechs von zehn Patienten zu einer Aktivierung durch Api m 2 (P2, P5, P14, P15, P19, P20). Von den Patienten, die keine Aktivierung durch eine Stimulation mit Api m 2 zeigten (P4, P6, P13, P18), wiesen zwei (P13 und P18) auch für HBV-Werte unterhalb des Cut-offs auf (Abb. 17).

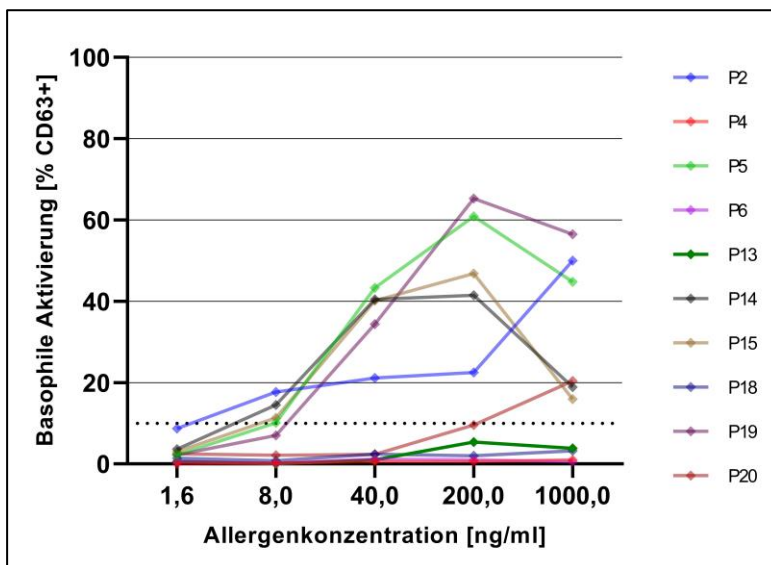


Abbildung 17: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 2 bei Api m 2-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 2-Gruppe)

Die mittleren Aktivierungen der Api m 2-Gruppe für die einzelnen Konzentrationen betragen: 21,5 (\pm 20,3) % bei 1000 ng/ml, 25,6 (\pm 24,5) % bei 200 ng/ml, 18,7 (\pm 18,1) % bei 40 ng/ml, 6,4 (\pm 6,3) % bei 8 ng/ml, 2,5 (\pm 2,3) % bei 1,6 ng/ml. In Abbildung 18 sind die gemessenen Aktivierungen für die einzelnen Konzentrationen in einem Boxplot veranschaulicht.

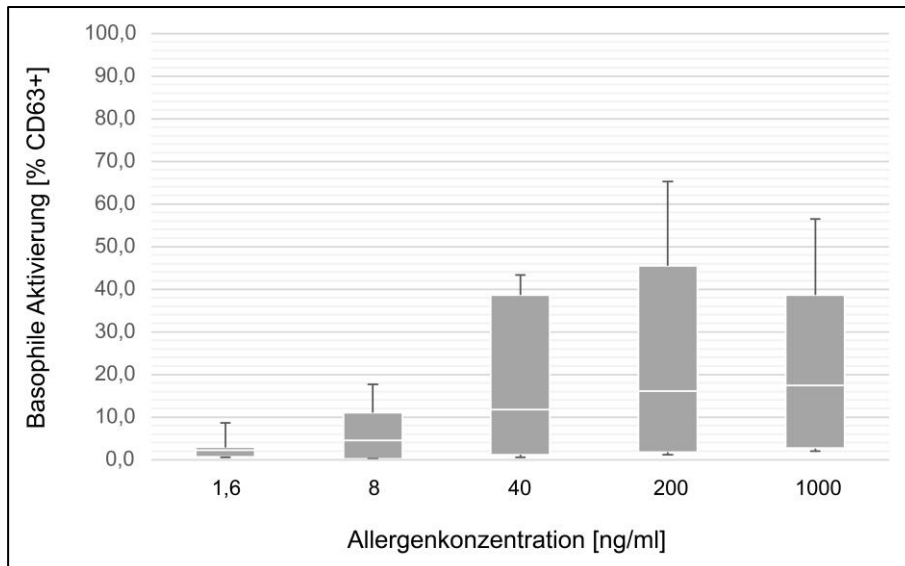


Abbildung 18: Verteilung der gemessenen basophilen Aktivierung durch aufsteigende Konzentrationen von Api m 2 in der Api m 2-Gruppe mit Median (weiße Linie), Minimum, Maximum und Quartilen

3.1.5.3 Hyaluronidase Ves v 2b (von *Vespula spp.*)

Weder in der YJV-only-Gruppe noch in der Api m 2-Gruppe führten Stimulationen mit Ves v 2b zu einer Aktivierung oberhalb des Cut-offs. Die mittleren Aktivierungen durch Ves v 2b betragen in der YJV-only-Gruppe 1,2 (\pm 0,9) % bei 1000 ng/ml, 0,9 (\pm 0,4) % bei 200 ng/ml, 0,8 (\pm 0,6) % bei 40 ng/ml, 0,8 (\pm 0,9) % bei 8 ng/ml, 1,3 (\pm 1,9) % bei 1,6 ng/ml, in der Api m 2-Gruppe 3,1 (\pm 2,8) % bei 1000 ng/ml, 1,5 (\pm 1,3) % bei 200 ng/ml, 1,4 (\pm 0,8) % bei 40 ng/ml, 1,1 (\pm 1,1) % bei 8 ng/ml und 0,8 (\pm 0,6) % bei 1,6 ng/ml.

Es kam lediglich bei einigen Patienten zu geringfügigen Aktivierungen zwischen 5 und 10 %. So betrug in der YJV-only-Gruppe der höchste Wert 5,8 % (P8 bei 1,6 ng/ml) und in der Api m 2-Gruppe 9,5 % (P6 bei 1000 ng/ml). Daneben erreichten in dieser Gruppe zwei weitere Patienten für die höchste Konzentration Werte oberhalb von 5 % (P2: 5,3 %, P19: 5,6%) (Abbildungen 19 und 20).

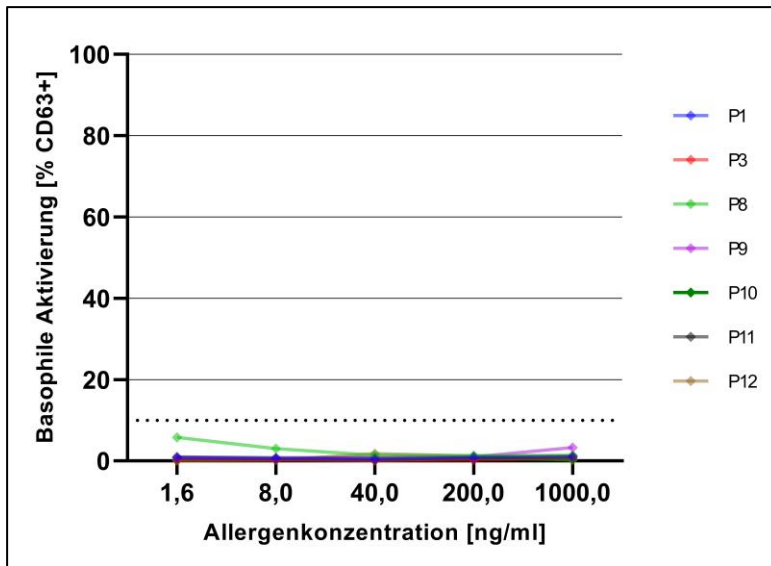


Abbildung 19: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Ves v 2b bei Wespengiftallergikern (YJV-only-Gruppe)

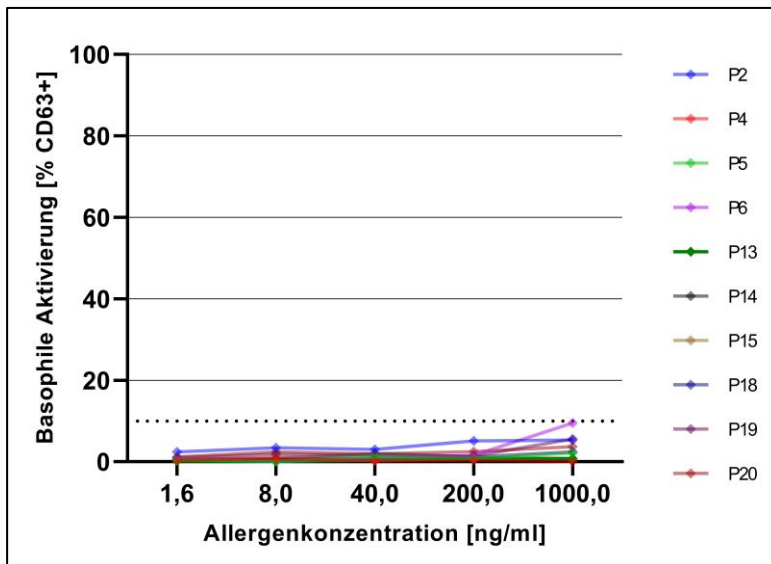


Abbildung 20: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Ves v 2b bei Api m 2-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 2-Gruppe)

3.1.5.4 Hyaluronidase Pol d 2 (von *Polistes dominula*)

Bei keinem der untersuchten Patienten kam es durch Stimulation mit Pol d 2 zu einer Aktivierung oberhalb des Cut-offs. Die mittlere Aktivierung (\pm SD) lag bei 1,3 (\pm 1,5) %. Die mittleren Aktivierungen durch Pol d 2 betragen in der YJV-only-Gruppe 1,3 (\pm 1,3) % bei 1000 ng/ml, 0,6 (\pm 0,7) % bei 200 ng/ml, 0,9 (\pm 1,0) % bei 40 ng/ml, 1,1 (\pm 1,1) % bei 8 ng/ml, 0,9 (\pm 0,9) %

– Ergebnisse –

bei 1,6 ng/ml, in der Api m 2-Gruppe 2,8 (\pm 2,7) % bei 1000 ng/ml, 1,7 (\pm 1,5) % bei 200 ng/ml, 1,2 (\pm 0,8) % bei 40 ng/ml, 1,2 (\pm 1,0) % bei 8 ng/ml und 1,0 (\pm 0,8) % bei 1,6 ng/ml.

Lediglich in der Gruppe der Api m 2-sensibilisierten Patienten kam es bei drei Patienten bei der höchsten Konzentration (1000 ng/ml) zu geringfügigen Aktivierungen zwischen 5 und 10 % (P2: 6,0%, P5: 6,9%, P6: 7,6%). Unter den YJV-only-Patienten lag der höchste erreichte Wert bei 4,3 % (P9 bei 1000 ng/ml) (Abbildungen 21 und 22).

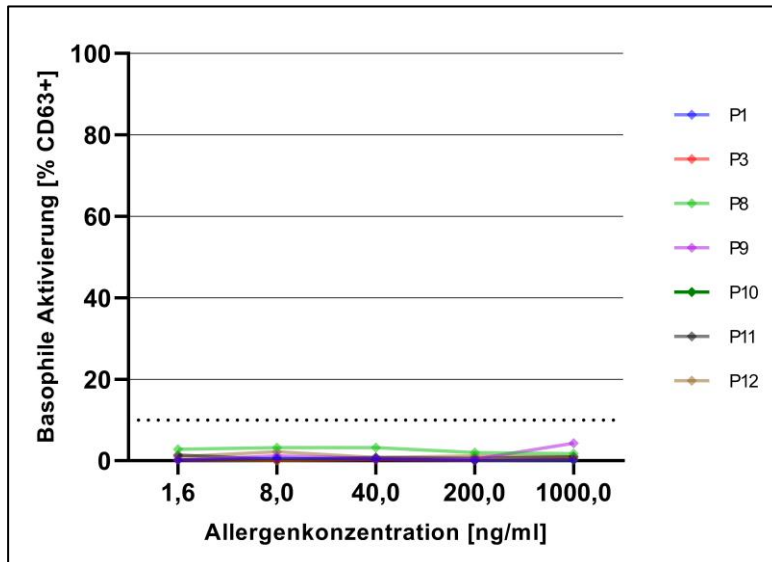


Abbildung 21: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Pol d 2 bei Wespengiftallergikern (YJV-only-Gruppe)

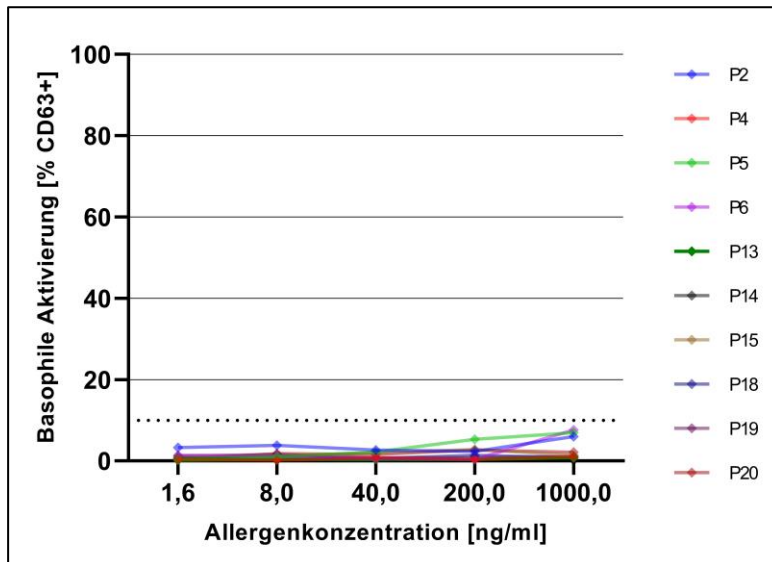


Abbildung 22: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Pol d 2 bei Api m 2-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 2-Gruppe)

3.1.6 Aktivierung durch rApi m 1 im Vergleich zum Gesamtextrakt des Bienengifts

In der Api m 1-Gruppe reagierten alle Patienten stärker auf individuelle Konzentrationen von Api m 1 als auf HBV in einer Standardkonzentration von 284 ng/ml. In Tabelle 17 sind alle Werte der Aktivierung durch HBV und Api m 1 aufgeführt und markiert, für welche Konzentrationen die Aktivierung durch Api m 1 höher als für HBV ausfiel.

Tabelle 17: Vergleich der basophilen Aktivierung durch Stimulation mit HBV und Api m 1 in der Api m 1-Gruppe

| | | P4 | P5 | P6 | P13 | P14 | P15 | P16 | P18 | P19 | P21 |
|----------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Konz. [ng/ml] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] | Akt. [%] |
| HBV | 284 | 33,5 | 24,5 | 65,3 | 1,0 | 5,0 | 7,7 | 47,6 | 2,6 | 52,9 | 82,8 |
| Api m 1 | 1000 | 41,0 | 31,5 | 59,4 | 7,7 | 33,9 | 31,5 | 65,1 | 6,2 | 52,4 | 24,2 |
| | 200 | 43,5 | 36,7 | 68,9 | 8,1 | 15,7 | 22,5 | 67,4 | 5,8 | 68,8 | 30,8 |
| | 40 | 60,5 | 13,8 | 61,9 | 1,8 | 3,8 | 38,3 | 45,6 | 2,6 | 79,8 | 44,8 |
| | 8 | 46,7 | 1,0 | 62,6 | 0,0 | 1,4 | 22,8 | 42,4 | 2,2 | 73,3 | 67,7 |
| | 1,6 | 22,3 | 0,6 | 28,8 | 0,2 | 1,0 | 4,4 | 19,8 | 2,4 | 41,2 | 84,3 |

Legende: **[fett gedruckt]**: Aktivierung durch Api m 1 > Aktivierung durch HBV

Die mittlere Aktivierung (\pm SD) für HBV lag in der gesamten Gruppe bei 32,3 (\pm 27,5) %, während Api m 1 in einer Konzentration von 200 ng/ml zu einer mittleren Aktivierung (\pm SD) von 36,8 (\pm 23,5) % führte. Zwei Patienten (P14 und P15) zeigten nur für Api m 1 Werte oberhalb des Cut-offs, während HBV hier zu keiner Aktivierung führte (P14: 5,0 % [HBV] und > 10 % [Api m 1; 1000 - 200 ng/ml]; P15: 7,7 % [HBV] und > 10 % [Api m 1; 1000–8 ng/ml]). Daneben führte bei zwei weiteren Patienten (P13 und P18), die negativ auf HBV getestet wurden (P13: 1,0 %; P18: 2,6 %), die Stimulation durch Api m 1 zu einer stärkeren Aktivierung, die jedoch unterhalb des Cut-offs von 10 % blieb (P13: 8,1 % [200 ng/ml]; P18: 6,2 % [1000 ng/ml]) (Abbildung 23).

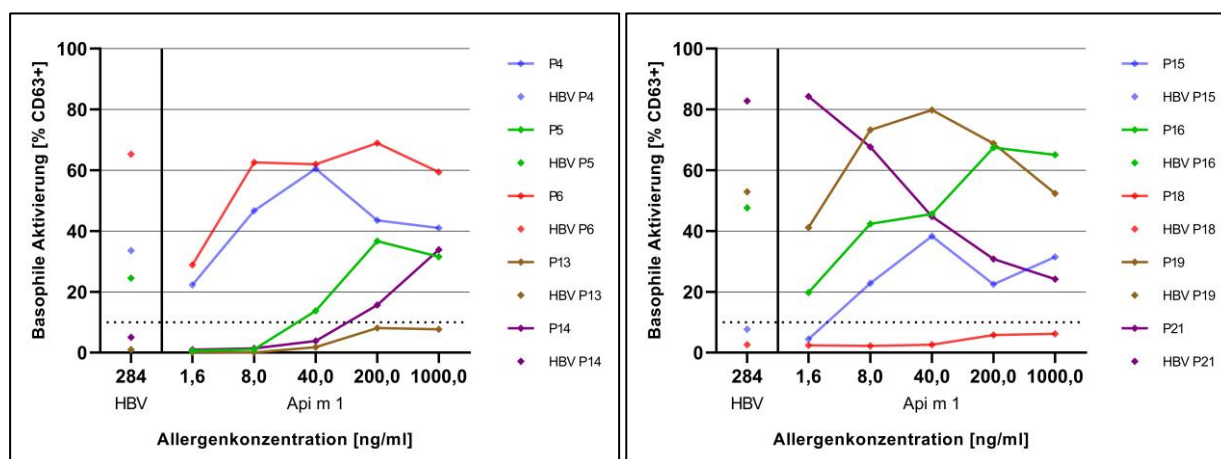


Abbildung 23: Vergleich der basophilen Aktivierung durch Stimulation mit HBV und Api m 1. n=5 (links); n=5 (rechts)

Des Weiteren zeigte auch der HBV-Allergiker P2 eine starke Aktivierung auf Stimulation mit Api m 1 von im Mittel (\pm SD) 48,6 (\pm 17,0) %, obwohl er im sIgE keine Sensibilisierung auf Api m 1 vorwies. Auch diese Aktivierung lag über der Aktivierung durch das HBV in einer Konzentration von 284 ng/ml (35,1 %).

Um zu untersuchen, ob sich die Mittelwerte der einzelnen Api m 1 – Konzentrationen signifikant von den gemessenen Aktivierungen durch HBV unterscheiden, wurden Zweistichproben T-Tests der abhängigen Stichproben durchgeführt (vgl. Tabelle 18). Hier zeigte sich, dass für die Konzentrationen von 1000 ng/ml bis einschließlich 8 ng/ml das Signifikanzniveau größer als 0,05 war. Ebenso lag der T-Wert (T-Statistik) für diese Vergleiche innerhalb des kritischen T-Wertes. Damit können die beobachteten Unterschiede nicht als signifikant gewertet werden. Der T-Test für die Konzentration von 1,6 ng/ml zeigte bei einem Signifikanzniveau von 0,01, dass diese Konzentration von Api m 1 signifikant weniger Aktivierung verursacht als HBV in der Standardkonzentration von 284 ng/ml (Mittelwert (\pm SD) für HBV: 32,3 (\pm 27,5) %; Mittelwert (\pm SD) für Api m 1 (1,6 ng/ml): 20,5 (\pm 25,2) %).

Tabelle 18: Zweistichproben T-Test zur Untersuchung des Unterschieds der gemessenen Aktivierungen durch verschiedene Konzentrationen von Api m 1 und HBV (284 ng/ml)

| | T-Statistik | Kritischer T-Wert | p (einseitig) |
|-------------------------------------|-------------|-------------------|---------------|
| HBV mit Api m 1 (1000 ng/ml) | 0,39 | 1,83 | 0,35 |
| HBV mit Api m 1 (200 ng/ml) | 0,69 | 1,83 | 0,25 |
| HBV mit Api m 1 (40 ng/ml) | 0,46 | 1,83 | 0,33 |
| HBV mit Api m 1 (8 ng/ml) | 0,07 | 1,83 | 0,47 |
| HBV mit Api m 1 (1,6 ng/ml) | 2,82 | 1,83 | 0,01 |

Legende: T-Statistik, Testwert; p, Signifikanzniveau

3.2 Vergleich von Testverfahren für den Basophilenaktivierungstest

3.2.1 Probandenkollektiv

Für den Vergleich des Flow CAST® der Firma Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, und des Dura Clone IF Basophil Activation® der Firma Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornien, USA wurden 17 Patienten in die Studienpopulation eingeschlossen. Die Patienten waren zwischen 28 und 77 Jahre alt. Sechs Personen waren Frauen (Alter: 37-71 Jahre) und elf Personen waren Männer (Alter: 28-77 Jahre).

Der Altersmedian lag bei 54 Jahren (Frauen: 52,5 Jahre; Männer 54 Jahre), der Mittelwert betrug 52,9 Jahre (Frauen: 52,5 Jahre; Männer: 53,2 Jahre) bei einer Standardabweichung von 16,6 Jahren (Frauen: 12,7 Jahre; Männer: 18,3 Jahre) (vgl. klinische Daten im Anhang).

3.2.2 Klinische Charakterisierung

Diagnostizierte Allergie

Vier Patienten (P21, P23, P29 und P 33) hatten eine bestätigte, alleinige Bienengiftallergie und zeigten zusätzlich eine klinisch nicht relevante Sensibilisierung auf Wespengift. Bei sechs Patienten (P22, P26, P27, P28, P30, P31) wurde die Diagnose einer Wespengiftallergie gestellt. Hiervon wiesen zwei Patienten (P26 und P28) daneben auch eine Hornissengiftallergie auf und vier Patienten (P22, P28, P30, P31) zeigten im spezifischen IgE eine Sensibilisierung auf Bienengift, die aber keine klinische Relevanz hatte.

Bei sieben Patienten (P5, P6, P15, P24, P25, P32 und P34) lag eine genuine Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift mit klinisch relevanter Allergie vor. Hiervon litten drei Patienten (P6, P24 und P28) außerdem unter einer Hornissengiftallergie (vgl. klinische Daten im Anhang).

Schweregrade der Anaphylaxie nach Ring und Messmer

Aufgrund der vorliegenden Hymenopteren giftallergie und der in der Vergangenheit nach bisherigen Stichereignissen aufgetretenen anaphylaktischen Symptome lag bei allen Patienten die Indikation zur Hyposensibilisierung vor oder sie befanden sich bereits innerhalb des ersten Jahres der Therapie. Drei Patienten (P21, P24, P34) wurden ausgehend von ihren Symptomen nach vergangenen Stichereignissen dem Anaphylaxie Grad I nach Ring und Meßmer zugeordnet, elf Patienten (P5, P15, P22, P23, P25, P26, P28, P30, P31, P32, P33) dem Anaphylaxie Grad II, zwei

Patienten (P6 und P29) Grad III und ein Patient (P27) dem Grad IV (vgl. klinische Daten im Anhang).

Intrakutan-Testung

Bei allen Patienten wurde eine Intrakutan-Testung mit Bienen- und Wespengift durchgeführt. Die Ergebnisse waren bei zwölf der 17 Patienten konkordant mit der finalen Allergiediagnostik. Daneben fiel bei zwei Patienten die Testung positiv für Bienengift (P28 und P30) bzw. Wespengift (P29 und P33) aus, auf das sie zwar sensibilisiert waren, aber klinisch keine Allergiesymptome zeigten. In insgesamt neun Fällen (P5, P15, P24, P25, P28, P29, P30, P32 und P33) lag ein doppelpositives Ergebnis der intrakutanen Testung vor (vgl. klinische Daten im Anhang).

Spezifisches IgE

Mittels des Immuno-CAP-Systems oder des Immulite 2000 XPi wurde bei allen Patienten das Vorliegen von spezifischem IgE auf Bienen- bzw. Wespengift und rekombinanten Allergenen untersucht und das Ergebnis den CAP-Klassen 0 bis 6 zugeordnet. Alle Patienten wiesen spezifisches IgE gegen Wespengift auf (Klasse 1: n=1, Klasse 2: n=8, Klasse 3: n=5, Klasse 4: n=1 und Klasse 5: n=2) und 16 der 17 Patienten zeigten spezifisches IgE gegen Bienengift (Klasse 1: n=1, Klasse 2: n=5, Klasse 3: n=6, Klasse 4: n=2, Klasse 5: n=1 und Klasse 6: n=1). Lediglich ein Patient (P27) war damit im spezifischen IgE nicht doppelsensibilisiert. Bei acht der Patienten war die vorliegende Sensibilisierung klinisch nicht relevant. So zeigten vier Patienten (P22, P28, P30 und P31) zwar Antikörper gegen das Bienengift und vier Patienten (P21, P23, P29 und P33) gegen Wespengift, jedoch lag klinisch keine Allergie vor. Das Vorliegen von spezifischem IgE auf rekombinante Allergene der Biene und Wespe kann den klinischen Daten im Anhang entnommen werden.

Sechs Patienten (P5, P22, P24, P26, P28, P31) wiesen spezifisches IgE gegen MUXF3 CCD auf, von denen bei drei (P22, P28, P31) die Diagnose einer Wespengiftallergie mit klinisch nicht relevanter Sensibilisierung gegen Bienengift gestellt wurde.

Weitere Befunde

Drei Patienten (P6, P27, P29) litten unter einer Mastozytose und zeigten im Immuno-CAP erhöhte Tryptase-Werte (P6: 36,6 IU/ml; P27: 20,4 IU/ml; P29: 26,7 IU/ml). Daneben lag bei zwei Patienten (P25 und P26) eine Rhinokonjunktivitis allergica saisonalis und bei einem der beiden

(P26) außerdem eine Allergie auf Äpfel mit oralem Allergiesyndrom vor. Vier Patienten (P6, P24, P26, P28) waren neben ihrer Bienen- bzw. Wespengiftallergie auch auf Hornissen allergisch.

3.2.3 Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation®

Zur Auswertung der Ergebnisse der beiden Basophilenaktivierungstests wurden auch in diesem Teil der Studie für die Negativ- und Positivkontrollen Cut-off-Werte festgelegt. Sowohl für den Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG als auch für den Dura Clone IF Basophil Activation® der Firma Beckman Coulter wurde definiert, dass für das Vorliegen eines verwertbaren Ergebnisses eine Negativkontrolle unterhalb von 5 % und Stimulationskontrollen oberhalb 10 % erreicht werden müssen. Für das HBV und YJV wurden die vom Hersteller Bülmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz vorgeschlagenen Cut-offs von 10 % berücksichtigt. Daneben sollten für bestmögliche Aussagekraft pro Auswertung 300-500 Basophile analysiert werden.

Vor diesem Hintergrund schied ein Patient (P29) bereits nach dem BAT mit dem Flow CAST® - Kit von der Studie aus. Da nicht genügend basophile Zellen analysiert werden konnten, um eine valide Aussage treffen zu können, wurde auf eine Durchführung des Dura Clone IF Basophil Activation® verzichtet. Ein weiterer Patient (P23) zeigte im Dura Clone IF Basophil Activation® keine Reaktion auf die Positivkontrollen oberhalb des definierten Cut-offs von > 10 % (Anti-FcεRI mAK: 7,4 %; Anti-IgE: 2,1 %) und wurde daher als Non-Responder eingestuft. Ein Patient (P26) zeigte in der Negativkontrolle eine leichte Aktivierung oberhalb des Cut-offs von < 5 % (9,1 %), wurde aber aufgrund sonst plausibler Ergebnisse in beiden Tests dennoch in die Auswertung eingeschlossen (vgl. Anhang).

3.2.4 Patienten mit hohen Werten in der Negativkontrolle

Fünf der untersuchten Patienten (P5, P21, P30, P31 und P33) zeigten im Dura Clone IF Basophil Activation® eine deutliche Aktivierung in den Leerwerten von im Mittel (\pm SD) 50,1 (\pm 5,0) %, während die Werte im Flow CAST® im Normbereich (< 5 %) lagen. Dies führte dazu, dass die Ergebnisse dieser Patienten als nicht aussagekräftig verworfen werden mussten. Das entspricht etwa 30 % aller in dieser Studie mit dem Dura Clone IF Basophil Activation® untersuchten Patienten (5 von 16). Die Ergebnisse dieser Patienten wurden damit von der quantitativen und qualitativen Auswertung ausgeschlossen (jedoch nicht vom Vergleich der beiden Gating-Varianten und der Durchführungszeit; Kapitel 3.2.5 und 3.2.6).

– Ergebnisse –

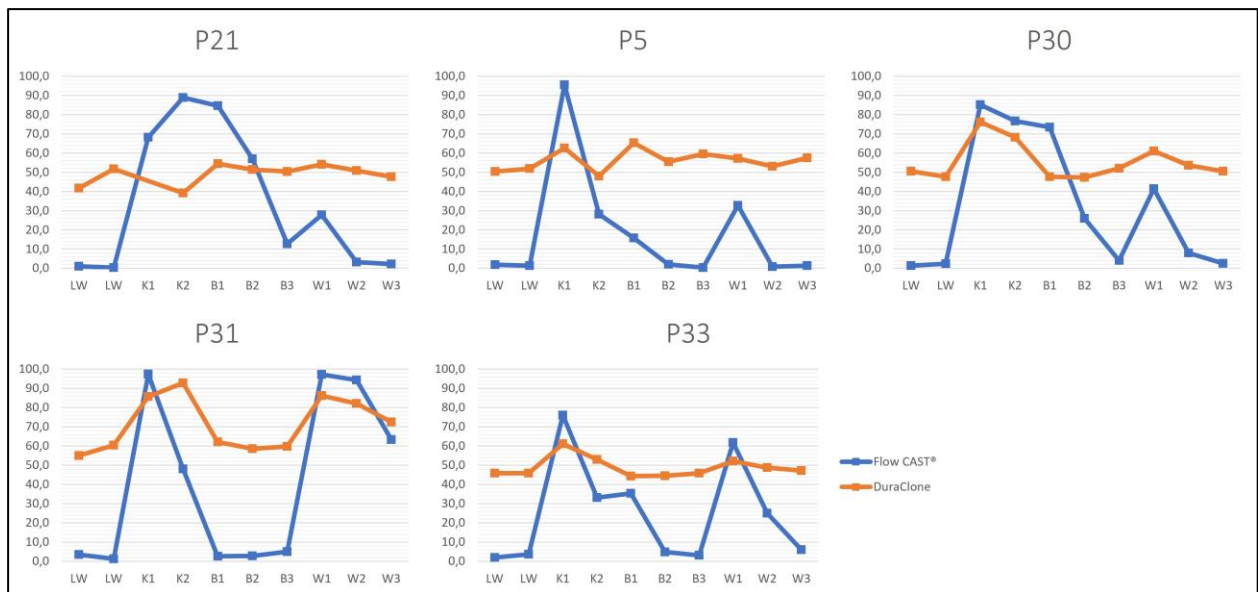


Abbildung 24: Ergebnisse des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® für fünf ausgewählte Patienten mit hohen Leerwerten im Dura Clone IF Basophil Activation®

Die Ergebnisse der BATs für diese fünf Patienten sind in Abbildung 24 zu sehen. Für die einzelnen Patienten ergaben sich folgende Werte in der Negativkontrolle: P21: 41,7 % / 51,7 %; P5: 50,4 % / 51,9 %; P30: 50,5 % / 47,6 %; P31: 55,0 % / 60,5 %; P33: 45,9 % / 45,8 %. Bei den Patienten P30 und P31 lassen sich noch darüberhinausgehende Aktivierungen ausmachen. So zeigen beide mit Differenzen von 17,7 / 20,6 %P und 37,8 / 32,3 %P deutliche Unterschiede zwischen Leerwerten und Positivkontrolle. Außerdem liegen bei P30 die gemessenen Aktivierungen durch HBV und YJV und bei P31 die Aktivierung für YJV deutlich über den Leerwerten. Dies entspricht tendenzmäßig den Aktivierungen, die auch im Flow CAST® gemessen wurden. P5 zeigt für die Kontrolle mit Anti-FcεRI mAK und die höchste Konzentration von HBV und P33 für die Positivkontrollen zumindest kleine Anstiege im Kurvenverlauf. Die Leerwerte von P5 ebenso von P21 lagen oberhalb der Aktivierung durch die Positivkontrolle Anti-IgE des Dura Clone IF Basophil Activation®. Insgesamt sind die Ergebnisse aller fünf Patienten aufgrund der zu hohen Leerwerte in diesem Test als nicht verwertbar einzustufen.

Um die Ursache der Aktivierung genauer zu untersuchen, wurde in einem gesonderten Ansatz das Blut eines Patienten (P30) manuell mit Markern versetzt, um die fixierten Marker des Dura Clone IF Basophil Activation® zu ersetzen (siehe Kapitel 2.4.3). Hier konnten sowohl für den Leerwert als auch die Positivkontrolle gültige Ergebnisse entsprechend den definierten Cut-off-Werten erzielt werden. Anders als im Dura Clone IF Basophil Activation® lag in diesem Ansatz keine Aktivierung in der Negativkontrolle vor. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tab. 19 dargestellt.

Tabelle 19: Zusätzlicher Ansatz eines BATs mit der Probe von P30 und den Markern Anti-CCR3, Anti-CD203c und Anti-CD63

| Probe | CD63-Aktivierung in [%] |
|---|----------------------------|
| Leerwert mit Stimulationspuffer | 2,5 |
| Leerwert mit Activation Solution | 3,7 |
| Positivkontrolle mit Anti-FcεRI mAK | 78,5 |
| Stimulation mit Bienengift (625 ng/ml) | 33,3 |
| Stimulation mit Wespengift (625 ng/ml) | 49,8 |

3.2.5 Ergebnisse beider Tests

Vergleich der Gating-Varianten des Dura Clone IF Basophil Activation®

Zunächst wurde untersucht, ob innerhalb des Dura Clone IF Basophil Activation® die beiden möglichen Gating-Varianten (vgl. Kapitel 2.4.6) zu unterschiedlichen Ergebnissen führten.

Hierzu wurde verglichen, wie viele Basophile jeweils in der Auswertung als solche detektiert wurden. Für die erste Gating-Variante (CD45+, CD3-, CRTH2+ Zellen ohne Markierung von CD203c) lag der Mittelwert (\pm SD) der Anzahl der ermittelten Basophilen über alle Proben hinweg bei 420 (\pm 99,9) (Minimum: 137; Maximum: 586) im Vergleich zu 415 (\pm 97,3) für die Gating-Variante mit Markierung von CD203c (Minimum: 131; Maximum: 579). Die Mittelwerte unterschieden sich damit nur um 1,2 %. Die Differenz der beiden Varianten pro untersuchte Probe lag (bei einem Maximum von 41 und einem Minimum von -76) im Mittel (\pm SD) bei 5 (\pm 16,5).

Zur Beurteilung der Übereinstimmung beider Methoden wurden die Ergebnisse in einem Bland-Altman-Plot abgebildet (Abbildung 25). Die Übereinstimmungsgrenzen liegen zwischen 37,8 und -26,9. Es werden also etwa 95 % der zukünftig zu messenden Differenzen im Intervall [-26,9; 37,8] erwartet. Dies entspricht einem Smallest Detectable Change (SDC) von 64,7. Bei Mittelwerten von 400 bis 500 gemessenen Basophilen fiel die Streuung geringer aus als im Bereich von 150-200 Zellen.

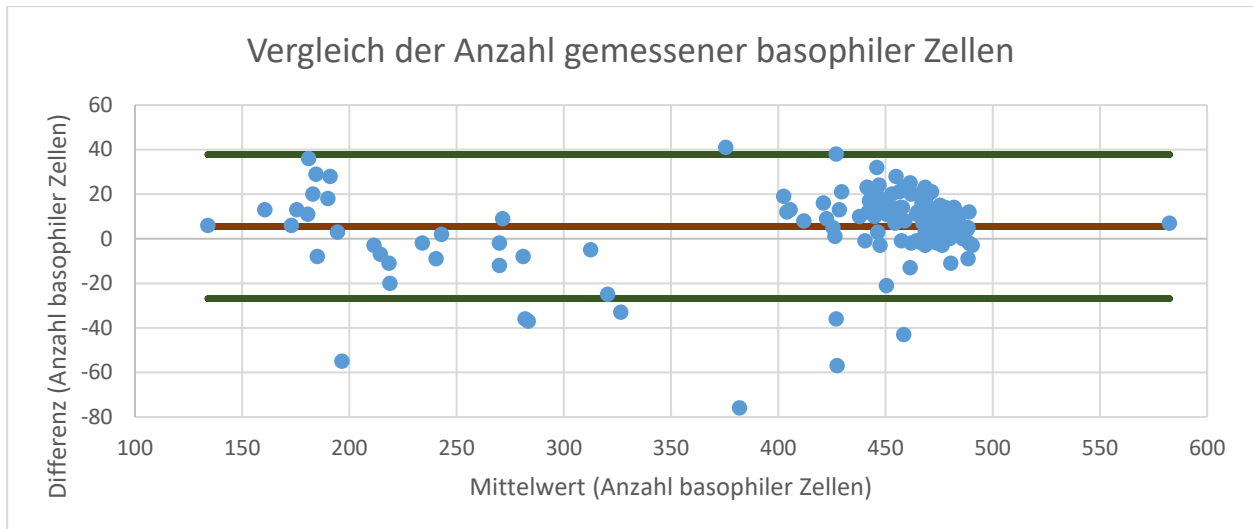


Abbildung 25: Bland-Altman-Plot zur Anzahl der gemessenen basophilen Zellen durch beide Gating-Optionen mit Verzerrung $d = \text{Mittelwert der Differenz (Gating 1 - Gating 2)}$ (rot) und Übereinstimmungsgrenzen $d \pm 1,96 \times s$ (grün), wobei s die Standardabweichung der Differenzen bezeichnet. $n=153$

Im quantitativen Vergleich der jeweils für die einzelnen Proben (Leerwerte, Positivkontrollen und Allergene HBV und YJV) ermittelten Aktivierung lag der Mittelwert (\pm SD) der Differenz bei $-1 (\pm 2,4)$ %P bei einem Minimum von -21 %P und einem Maximum von 4 %P. Für die Leerwerte lag die Differenz im Mittel (\pm SD) bei $-0,4 (\pm 1,2)$ %P, für die Positivkontrollen bei $-1,9 (\pm 4,4)$ %P und die Allergene bei $0,5 (\pm 1,6)$ %P. Auch die Differenz der gemessenen Aktivierungen wurden mit einem Bland-Altman-Plot näher analysiert, um eine Aussage über die Übereinstimmung zu ermöglichen (Abb. 26).

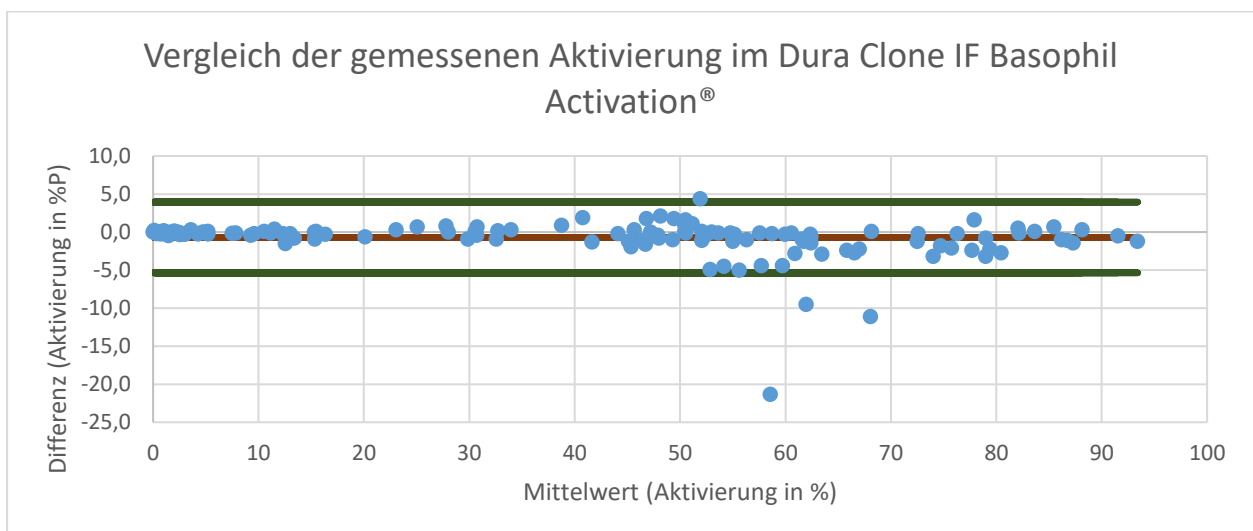


Abbildung 26: Bland-Altman-Plot für die Aktivierung gemessen durch beide Gating-Optionen mit Verzerrung $d = \text{Mittelwert der Differenz (Gating 1 - Gating 2)}$ (rot) und Übereinstimmungsgrenzen $d \pm 1,96 \times s$ (grün), wobei s die Standardabweichung der Differenzen bezeichnet. $n=153$

Die LOA lagen zwischen 3,9 und -5,3, was einem SDC von 9,3 entspricht. Vor allem für die Werte unterhalb des Cut-offs von 10 % fiel die Streuung besonders gering aus. Im Bereich von 45–70 % wiederum ist sie im Vergleich etwas größer.

In der Interpretation der Ergebnisse des BATs erfolgt die Bewertung der gemessenen Aktivierung in Bezug zu den festgelegten Cut-off-Werten. Die qualitative Aussage ist dichotom (Aktivierung über Cut-off oder nicht). Die Gating-Varianten unterschieden sich in keiner Messung darin, ob die gemessenen Werte oberhalb oder unterhalb der Cut-off-Werte lagen. Die qualitativen Aussagen beider Gating-Varianten waren gleich.

Da beide Gating-Varianten aufgrund dieser Resultate als gleichwertig angesehen wurden (vgl. Diskussion 4.2.3), wurde für die weitere Auswertung der Ergebnisse die erste Gating-Variante (CD45+, CD3-, CRTH2+ Zellen ohne Markierung von CD203c) betrachtet.

Vergleich der Aktivierungsmarker CD63 und CD203c

Der Dura Clone IF Basophil Activation® benutzt eine Kombination aus Anti-CD203c und Anti-CD63 zur Messung der basophilen Aktivierung (CD63+, CD203c^{bright}; vgl. Abb. 8, Q2). Da beide Marker auch getrennt zur Messung der Aktivierung benutzt werden könnten, erfolgte in dieser Studie eine separate Auswertung, bei der die basophile Aktivierung auch durch die alleinige Bestimmung von CD63+ (vgl. Abb. 8 Q2 und Q3) oder CD203c^{bright}-Zellen (vgl. Abb. 8, Q1 und Q2) gemessen wurde.

Die Differenz zwischen den gemessenen Aktivierungen durch CD63+/CD203c^{bright} und der alleinigen Verwendung von CD63 lag dabei im Mittel (\pm SD) bei lediglich 0,26 (\pm 0,34). Die qualitative Aussage der Testergebnisse veränderte sich für keine der Proben, wenn als Aktivierungsmarker allein CD63 (ohne CD203c) benutzt wurde, sondern entsprach denen bei der Verwendung der Kombination CD63+/CD203c^{bright}.

Bei der alleinigen Verwendung von CD203c dagegen, lag die Differenz im Mittel (\pm SD) bei 35,0 (\pm 19,1). Um zu überprüfen, ob hier ein signifikanter Unterschied zwischen der alleinigen Benutzung von CD203c und der Kombination aus beiden vorlag, wurde ein Zweistichproben T-Test durchgeführt (vgl. Tabelle 20).

Tabelle 20: Zweistichproben T-Test zur Untersuchung des Unterschieds der gemessenen Aktivierungen durch Nutzung von CD203c gegenüber CD63 mit CD203c

| | T-Statistik | Kritischer T-Wert | p (zweiseitig) |
|---|-------------|-------------------|----------------|
| CD203c^{bright} vs. CD63+, CD203c^{bright} | 17,8 | 1,99 | < 0,001 |

Legende: T-Statistik, Testwert; p, Signifikanzniveau

Betrachtet man den Unterschied in den qualitativen Aussagen, so zeigt sich, dass eine Verwendung von CD203c in dieser Studie zu deutlich mehr Ergebnissen oberhalb des Cut-off-Wertes führte. So lagen die Leerwerte aller Patienten bei > 10 %. Daneben lagen alle ermittelten Werte für die Positivkontrollen und die Allergene HBV und YJV oberhalb des Cut-offs von 10 %. Damit müsste bei einer Auswertung mithilfe von CD203c als Aktivierungsmarker in jeder gemessenen Probe von basophiler Aktivierung ausgegangen werden.

Quantitativer Vergleich der Ergebnisse

Für den quantitativen Vergleich der Ergebnisse beider Tests wurden die Differenzen der jeweiligen Werte analysiert. Hierbei wurde neben den Leerwerten und den Verdünnungen der Allergene (HBV und YJV) die Positivkontrollen Anti-FcεRI mAK als Wertepaare verglichen (vgl. Tabelle 21).

Im gesamten Mittel (\pm SD) lag die Differenz bei 0,2 (\pm 12,2) %P. Am größten fiel der Unterschied für den Anti-FcεRI mAK aus, hier lag der Dura Clone IF Basophil Activation® im Mittel um 10,1 (\pm 9,3) %P unterhalb der Werte des Flow CAST®. P24 zeigte den geringsten Unterschied zwischen den beiden Tests (Mittelwert: 1,8 %P; SD: 7,3 %P; Maximum: 9,2 %P; Minimum: - 14,9 %P). Bei P32 dagegen lag eine mittlere Differenz von 13,6 (\pm 20,6) %P bei einem Maximum von 46,5 %P und einem Minimum von -17,2 %P vor.

Tabelle 21: Auswertung der Differenzen von Dura Clone IF Basophil Activation® und Flow CAST® im Mittel

| Probe | Mittel | Maximum | Minimum | Standardabweichung |
|----------------|--------|---------|---------|--------------------|
| LW | -0,2 | 8,7 | -4,4 | 2,8 |
| Anti-FcεRI mAK | -10,1 | -0,7 | -30,2 | 9,3 |
| HBV 1 | 0,1 | 34,5 | -28,9 | 17,8 |
| HBV 2 | 5,4 | 46,5 | -7,8 | 14,7 |
| HBV 3 | 1,5 | 13,9 | -5,3 | 5,3 |
| YJV 1 | -6,2 | 15,2 | -20,3 | 14,3 |
| YJV 2 | 0,9 | 22,6 | -17,6 | 11,8 |
| YJV 3 | 4,4 | 34,9 | -2,1 | 10,3 |

Abbildung 27 zeigt den Vergleich beider Tests in einem Bland-Altman-Plot. Die LOA lagen zwischen 24,0 und -23,7. Damit werden also 95 % der zukünftig zu messenden Differenzen in diesem Intervall erwartet ([-23,7; 24,0]). Das entspricht einem SDC von 47,7. Für Werte unterhalb der Cut-offs von 10 % fiel die Streuung deutlich geringer aus als für höhere Mittelwerte.

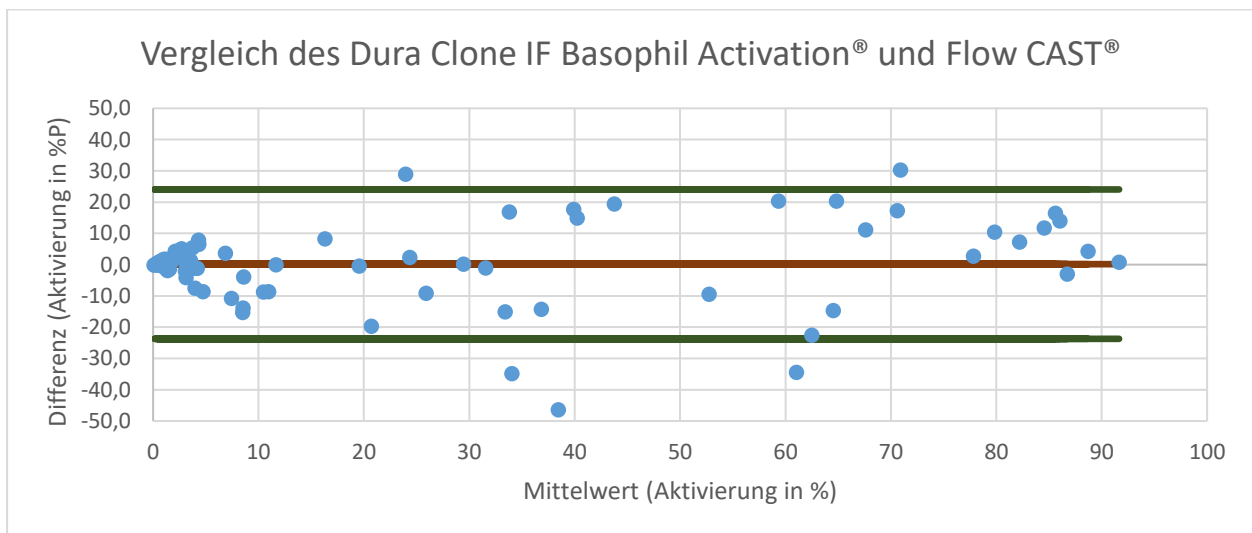


Abbildung 27: Bland-Altman-Plot zur Aktivierung gemessen durch Dura Clone IF Basophil Activation® und Flow CAST® mit Verzerrung d = Mittelwert der Differenz (Flow CAST® - Dura Clone IF Basophil Activation®) (rot) und Übereinstimmungsgrenzen $d \pm 1,96 \times s$ (grün), wobei s die Standardabweichung der Differenzen bezeichnet. $n=84$

Vergleich der Positivkontrollen Anti-FcεRI mAK und Anti-IgE

Die beiden untersuchten Tests verwenden mit Anti-FcεRI mAK (Flow CAST®) und Anti-IgE (Dura Clone IF Basophil Activation®) verschiedene Positivkontrollen. Daher sollte in dieser Studie untersucht werden, ob ein Unterschied in den von ihnen gemessenen Aktivierungen vorlag.

Beide Positivkontrollen führten in den untersuchten 10 Patienten zu ausreichend hoher Aktivierung oberhalb des Cut-offs von 10 % (vgl. Anhang). Die basophile Aktivierung durch Anti-FcεRI mAK im Flow CAST® lag dabei im Mittel (\pm SD) bei 78,1 (\pm 16,6) %, die durch Anti-IgE im Dura Clone IF Basophil Activation® bei 53,6 (\pm 28,4). Die Werte für Anti-IgE unterliegen einer deutlich größeren Streuung und befinden sich zwischen einem Minimum von 11,8 % und einem Maximum von 85,7 %. Zur Veranschaulichung der deutlich höheren Aktivierung durch Anti-FcεRI mAK im Vergleich zu Anti-IgE wurde ein Boxplot erstellt (vgl. Abb. 28).

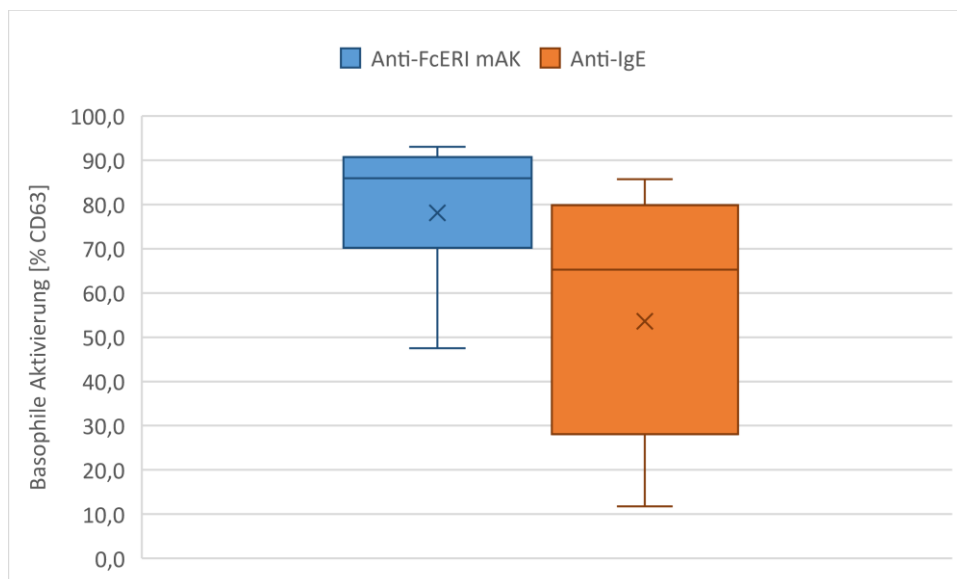


Abbildung 28: Verteilung der gemessenen basophilen Aktivierung durch die Positivkontrollen Anti-FcεRI mAK und Anti-IgE mit Median (Strich), Mittelwert (Kreuz), Minimum, Maximum und Quartilen

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede statistisch signifikant sind, wurde ein Zweistichproben T-Test durchgeführt. Da der Testwert mit 4,46 größer als der kritische T-Wert von 2,26 ist, lässt der Test mit einem Signifikanzniveau von $< 0,05$ die Annahme zu, dass es sich um signifikante Unterschiede handelt (vgl. Tab. 22).

Tabelle 22: Zweiseitiger Zweistichproben T-Test zur Untersuchung des Unterschieds der gemessenen Aktivierungen durch Anti-FcεRI mAK und Anti-IgE

| | T-Statistik | Kritischer T-Wert | p (zweiseitig) |
|------------------------------------|-------------|-------------------|----------------|
| Anti-FcεRI mAK vs. Anti-IgE | 4,46 | 2,26 | 0,002 |

Legende: T-Statistik, Testwert; p, Signifikanzniveau

Qualitative Aussagen der beiden Tests

In der qualitativen Auswertung wurde untersucht, ob die beiden Test-Kits anhand der für die Allergene definierten Cut-off-Werte von 10 % zu ähnlichen Ergebnissen kommen. Bei acht der zehn ausgewerteten Patienten (P15, P22, P24, P25, P27, P28, P32, P34) trafen beide Tests die gleiche Aussage bezüglich der Aktivierung auf Bienen- bzw. Wespengift. Hierbei wurde bei vier Patienten (P15, P22, P27, P34) keine Aktivierung oberhalb des Cut-offs für Bienengift beobachtet, während das Wespengift zu einer Aktivierung der Basophilen führte. Bei vier Patienten (P24, P25, P28, P32) zeigte sich eine Aktivierung für beide Gifte.

In zwei von zehn Fällen unterschied sich die qualitative Aussage der beiden Test-Kits. So wurde bei P6 mit dem Flow CAST® für beide Gifte in der höchsten Konzentration eine Aktivierung gemessen, während im Dura Clone IF Basophil Activation® lediglich das Wespengift in der höchsten Konzentration zu einer Aktivierung oberhalb des Cut-offs führte. Umgekehrt dazu zeigte Patient P26 im Dura Clone IF Basophil Activation® für beide Gifte in allen Konzentrationen eine Aktivierung, im Flow CAST® nur für das Wespengift (in allen Konzentrationen). Darüber hinaus unterschieden sich die Tests bei P24 bei Inkubation der Zellen mit HBV in einer Konzentration von 57 bzw. 125 ng/ml, bei P28 bei YJV in einer Konzentration von 11 bzw. 25 ng/ml und bei P32 bei HBV in einer Konzentration von 11 bzw. 25 ng/ml. Die übrigen Konzentrationen führten bei diesen Patienten zu vergleichbaren Aktivierungen oberhalb bzw. unterhalb des Cut-offs.

Zur Beurteilung der Urteilsübereinstimmung erfolgte die Berechnung von Cohens Kappa. Hierzu wurden die Ergebnisse für die je drei Konzentrationen von HBV und YJV verglichen. Die möglichen nominalen Aussagen waren dabei entweder „Aktivierung unterhalb des Cut-offs“ oder „Aktivierung oberhalb des Cut-offs“. In 26 der 60 Fälle ermittelten sowohl der Flow CAST® als auch der Dura Clone IF Basophil Activation® eine Aktivierung unterhalb des Cut-offs, in 27 Fällen oberhalb des Cut-offs. Die relative Übereinstimmung lag bei 88,3 % bei einer

Wahrscheinlichkeit zufälliger Übereinstimmung von 49,7 %. Daraus ergab sich ein Cohens Kappa von 0,77.

Bei fünf Patienten (P22, P24, P25, P27, P32) waren die Ergebnisse beider Tests konkordant mit der bereits im Vorfeld diagnostizierten Allergie und dem Sensibilisierungsprofil. Bei zwei Patienten (P15, P34) fielen in beiden Tests die Ergebnisse für das Bienengift negativ aus, obwohl eine Bienengiftsensibilisierung und klinisch relevante Allergie vorlagen. Bei P28 wiederum zeigten beide Tests positive Ergebnisse für HBV, was zwar mit der Bestimmung des spezifischen IgEs, nicht aber mit der diagnostizierten Allergie übereinstimmte (ausschließliche Wespengiftallergie). Für die beiden Patienten, für die sich die beiden Tests in den Ergebnissen qualitativ unterschieden, traf der Flow CAST® in beiden Fällen (P6 und P26) eine Aussage, die mit der zuvor erfolgten Diagnose deckend war (P6: Bienen- und Wespengiftallergie; P26: ausschließliche Wespengiftallergie). Der Dura Clone IF Basophil Activation® dagegen zeigte bei P6, der sIgE und eine klinisch relevante Allergie auf Bienengift aufwies, ein negatives Ergebnis. Bei P26 fielen im Dura Clone IF Basophil Activation® die Ergebnisse auf das Bienengift positiv aus, was dem Sensibilisierungsprofil bei Bestimmung des spezifischen IgEs, nicht aber der diagnostizierten Allergie entsprach (vgl. Tabelle 23).

Tabelle 23: Vergleich des Sensibilisierungs- und Allergieprofils mit den qualitativen Ergebnissen des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation®

| Patient | Sensibilisierung | Allergie | Flow CAST® (% CD63+) | Dura Clone IF Basophil Activation® (% CD63+) |
|------------|------------------|--------------|---|---|
| P6 | Biene, Wespe | Biene, Wespe | Biene positiv (38,4), Wespe positiv (25,8) | Biene negativ (9,5), Wespe positiv (41,0) |
| P26 | Biene, Wespe | Wespe | Biene negativ (0,8), Wespe positiv (57,2) | Biene positiv (16,2), Wespe positiv (71,9) |

3.2.6 Vergleich der Durchführungszeiten

In den Vergleich der Durchführungszeiten der beiden Test-Kits wurden 16 der 17 untersuchten Patienten eingeschlossen. P15 wurde von der Analyse ausgeschlossen, da die nicht durchgeführte Waschung im Dura Clone IF Basophil Activation® zu einer deutlich verlängerten Zeit in der Auswertung geführt hatte (vgl. Kapitel 2.4.4) und sich die Werte damit nicht für einen Vergleich mit dem Flow CAST® eigneten.

Im Mittel (\pm SD) lag die Durchführungszeit des Flow CAST® bei 1:08:13 (\pm 9:58) h und die des Dura Clone IF Basophil Activation® bei 1:30:36 (\pm 10:54) h. Damit unterschieden sich die Mittelwerte um 22:23 min (vgl. Abb. 29). Der Mittelwert (\pm SD) der Differenzen je untersuchter Patient lag bei 22:13 (\pm 5:38) min. Insgesamt benötigte der Dura Clone IF Basophil Activation® die etwa 1,3-fache Durchführungszeit des Flow CAST®.

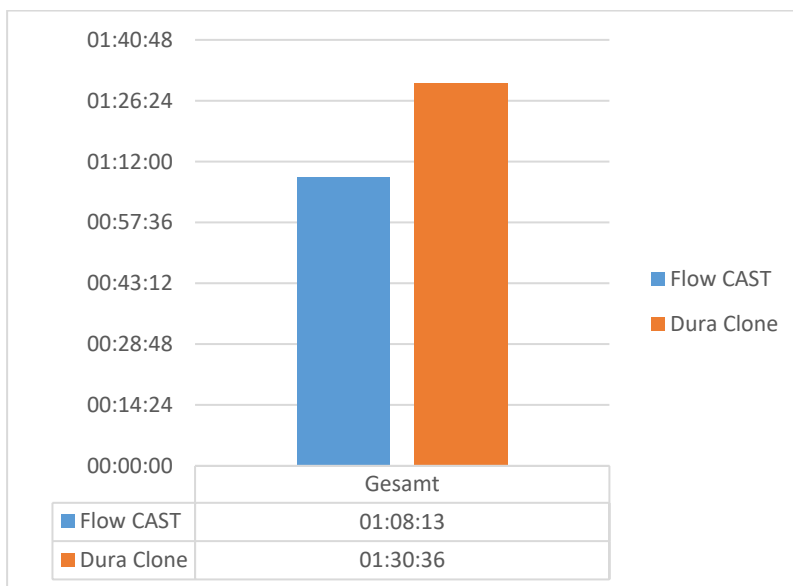


Abbildung 29: Vergleich der Testdauer (in min) von Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation®

In Abbildung 30 sind die Durchführungszeiten bei den einzelnen Testschritten aufgeführt. Hierbei wird deutlich, dass der Dura Clone IF Basophil Activation® mit der zweimaligen Zugabe von PBS-Puffer und einem 3. Inkubations-Schritt mehr Abläufe beinhaltet als der Flow CAST®. Hieraus ergibt sich die im Mittel längere Durchführungszeit des Dura Clone IF Basophil Activation®. Allein die Zeit für die Inkubationsschritte liegt bei 45 min, während sie sich im Flow CAST® auf 29 min beläuft.

– Ergebnisse –

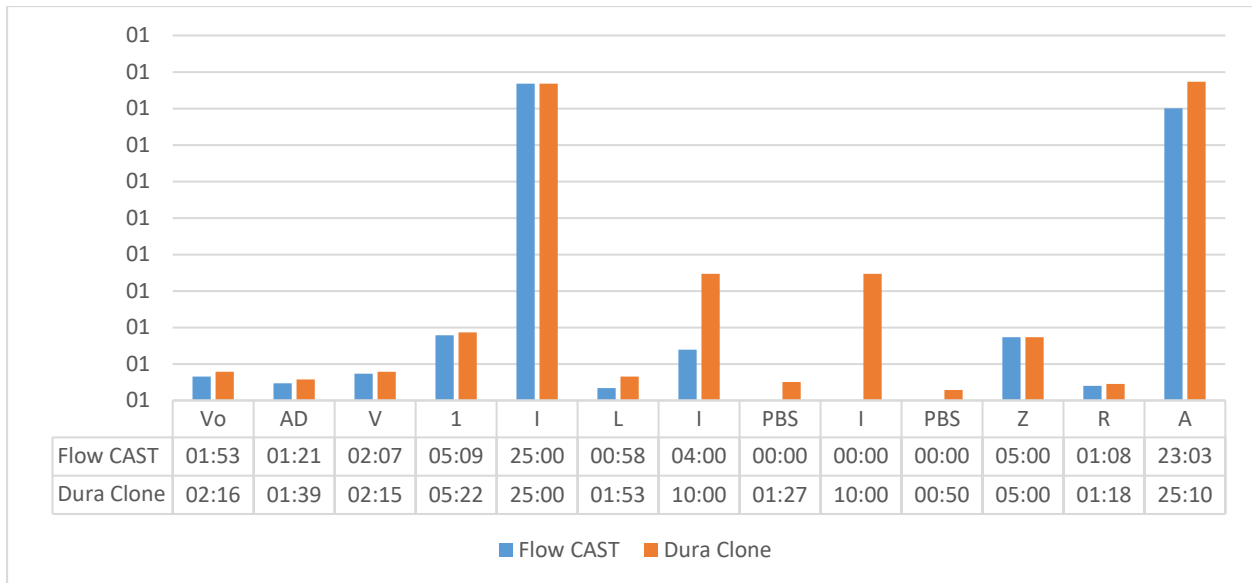


Abbildung 30: Vergleich der Durchführungszeiten (in min) bei den einzelnen Testschritten des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation®

Vo, Vorbereitung; AD, Herstellung der Allergendilution; V, Verdünnung; 1, 1. Schritt; I, Inkubation; L, Lyse; PBS, Hinzufügen von PBS-Puffer; Z, Zentrifugation; R, Resuspension; A, Auswertung

In der Differenz ist die Inkubationszeit damit 16 min länger. Durch die beiden zusätzlichen Schritte, in denen PBS-Puffer zugegeben wird, verlängert sich die Durchführungszeit des Dura Clone IF Basophil Activation® im Mittel um 2:16 min. Daneben fällt der Lyseschritt um 0:56 min sowie die Auswertung um 2:07 min länger aus. In den übrigen Schritten liegt nur eine sehr geringe Differenz der Durchführungszeiten vor (vgl. Abbildung 31).

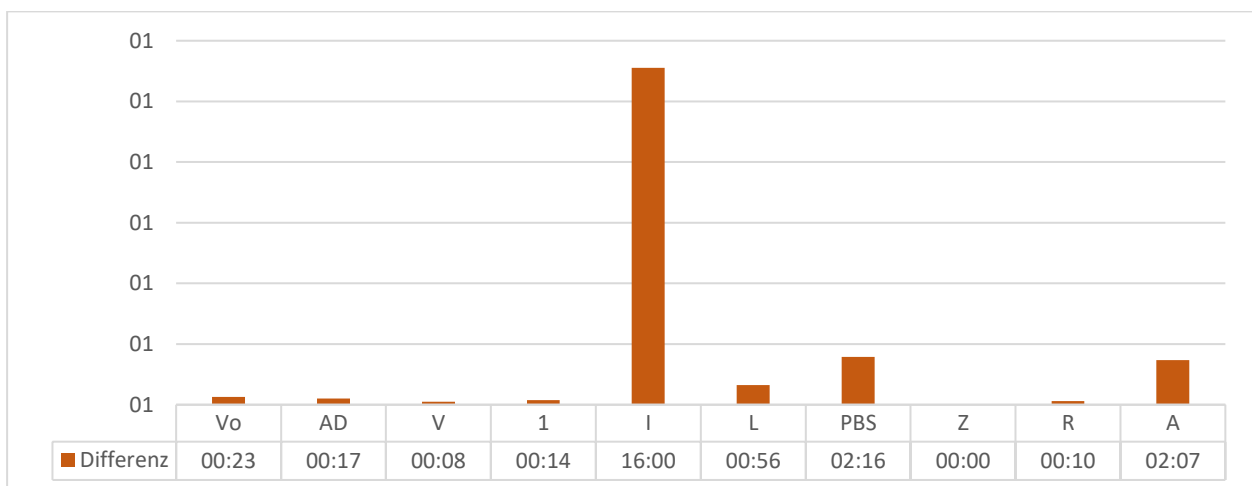


Abbildung 31: Differenz der Durchführungszeiten bei den einzelnen Testschritten des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® je Abschnitt (in min)

Vo, Vorbereitung; AD, Herstellung der Allergendilution; V, Verdünnung; 1, 1. Schritt; I, Inkubation; L, Lyse; PBS, Hinzufügen von PBS-Puffer; Z, Zentrifugation; R, Resuspension; A, Auswertung

3.2.7 Kostenvergleich

Der Marktpreis für ein Test-Kit des Dura Clone IF Basophil Activation® lag (Stand 08/2021) bei 680,00 €. Mit einem Test-Kit können laut Hersteller 25 Tests durchgeführt werden. Die Kosten für die Reagenzien Activation Solution (5,5ml; 100 Tests) und Optilyse C (200 Tests) beliefen sich auf 109,00 € bzw. 186,00 € (Stand 08/2021). Damit ergeben sich pro durchführbaren Test für den Dura Clone IF Basophil Activation® Kosten von 29,22 €. Nicht berücksichtigt bleiben hierbei Kosten für Verbrauchsmaterialien (wie z.B. Pipettenspitzen oder Probenröhren) und weitere Reagenzien (wie z.B. der verwendete PBS-Puffer). Da sowohl im Flow CAST® als auch im Dura Clone IF Basophil Activation® die gleichen Allergene verwendet wurden, können diese in der Berechnung unberücksichtigt bleiben.

Für den Flow CAST® des Herstellers Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz, lag der Marktpreis (Stand 08/2021) bei 630,00 €. Pro Test-Kit lassen sich laut Hersteller 100 Tests durchführen. Da sowohl Puffer als auch Lyse bereits im Kit enthalten sind, fallen keine Kosten für weitere Reagenzien an. Damit belaufen sich die Kosten pro durchführbaren Test auf 6,30 €. Nicht berücksichtigt bleiben hierbei ebenfalls die Kosten für weitere Verbrauchsmaterialien.

Insgesamt beträgt der Preis pro durchführbaren Test beim Dura Clone IF Basophil Activation® das 4,6-fache des Flow CAST® bzw. liegt um 22,92 € über dem Preis des Flow CAST®.

4 Diskussion

4.1 Erprobung homologer Allergene im Flow CAST®

4.1.1 Herausforderung der Unterscheidung von Allergien gegen *Vespula spp.* und *Polistes spp.*

Für eine zielgerichtete und erfolgreiche spezifische Immuntherapie bei Hymenopterenengiftallergien ist es notwendig, eine sichere Diagnose zum allergieauslösenden Insekt zu stellen. Im Falle von Wespenarten wie der *Polistes dominula* und den *Vespula spp.* bereitet die Unterscheidung zwischen einer Mono-Allergie und einer genuinen Doppelsensibilisierungen trotz der Fortschritte durch die CRD nach wie vor häufig Schwierigkeiten (15). Besonders herausfordernd ist die Situation in Gebieten, in denen beide Spezies koexistieren, z.B. in Spanien oder Italien (124).

Bisher sind fünf Allergene von *Polistes dominula* bekannt (vgl. Tabelle 3, Kapitel 1.1.3). Zu diesen zählen die Phospholipase A1 (Pol d 1), die Hyaluronidase Pol d 2, die Dipeptidylpeptidase Pol d 3, die Protease Pol d 4 und das Antigen 5 (Pol d 5). Von *Vespula vulgaris* sind bisher ebenfalls fünf Allergene beschrieben worden: die Phospholipase A1 (Ves v 1), die Hyaluronidase Ves v 2, die Dipeptidylpeptidase Ves v 3, das Antigen 5 (Ves v 5) und das Vitellogenin Ves v 6 (14).

Auch wenn hiermit bereits eine Reihe von Allergenen beider Spezies bekannt ist, bleibt die Unterscheidung von PDV- und YJV-Allergien eine Herausforderung. Anders als in der Abgrenzung zu Allergien gegen HBV stehen keine definierten Markerallergene zur Verfügung und die bisher bekannten Allergene weisen in der Regel hohe Kreuzreaktivität auf (vgl. Abbildung 3 in Kapitel 1.2.4) (14, 15).

So ist die Phospholipase A1 von *Polistes dominula* (Pol d 1) zu 55 % sequenzhomolog zu Ves v 1 und beide sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut (14, 91). Die damit einhergehende hohe Kreuzreaktivität schränkt ihren Nutzen in der Diagnostik von PDV/YJV-DS stark ein (84). Im Gegensatz dazu können Pol d 1 und Ves v 1 jedoch gut als Markerallergene in der Unterscheidung von Allergien gegen HBV und PDV/YJV genutzt werden (14).

Das Majorallergen Pol d 3, das in PDV-Allergikern eine Sensibilisierung von 66 % zeigt, weist zu 76 % die identische Sequenz auf wie Ves v 3. Darüber hinaus besteht eine Sequenzhomologie zu Api m 5 von über 50 %, wodurch alle drei Allergene stark kreuzreaktiv sind (14, 122). Eine Studie von Schiener et al. konnte nachweisen, dass 63 % der untersuchten YJV-Allergikern neben Ves v 3

auch auf Pol d 3 reagierten, weshalb die alleinige Verwendung von Pol d 3 in der Diagnostik begrenzte Aussagekraft besitzt (122).

Für die Serinprotease Pol d 4 ist noch kein homologes Protein im Hymenoptergift von *Vespula spp.* gefunden worden. Laut bisher noch nicht vollständig publizierter Daten handelt es sich bei Pol d 4 vermutlich um ein Minorallergen, sodass auch hier der Nutzen in der Diagnostik eingeschränkt ist (14).

Pol d 5 stellt das Antigen 5 im Venom von *Polistes dominula* dar. Das Antigen 5 ist in einer Vielzahl von Insekten und so auch im PDV ein Majorallergen (99, 121). Aufgrund der starken Kreuzreaktivität unter anderem zu Ves v 5 kann aber auch Pol d 5 nicht als Markerallergen in der Unterscheidung von Sensibilisierungen gegen PDV und YJV verwendet werden (121).

Die bekannten Allergene sind damit in vielen Fällen noch nicht ausreichend für eine Unterscheidung von PDV-Allergien und YJV-Allergien mittels CRD. Um dieses Hindernis zu überkommen, müssen entweder (bisher nicht bekannte) Markerallergene beschrieben oder anhand der Bestimmung mehrerer kreuzreaktiver Allergene und der Messung ihrer sIgE-Titer eine Aussage über die genuine Sensibilisierung getroffen werden (15, 54, 84). Die Beschreibung von Markerallergenen gilt aufgrund der nahen phylogenetischen Verwandtschaft von *Polistes dominula* und *Vespula spp.* als zunehmend unwahrscheinlich (15, 56).

In jedem Fall ist davon auszugehen, dass durch die Beschreibung neuer Allergene zusätzliche Erkenntnisse und damit eine bessere diagnostische Abgrenzung zwischen PDV und YJV ermöglicht werden könnte. Deshalb untersuchte die vorliegende Studie mithilfe des BATs eine kürzlich neu entdeckte Phospholipase A2 im Hymenoptergift von *Polistes dominula* (PDV PLA2) sowie das bisher wenig bekannte Allergen Pol d 2 (Hyaluronidase von *Polistes dominula*) und deren mögliche Aussagekraft für die Diagnostik von Hymenoptergiftallergien.

4.1.2 Phospholipasen Api m 1 und PDV PLA2

Phospholipasen wurden bereits in mehreren Hymenoptergiften beschrieben und sind bekannte Auslöser von allergischen Reaktionen in sensibilisierten Patienten (54). Sowohl im PDV als auch im YJV liegen mit den Allergenen Pol d 1 und Ves v 1 Phospholipasen A1 vor. Diese stellen wichtige Markerallergene in der Abgrenzung von HBV-Allergien und PDV-/YJV-Allergien dar (14, 15). Aufgrund ihrer hohen Kreuzreaktivität können sie jedoch nicht herangezogen werden, um zwischen Sensibilisierungen gegen PDV und YJV zu unterscheiden (14, 84). Im Gift der

PDV PLA2 wurde mithilfe von *Spodoptera frugiperda* Insektenzellen rekombinant produziert. Sf9 Insektenzellen haben den Vorteil, dass sie Proteine erzeugen, die frei von kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten sind (17, 123).

In der von Grosch et al. durchgeführten Analyse des sIgE gegen PDV PLA2 wurden in 50 % der untersuchten PDV-monosensibilisierten Patienten Antikörper gegen PDV PLA2 festgestellt. Unter den PDV/YJV-DS lag der Grad der Sensibilisierung bei 30-35 %, unter den YJV-Patienten bei 30 %. Von 29 untersuchten HBV-Patienten zeigten vier (15 %) eine Sensibilisierung auf PDV PLA2. Bei diesen konnte auch sIgE gegen Api m 1 nachgewiesen werden. Da PDV PLA2 damit als potenzielles Majorallergen eingestuft wurde und nur geringe bis moderate Reaktivität in HBV- und YJV-allergischen Patienten vorlag, erfolgte anschließend die Untersuchung im Basophilenaktivierungstest im Rahmen der vorliegenden Studie (54).

Für diese Studie wurden 18 HBV- und YJV-Allergiker aus dem Großraum von München rekrutiert und BATs mit den Allergenen PDV PLA2 und Api m 1 untersucht. Eine Sensibilisierung dieser Patienten gegen PDV ist nicht vollständig auszuschließen, da die Untersuchung hierauf kein Teil der Routinediagnostik darstellt. Sie gilt aber als unwahrscheinlich.

Wie zu erwarten war, zeigten die Patienten in der Api m 1-Gruppe entsprechend ihrer Sensibilisierung gegen Api m 1 eine basophile Aktivierung als Reaktion auf die Stimulation mit Api m 1. Daneben zeigte auch P2, der zwar eine genuine DS auf HBV und YJV, jedoch keine Sensibilisierung auf Api m 1 aufweist, eine Aktivierung durch die Stimulation mit Api m 1 (vgl. Abb. 11). Insgesamt entspricht das 50 % der untersuchten Patienten (9 von 18).

Von allen Patienten zeigte lediglich ein Patient eine Aktivierung von basophilen Granulozyten durch die Stimulation mit der höchsten Konzentration von PDV PLA2 (vgl. Abb. 14 und 15). Diese lag mit 10,75 % allerdings nur knapp oberhalb des Cut-offs von 10 %. Aus diesem Grund wird diese Aktivierung als nicht relevant eingeschätzt. PDV PLA2 führte somit in der Gruppe zu keiner signifikanten Aktivierung.

Um diese Ergebnisse besser interpretieren zu können, war ein Vergleich mit einer Studienpopulation von PDV-Allergikern notwendig. Grosch et al. rekrutierten daher ebenfalls zwölf Patienten aus dem Großraum von Barcelona mit einer Allergie bzw. Sensibilisierung auf HBV, YJV und / oder PDV. Von diesen Patienten zeigten drei eine basophile Aktivierung durch Api m 1 (bei vorliegender HBV-Sensibilisierung), keiner aber durch die Stimulation mit PDV PLA2 (Abbildung 33) (54).

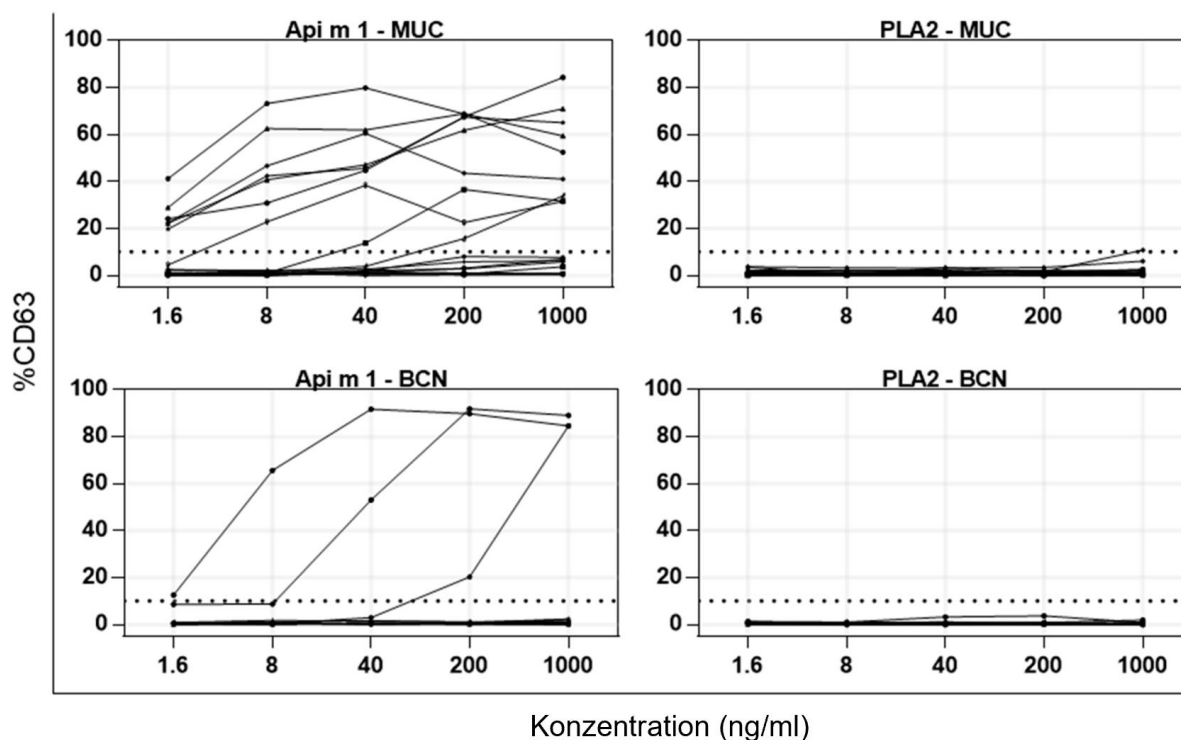


Abbildung 33: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit Api m 1 oder PDV PLA2. BAT mit 18 Patienten aus dem Großraum München (MUC) und 12 Patienten aus dem Großraum Barcelona (BCN) mit diagnostizierter Allergie oder Sensibilisierung auf HBV, YJV, HBV/YJV, PDV. Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 1 (links) und PDV PLA2 (rechts). Cut-off bei 10 % (gepunktete Linie) (54)

Zusammenfassend konnte also unabhängig vom Sensibilisierungsprofil, der diagnostizierten Insektengiftallergie oder dem Ort der Rekrutierung (Großräume München und Barcelona) keine Aktivierung im BAT durch PDV PLA2 beobachtet werden (54).

Da Api m 1 (HBV PLA2) dieselbe Reaktion wie PDV PLA2 katalysiert und zu klarer basophiler Aktivierung in den durchgeführten BATs geführt hat, können falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Daher scheint keine Kreuzreaktivität zwischen PDV PLA2 und Api m 1 vorzuliegen. Ebenso ist eine Kreuzreaktivität zu einer möglicherweise vorliegenden homologen PLA2 im YJV unwahrscheinlich (54).

Bezüglich der Einschätzung von PDV PLA2 als relevantes *Polistes dominula* Allergen sind Einschränkungen in der Aussagekraft der vorliegenden Studie zu diskutieren. Der Nachweis von sIgE in Patienten ist nicht immer direkt mit der Allergenität eines Proteins oder einer vorliegenden Allergie assoziiert. So zeigten Blank et al., dass eine Sensibilisierung gegen HBV / YJV bei bis zu 23,1 % / 31,7 % vorliegt, während es nur bei 2,8 % der Bevölkerung zu allergischen Reaktionen kommt (16).

Bei der PDV PLA2 könnten sowohl der vorliegende verlängerte N-Terminus als auch eine andere Oberflächenladung aufgrund der relativ geringen Sequenzhomologie von 45 % mit Api m 1 die Bindung von IgE erschweren und damit verantwortlich dafür sein, dass es zu keiner Aktivierung von Basophilen kommt (54).

Ein Nachteil der Studie aus Barcelona liegt darin, dass die PDV-Patienten nicht auf das Vorliegen von sIgE gegen PDV PLA2 untersucht wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Patienten gar nicht gegen PDV PLA2 sensibilisiert waren. Aufgrund der geringen Anzahl an Studienteilnehmern in den einzelnen Gruppen können die Beobachtungen außerdem nur als vorläufige Ergebnisse interpretiert werden (54).

Um eine abschließende Aussage darüber treffen zu können, ob PDV PLA2 ein Majorallergen darstellt, sind weitere Untersuchungen in einer größeren Kohorte notwendig. Außerdem sollten BATs gezielt an Patienten mit Sensibilisierung gegen PDV PLA2 durchgeführt werden.

4.1.3 Hyaluronidasen Api m 2, Pol d 2 und Ves v 2

Ähnlich wie Phospholipasen sind auch Hyaluronidasen häufige Bestandteile von Insektengiften. Sie wurden mittlerweile für insgesamt acht Hymenopterenarten beschrieben, darunter für *Apis mellifera* (Api m 2) und verschiedene Vespidae-Arten wie *Vespula vulgaris* (Ves v 2) und *Polistes dominula* (Pol d 2) (99).

Die Hyaluronidase Api m 2 stellt ein Majorallergen des HBV dar und verschiedene Studien gehen von einer Sensibilisierungsrate von 28-60 % aus (14, 71). Bei Ves v 2 dagegen handelt es sich um ein Minorallergen und nur etwa 10-15 % aller YJV-Patienten zeigten sIgE gegen Ves v 2 (65). Kolarich et al. gelang es neben der aktiven Hyaluronidase Ves v 2.0101 eine inaktive Variante (Ves v 2.0201) zu identifizieren, die eine Mutation im aktiven Zentrum aufweist. Sie repräsentiert die dominierende Isoform. Beide Varianten weisen zu etwa 59 % dieselbe Sequenz auf (72). Api m 2 ist mit Ves v 2.0101 zu 53 % und mit Ves v 2.0201 zu 44 % sequenzhomolog (14).

Daneben existiert auch im PDV eine Hyaluronidase, über die bisher klinisch nur wenig bekannt war. In einer Analyse der Gifte von *Polistes dominula* und *Vespula spp.* identifizierten und charakterisierten Grosch et al. die Hyaluronidase Pol d 2. Sie ist zu 53 % sequenzhomolog mit Api m 2, zu 74 % mit Ves v 2.0101 und zu 57 % mit Ves v 2.0201 (56). Durch die Sequenzhomologie ergibt sich eine ähnliche Faltung der Proteine in ihrer Tertiärstruktur (Abbildung 34) (14).

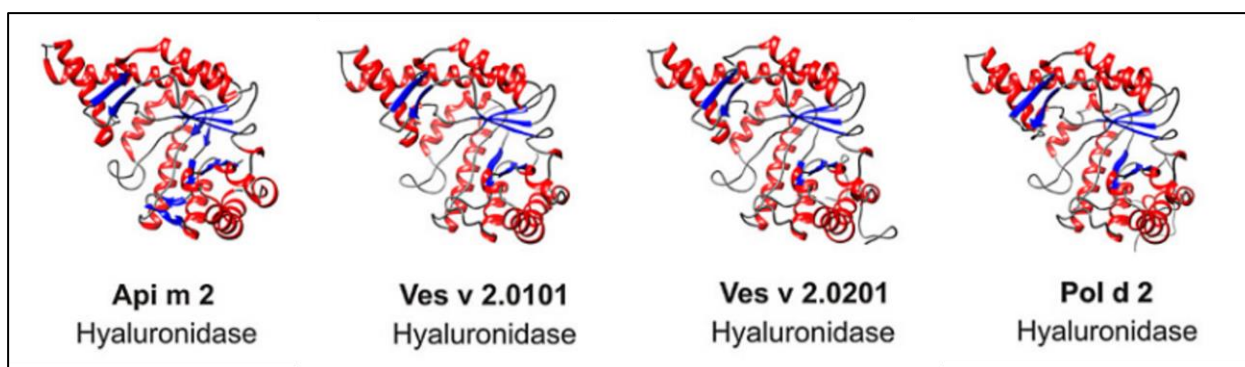


Abbildung 34: Dreidimensionale Struktur der Hyaluronidasen Api m 2, Ves v 2.0101, Ves v 2.0201 und Pol d 2 (14)

Die Sensibilisierung gegen Pol d 2 unter Hymenoptereingiftallergikern ist noch nicht ausreichend beschrieben. Unveröffentlichte Studiendaten gehen davon aus, dass etwa 40-45 % aller PDV-Allergiker sIgE gegen Pol d 2 aufweisen. Unter HBV- und YJV-Patienten war der Grad der Sensibilisierung deutlich geringer. Kreuzreaktivität von Pol d 2 mit Api m 2 und Ves v 2 ist denkbar. Diese vorläufigen Ergebnisse sprechen aber als erstes Indiz gegen eine ausgeprägte Kreuzreaktivität (14, 55).

Um die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität von Pol d 2 mit den homologen Allergenen Api m 2 und Ves v 2 zu adressieren, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie eine Untersuchung der Allergene im Basophilenaktivierungstest. Hierfür wurden 17 HBV- und YJV- Allergiker aus dem Großraum München rekrutiert und BATs mit den Allergenen Api m 2, Pol d 2 und Ves v 2b (rekombinant hergestellt durch das Helmholtz Zentrum in München) durchgeführt. Eine Sensibilisierung dieser Patienten gegen PDV ist nicht vollständig auszuschließen, da die Untersuchung hierauf kein Teil der Routinediagnostik darstellt. Sie gilt aber als unwahrscheinlich.

Wie zu erwarten war, zeigte die Mehrheit der Patienten, die auf Api m 2 sensibilisiert waren (Api m 2-Gruppe), eine Aktivierung basophiler Zellen oberhalb des Cut-offs als Reaktion auf eine Stimulation mit Api m 2 (6 von 10 Patienten) (vgl. Abb. 17). Daneben zeigte auch ein YJV-Allergiker (P11) bei vorliegender Sensibilisierung gegen Api m 2 eine Aktivierung im BAT (vgl. Abb. 16). Eine HBV-Allergie lag hier allerdings nicht vor.

Unter den vier Patienten der Api m 2-Gruppe, die nicht auf Api m 2 reagierten, zeigten zwei Patienten trotz vorliegender Sensibilisierung auch keine Aktivierung durch die Stimulation mit HBV oder Api m 1. Positive Anamnese, Intrakutantestung und die Bestimmung von sIgE bewiesen bei diesen Patienten jedoch die Diagnose einer Bienengiftallergie. Die negativen Ergebnisse im

BAT wurden daher trotz ausreichender Negativ- und Positivkontrollen als nicht aussagekräftig eingeschätzt.

Im Gegensatz dazu führten Stimulationen mit Pol d 2 und Ves v 2b weder unter HBV- oder YJV-Allergikern noch unter Patienten mit HBV-/YJV-DS zu einer Aktivierung oberhalb des Cut-offs. Die geringfügigen Aktivierungen zwischen 5 und 10 % wurden als nicht relevant eingeschätzt.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie also unabhängig vom Sensibilisierungsprofil oder der diagnostizierten Insektengiftallergie der Patienten keine Aktivierung im BAT durch die PDV Hyaluronidase Pol d 2 beobachtet werden. Ebenso kam es zu keiner Aktivierung durch die YJV Hyaluronidase Ves v 2b. Da das homologe Allergen Api m 2 zu klarer basophiler Aktivierung im BAT geführt hatte, könnten falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Damit ist davon auszugehen, dass Pol d 2 nicht oder nur geringfügig kreuzreaktiv mit Api m 2 und Ves v 2b ist.

Bezüglich möglicher Kreuzreaktivität zwischen Api m 2 und Ves v 2 gab es in der Vergangenheit schon einige Untersuchungen. Aufgrund der Sequenzhomologie und ähnlicher Tertiärstruktur wäre diese denkbar und wurde lange als eine der wahrscheinlichen Ursachen der Kreuzreaktivität zwischen HBV und YJV gesehen (14). In der Zwischenzeit konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Kreuzreaktivität hauptsächlich auf CCDs zurückzuführen ist und peptid-spezifische Kreuzreaktivität nur in wenigen Fällen auftritt (65, 123).

Die fehlende Kreuzreaktivität von Api m 2 und Ves v 2 könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Moleküle unterschiedliche Oberflächenstrukturen und -ladungen und damit andere IgE-Epitope aufweisen (82, 126). Dies würde die Bindung von IgE von homologen Allergenen erschweren. Analog hierzu ist dieser Mechanismus auch für die fehlende serologische Kreuzreaktivität von Api m 2 und Pol d 2 denkbar und würde die negativen Ergebnisse im BAT erklären.

Für die YJV-Hyaluronidase Ves v 2 kommt noch hinzu, dass es sich im Gegensatz zu Api m 2 um ein Minorallergen mit einem Sensibilisierungsgrad von nur etwa 10-15 % handelt (65, 84). Hierdurch ist es unwahrscheinlich, in einer kleinen Stichprobe wie in dieser Studie reaktive Patienten zu finden. Es ist daher davon auszugehen, dass die in dieser Studie untersuchten YJV-Allergiker vermeintlich nicht gegen Ves v 2 sensibilisiert waren.

Um die getroffene Aussage zur fehlenden Kreuzreaktivität von Pol d 2 und Ves v 2 zu validieren, wäre es also notwendig, gezielt YJV-Patienten zu untersuchen, die in der Bestimmung des sIgE

eine Sensibilisierung gegen Ves v 2 vorweisen. Anders als Ves v 1 und Ves v 5 ist die Hyaluronidase Ves v 2 bisher jedoch kommerziell nicht erhältlich und für die Routinediagnostik daher nicht zugänglich (14). Gerade beim YJV-Allergiker P11, der sIgE und basophile Aktivierung auf Api m 2 zeigte (nicht aber auf HBV), hätte die Untersuchung auf sIgE gegen Ves v 2 zusätzliche Erkenntnisse liefern können.

Daneben sollten ähnliche Untersuchungen an PDV-Allergikern mit einer Sensibilisierung gegen Pol d 2 durchgeführt werden. Ohne diese ist eine endgültige Einordnung von Pol d 2 innerhalb der bekannten *Polistes*-Allergene nicht möglich. Wie für die PDV PLA2 gilt auch für die Hyaluronidase Pol d 2, dass der Nachweis von sIgE in Patienten nicht direkt mit der Allergenität des vorliegenden Allergens assoziiert sein muss (vgl. Kapitel 4.1.2).

Aufgrund der geringen Anzahl an Studienteilnehmern können die hier gemachten Beobachtungen also nur als vorläufige Ergebnisse interpretiert werden. Für eine abschließende Aussage darüber, ob Pol d 2 ein für die Diagnostik relevantes PDV-Allergen darstellt, sind weitere Untersuchungen in einer größeren Kohorte mit definierten Sensibilisierungsprofilen notwendig.

4.1.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Da die spezifische Immuntherapie bis heute die einzige kurative Therapie von Hymenoptereingiftallergien darstellt, ist eine möglichst genaue diagnostische Identifizierung des auslösenden Insekts zwingend notwendig. Auch wenn man anhand dieser Studie vermuten kann, dass die Allergene PDV PLA2 und Pol d 2 keine Kreuzreaktivität mit den homologen Allergenen von *Apis mellifera* und *Vespula spp.* aufweisen, stellen sie aller Voraussicht nach nicht den Durchbruch in der PDV-Allergiediagnostik dar.

Es ist davon auszugehen, dass beide Allergene nicht als Markerallergene zur Unterscheidung von YJV- und PDV-Allergien genutzt werden können. Darüber hinaus bleibt unklar, ob PDV PLA2 und Pol d 2 überhaupt relevante PDV Allergene darstellen. Zwar deuten die in Studien ermittelten Sensibilisierungsraten darauf hin (PDV PLA2 > 50 %; Pol d 2 > 40 %), aber die Sensibilisierung allein ist hierfür nicht ausschlaggebend (14, 16, 54).

Daten zum PDV Proteom zeigen, dass es nur wenig weitere vielversprechende Allergene gibt, die sich in der Zukunft als Markerallergene herausstellen könnten (56). So untersuchten Grosch et al. neben der PDV PLA2 noch die beiden Minorallergene Immune Responsive Protein 30 (IRP30) und Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGFC), die Sensibilisierungsraten von 20-40 %

zeigten. Doch diese beiden Allergene zeigten nur wenig Relevanz in der sIgE-Bindung und der Fähigkeit basophile Zellen zu aktivieren (54).

Vor dem Hintergrund der aktuellen Forschung wird sich die Diagnose von PDV-Allergien in der Zukunft vor allem auf die bekannten kreuzreaktiven Allergene Antigen 5, Phospholipase A1, Dipeptidyl Peptidase IV und ggf. den Hyaluronidasen konzentrieren müssen (14, 54). Von diesen ist für PDV aktuell lediglich Pol d 5 kommerziell (als Singleplex Assay) erhältlich (14). Eine Ausweitung dieses Angebots ist in jedem Fall sinnvoll, um der Routinediagnostik mehr Allergene verfügbar zu machen und einen kombinierten Einsatz dieser zu ermöglichen.

Bereits vor einigen Jahren konnten Monsalve et al. in einer Studie zeigen, dass durch die Messung der relativen Level von Pol d 1 und Pol d 5 bzw. Ves v 1 und Ves v 5 auch ohne das Vorhandensein von Markerallergenen für PDV in 69 % das allergieauslösende Insekt bei potenziell doppelsensibilisierten Patienten bestimmt werden konnte (84). Auch in einer kleineren Studie von Galindo-Bonilla et al. reichte die Bestimmung von sIgE gegen diese Allergene aus, um das relevante Hymenoptereingift für die SIT festzulegen (50).

Eine Studie von Savi et al. dagegen zeigte, dass die CRD bei der Unterscheidung von PDV- und YJV-Allergien hinter der Genauigkeit von CAP-Inhibitions-Assays zurückliegt. Eine valide Aussage anhand der sIgE-Level konnte nur in den Fällen getroffen werden, in denen sich die Werte mindestens um das Doppelte unterschieden. (118). Auch Caruso et al. sprachen sich für eine Nutzung von CAP-Inhibitions-Assays zur Unterscheidung von PDV- und YJV-DS aus (25).

Eine weitere Relativierung der Aussagekraft von Ves v 5 und Pol d 5 erfolgte durch eine Studie von Quercia et al., die nur wenig Übereinstimmung zwischen der Pol d 5/Ves v 5-Ratio und CAP-Inhibitions-Tests fand. Auch die von Savi et al. postulierten doppelten Werte von Pol d 5 oder Ves v 5 führten hierbei zu keiner Verbesserung der Übereinstimmung (98).

Eberlein et al. untersuchten in einer Studie an spanischen und deutschen Insektengiftallergikern die kreuzreaktiven Dipeptidyl Peptidasen Ves v 3 und Pol d 3. Ein Vergleich der sog. area under the dose-response curve (AUC) zeigte dabei, dass die AUC bei auf Ves v 3 und Pol d 3 doppelt-positiven spanischen Patienten signifikant höher war als bei doppelt-positiven deutschen Patienten. Dies könnte auf die primäre Sensibilisierung mit PDV hindeuten. Die Untersuchung der AUC im BAT mit Ves v 3 und Pol d 3 könnte damit zukünftig weitere Hinweise auf das relevante Hymenoptereingift bieten (41).

Insgesamt bleibt die Interpretation in der Diagnostik von PDV- und YJV-Allergien nach wie vor eine Herausforderung. Um diese zu überkommen, ist weitere Forschung notwendig. Bis alternative Möglichkeiten vorhanden sind, wird zur Unterscheidung von PDV- und YJV-Allergien aktuell neben der Bestimmung von sIgE gegen Pol d 1 / Ves v 1 und Pol d 5 / Ves v 5 empfohlen, in unklaren Fällen den Basophilenaktivierungstest und CAP-Inhibitions-Assays durchzuführen. Die finale Diagnose sollte dann in der Zusammenschau aller Ergebnisse erfolgen (14).

Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse die Aussagekraft von PDV PLA2 und Pol d 2 in der Diagnostik von PDV- und YJV-Allergien in Frage stellen, können sie dazu beitragen, sowohl die molekularen Mechanismen hinter Hymenoptereingiftallergien als auch mögliche Faktoren, die die Allergenität von Proteinen beeinflussen, besser zu verstehen (54).

4.1.5 Vergleich der Aktivierung durch Api m 1 und HBV

Durch den Einsatz rekombinanter Allergene im Rahmen der CRD konnten große Fortschritte verzeichnet werden (15). Studien zeigten, dass der kombinierte Einsatz der Allergene Ves v 1 und Ves v 5 in der Bestimmung des sIgE mit 92-98 % eine höhere diagnostische Sensitivität aufweist als die Untersuchung auf sIgE gegen YJV. Unter Patienten, die im sIgE negativ auf YJV waren, zeigten teilweise bis zu 85 % sIgE gegen Ves v 5 (44, 65, 77, 132). Außerdem verbesserte sich die Diagnostik durch den Einsatz von YJV, das mit zusätzlichem Ves v 5 versehen wurde (sog. Spiking) (137).

Für das HBV-Majorallergen Api m 1 liegt die Sensitivität auf gängigen Immunoassays zwischen 58 und 80 % (61, 71, 76). Dieser Wert konnte durch die Erweiterung um Api m 2, Api m 3, Api m 4, Api m 5 sowie Api m 10 auf 94,4 % gesteigert werden (71).

Anders als in der Diagnostik von YJV-Allergien ist noch unklar, inwiefern die Diagnostik von Bienengiftallergien durch den Einsatz von rekombinanten Allergenen im Vergleich zum alleinigen Nutzen von HBV optimiert werden kann. So führte in einer Studie von Rafei-Shamsabadi et al. der Einsatz von rekombinanten Allergenen bei Patienten mit positiver Anamnese aber ohne sIgE gegen HBV zu keiner Verbesserung (100). Cifuentes et al. wiederum konnten mithilfe der Bestimmung von sIgE gegen rekombinante Allergene eine genauere Diagnostik erzielen (28).

In unklaren Fällen (wie z.B. bei serologisch negativen Patienten mit eindeutiger Anamnese) stellt die zelluläre Testung mithilfe des BATs ein zusätzliches diagnostisches Instrument dar. So

konnten in Studien bei 60-80 % serologisch negativer Patienten mithilfe des BATs eine basophile Aktivierung durch Stimulation mit Insektengift nachgewiesen werden (34, 74).

Von einigen Autoren wird davon ausgegangen, dass der Basophilenaktivierungstest der Bestimmung von sIgE gegen einzelne rekombinante Allergene überlegen ist (75). Anders als in der sIgE-Bestimmung gibt es bisher aber kaum Untersuchungen, die den Einsatz von rekombinanten Allergenen im BAT mit dem von Gesamtextrakten vergleichen. Es wird vermutet, dass hierdurch weitere Fortschritte in der Allergiediagnostik verzeichnet werden könnten (5, 60).

Vor diesem Hintergrund stellen sich einige Nebenbefunde dieser Studie als besonders interessant dar. Im Zuge der Testung von Patienten auf die Phospholipasen PDV PLA2 und Api m 1 wurden insgesamt elf HBV-Allergiker bzw. Patienten mit genuiner HBV-/YJV-DS im BAT auf basophile Aktivierung durch Stimulation mit HBV und dem rekombinanten Allergen Api m 1 untersucht. Zehn der Patienten wiesen im sIgE eine Sensibilisierung auf Api m 1 auf (Api m 1-Gruppe).

In der Api m 1-Gruppe reagierten alle Patienten stärker auf individuelle Konzentrationen von Api m 1 als auf HBV in einer Standardkonzentration von 284 ng/ml (vgl. Abb. 23). Die mittlere Aktivierung (\pm SD) für Api m 1 in einer Konzentration von 200 ng/ml lag zum Beispiel bei 36,8 (\pm 23,5) %, während HBV in einer Konzentration von 284 ng/ml zu einer mittleren Aktivierung (\pm SD) von 32,3 (\pm 27,5) % führte.

Um die Signifikanz der beobachteten Unterschiede der Aktivierungen durch Api m 1 und HBV zu überprüfen, wurden Zweistichproben T-Tests für die individuellen Konzentrationen durchgeführt (vgl. Tabelle 18 in Kapitel 3.1.6). Hierbei zeigte sich, dass sich die gemessenen Aktivierungen durch Api m 1 für die Konzentrationen von 1000-8 ng/ml nicht signifikant von denen durch HBV unterschieden. Das Signifikanzniveau lag in allen Fällen über 0,05. Die Nullhypothese, dass kein Unterschied vorliege, ließ sich damit nicht verwerfen. In der Konzentration von 1,6 ng/ml zeigte sich sogar, dass die gemessene Aktivierung signifikant geringer war als durch HBV in einer Konzentration von 284 ng/ml.

Dennoch war interessant, dass zwei Patienten (P14 und P15) lediglich für Api m 1 basophile Aktivierung oberhalb des Grenzwerts zeigten und HBV zu keiner Aktivierung führte. Daneben führte Api m 1 bei zwei weiteren Patienten (P13 und P18) zu einer Aktivierung, die zwar unterhalb des Cut-offs von 10 % blieb, aber höher ausfiel als die Aktivierung durch HBV (vgl. Abb. 23). Bei diesen Patienten zeigte sich auch in der Intrakutantestung und in der Bestimmung des sIgE eine HBV-Sensibilisierung (vgl. klinische Daten im Anhang).

Es ist also davon auszugehen, dass bei diesen Patienten der Einsatz von Api m 1 im BAT aussagekräftiger für die Diagnosestellung war als die Anwendung des Gesamtextrakts von HBV. Allgemein könnte der Einsatz von rekombinanten Allergenen im BAT die Diagnose von HBV-Allergien verbessern, da alle Patienten stärker auf individuelle Konzentrationen des rekombinanten Allergens Api m 1 reagierten (vgl. Tabelle 17).

Des Weiteren ist auffällig, dass einer der HBV-/YJV-DS Patienten (P2) in der Bestimmung des sIgE keine Sensibilisierung auf Api m 1 zeigt, im BAT aber auf Api m 1 mit einer deutlichen Aktivierung reagierte. Diese lag höher als die Aktivierung nach Stimulation mit HBV. Außerdem zeigte er auch eine Aktivierung durch Api m 2, für das auch sIgE nachgewiesen wurde. Bei diesem Patienten scheint die Anwendung von rekombinanten Allergenen im BAT genauer zu sein als die Bestimmung von sIgE gegen die rekombinanten Allergene.

Jedoch werden die beobachteten Ergebnisse dadurch eingeschränkt, dass in dieser Studie nur eine Konzentration von HBV (284 ng/ml) verwendet wurde. Für konkretere Aussagen zum Vergleich des Einsatzes von Gesamtextrakt und rekombinanten Allergenen müssten in einer weiteren Studie verschiedene Konzentrationen von HBV mit Api m 1 verglichen und Dosis-Wirkungskurven erstellt werden.

Um die Spezifität und Sensitivität von rekombinanten Allergenen in der Bestimmung von sIgE und im BAT zu untersuchen, führte die Gruppe von Balzer et al. 2014 eine Studie an YJV-Allergikern durch, in der sie die rekombinanten Allergene Ves v 1, Ves v 2, Ves v 3 und Ves v 5 einsetzte. Hierbei sollte auch die Aussagekraft von rekombinanten Allergenen im BAT im Vergleich zum alleinigen Einsatz von YJV untersucht werden (5).

Während der BAT mit Gesamtextrakt in der Studie eine Spezifität von 94,1 % bei einer Sensitivität von 68,3 % erreichte, übertraf der Einsatz von Ves v 5 im BAT diese Werte mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 80 %. Auffällig war, dass einige Patienten, die nicht auf das Gesamtextrakt reagierten, lediglich Aktivierung durch Stimulation mit rekombinanten Allergenen zeigten. Gleichzeitig reagierten manche Patienten nur auf YJV und nicht auf die rekombinanten Allergene (5).

Daneben waren die rekombinanten Allergene im BAT deutlich spezifischer als in der Bestimmung von sIgE. Als mögliche Gründe führen die Autoren technische Limitationen des ImmunoCAP und die Unterscheidung zwischen atopischem und allergischem Status von Patienten auf, bei der der Nachweis von sIgE nicht zwingend mit einer Hymenoptereingiftallergie zusammenhängen muss

(5, 133). Es ist davon auszugehen, dass der BAT eine deutlich physiologischere Interaktion zwischen Allergen und sIgE *in vitro* erlaubt.

Zusammenfassend führte der Einsatz von rekombinanten Allergenen zu einer verbesserten Spezifität und Sensitivität des BATs im Vergleich zur sIgE-Bestimmung und innerhalb des BATs zu besseren Ergebnissen als die alleinige Anwendung von YJV. Daher empfahlen Balzer et al. in ihrer Veröffentlichung den kombinierten Einsatz von rekombinanten Allergenen und Gesamtextrakten im BAT (5).

Sowohl die Studie von Balzer et al. als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass der Einsatz von rekombinanten Allergenen im Rahmen des BAT zu weiteren Fortschritten in der Allergiediagnostik führen und gerade in bisher unklaren Fällen eine klarere Diagnose ermöglichen könnte als die alleinige Anwendung von Gesamtextrakten im BAT. Besonders interessant könnte dies vor dem Hintergrund eines von Koren et al. in einer Studie erprobten Multiplex BAT sein, der es ermöglicht, mehrere Allergene in einem Ansatz zu untersuchen (73).

Aufgrund des geringen Umfangs der Studienteilnehmer (zehn Patienten in der Api m 1-Gruppe) sind die Ergebnisse dieser Studie nur als vorläufige Hinweise zu interpretieren. Zur Bestätigung der getroffenen Vermutung ist es notwendig, die Aktivierung durch Api m 1 und HBV in verschiedenen Konzentrationen an einer größeren Anzahl an Patienten zu vergleichen. Daneben könnte eine Untersuchung von serologisch negativen HBV-Patienten im BAT mit rekombinanten Allergenen und Gesamtextrakt im Vergleich weitere Erkenntnisse liefern.

4.2 Vergleich von Testverfahren für den Basophilenaktivierungstest

4.2.1 Übersicht über erhältliche Basophilenaktivierungstests

Der Basophilenaktivierungstest beruht auf der durchflusszytometrischen Analyse der Aktivierung von basophilen Granulozyten nach Stimulation durch Allergene. Hierfür werden bestimmte Oberflächenantigene von basophilen Granulozyten mithilfe von Markern gekennzeichnet. Seit der Erstbeschreibung in den 1990er-Jahren wurden verschiedene Marker gefunden, die zur Identifizierung und zur Messung der Aktivierung von Basophilen genutzt werden können.

Zu den gängigen Identifizierungsmarkern werden Anti-CCR3, Anti-CRTH2 mit Anti-CD3 und Anti-CD45, Anti-IgE, Anti-CD123 in Kombination mit Anti-HLA-DR und Anti-CD203c gezählt.

Der basophilenspezifische Marker CD203c kann ebenso wie CD63 als Aktivierungsmarker genutzt werden (42).

In den letzten Jahren wurde versucht, die Spezifität und Sensitivität der verschiedenen Marker zu vergleichen, so auch von Eberlein et al. (39). Die Frage, welche Marker sich am besten für den BAT eignen, ist jedoch nicht abschließend geklärt. Aus der Bandbreite der zur Verfügung stehenden Marker ergeben sich verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. So beruhen kommerziell erhältliche Basophilenaktivierungstests teils auf dem Einsatz von unterschiedlichen Markern (42). Eine Auswahl von aktuell erhältlichen BATs und die von ihnen genutzten Markern ist in Tabelle 24 zu sehen.

Tabelle 24: Auswahl kommerziell erhältlicher Basophilenaktivierungstests und deren Marker (42)

| Name | Genutzte Marker | Messung der Aktivierung |
|--|--|------------------------------------|
| Allergenicity Kit, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland | Anti-CRTH2, Anti-CD3, Anti-CD203c | % CD203c ^{bright} |
| BasoFlowEx®Kit, EXBIO Praha, Vestec, Tschechische Republik | Anti-CD203c, Anti-CD63 | % CD63+ |
| BASOTEST™, GLYCOTOPE, Heidelberg, Deutschland | Anti-IgE, Anti-CD63 | % CD63+ |
| Flow CAST®, BÜHLMANN Laboratories, Allschwil, Schweiz | Anti-CCR3, Anti-CD63 | % CD63+ |
| Flow CAST® highsens, BÜHLMANN Laboratories, Allschwil, Schweiz | Anti-CCR3, Anti-CD63, Anti-CD203c | % CD63+ & CD203c ^{bright} |
| Dura Clone IF Basophil Activation®, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland | Anti-CD45, Anti-CD3, Anti-CRTH2, Anti-CD203c | % CD63+ & CD203c ^{bright} |

Kliniken und Labore stehen damit vor der Herausforderung, sich für eines der für die Diagnostik vorhandenen Testsysteme zu entscheiden. Zugleich wird das bestehende Angebot an BATs immer wieder erweitert, sodass bei neu auf den Markt kommenden Tests abgewogen werden sollte, ob ein Umstieg ggf. Sinn macht. An der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie wird seit längerer Zeit der Flow CAST® der Firma Bühlmann Laboratories AG eingesetzt, der die Kombination aus den Markern Anti-CCR3 und Anti-CD63 nutzt.

Die Firma Beckman Coulter Inc. stellte 2018 ein neues Test-Kit für den Basophilenaktivierungstest vor. Dieses nutzt mit Anti-CD45, Anti-CD3, Anti-CRTH2 und Anti-CD203c gleich mehrere Marker zur Identifizierung von basophilen Granulozyten. Die Messung der Aktivierung erfolgt mithilfe der Kombination von Anti-CD203c und Anti-CD63. Außerdem kommen die mit Fluorochromen konjugierten Antikörper nicht über ein Färbereagenz zur Probe, sondern liegen gebunden am Boden der Reagenzgefäße vor (6).

Der Test sollte damit einfacher in der Durchführung sein und Fehlerquellen reduzieren. Neben einer schnelleren Anwendung sollten die Ergebnisse außerdem vergleichbar mit denen von bereits erhältlichen Testsystemen sein. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde innerhalb dieser Studie der neue Dura Clone IF Basophil Activation® etabliert und anhand einer Studienpopulation von 17 Patienten, die mehrheitlich HBV-/YJV-DS waren, mit dem bereits in der Routine angewendeten Flow CAST® verglichen. Zum Einsatz kamen die Allergene HBV und YJV. Aus der Studie sollte eine Beurteilung der Praktikabilität des Dura Clone IF Basophil Activation® für den Einsatz in der Diagnostik erfolgen.

4.2.2 Etablierung des Dura Clone IF Basophil Activation®

Im Rahmen der Studie wurde der Dura Clone IF Basophil Activation® gemäß den Angaben der Gebrauchsanweisung durchgeführt (6). Lediglich im letzten Schritt vor der Analyse wurde die Durchführung abgewandelt und die Zellen nicht in 500 µl PBS mit 0,1 % Formaldehyd sondern in 300 µl PBS Puffer suspendiert. Dies entsprach dem Volumen, das im Flow CAST® zur Suspension genutzt wurde (300 µl Puffer).

Die Durchführung erfolgte beim ersten Patienten ohne die vom Hersteller als optional vorgegebene Waschung der Probe. Bei allen weiteren Patienten wurde dieser Waschschrift durchgeführt. Außerdem wurde im späteren Verlauf der Studie bei insgesamt elf Patienten neben der Positivkontrolle des Dura Clone IF Basophil Activation® (Anti-IgE) in einem zusätzlichen Röhrchen noch die Positivkontrolle des Flow CAST® (Anti-FcεRI mAK) getestet.

Notwendigkeit der Waschung

Laut Angaben des Herstellers ist die Waschung beim Dura Clone IF Basophil Activation® optional und muss nicht durchgeführt werden, womit der Test wesentlich schneller in der Anwendung sein soll. Im Rahmen dieser Studie wurde der erste Versuch daher ohne Waschung durchgeführt.

Zwar verkürzte sich damit die Durchführungszeit, da die Probe nicht zentrifugiert werden musste (5 min), jedoch führte dies zu einer deutlich längeren Auswertungszeit am FACS (60 min im Vergleich zu einem Mittel von 25:10 min für gewaschene Proben). Darüber hinaus wurde das Gating der Probe erschwert, da vermutlich Zelldebris die Analyse durch das FACS behinderte.

Daher wurde geschlussfolgert, dass die Waschung für aussagekräftige Ergebnisse durchgeführt werden sollte. Zu einer ähnlichen Empfehlung kamen auch Depince-Berger et al. in einer Studie über die Testsysteme BasoflowEx® und FlowCast®. Die Waschung und damit verbundene Erhöhung der Zellkonzentration verkürzte hier die Analysezeit und verringerte die sog. Signal-to-Noise Ratio, wodurch die Analyse insgesamt verbessert wurde (31).

Um diese Hypothese auch für den Dura Clone IF Basophil Activation® zu überprüfen, hätten noch mehr Proben mit und ohne Waschung analysiert und deren Ergebnisse verglichen werden müssen. Da dies aufgrund der begrenzten Ressourcen in dieser Studie nicht möglich war, wurden die übrigen Proben ohne weitere Überprüfung der Hypothese mit Waschung analysiert.

Ausschluss von Patienten mit hohen Werten in der Negativkontrolle im Dura Clone IF Basophil Activation®

Die Ergebnisse des Dura Clone IF Basophil Activation® von fünf untersuchten Patienten (P5, P21, P30, P31 und P33) mussten aufgrund deutlicher Aktivierung der Leerwerte als nicht aussagekräftig verworfen werden (vgl. Kapitel 3.2.4 und Abbildung 24). Der zur Ursachenfindung durchgeführte manuelle Testansatz, bei dem der Dura Clone IF Basophil Activation® mit externen Markern nachgestellt wurde, zeigte wiederum verwertbare Ergebnisse (vgl. Tabelle 19).

Dieser zusätzliche Ansatz und die Tatsache, dass der Flow CAST® für diese Patienten valide Ergebnisse lieferte, lässt die Ursache für die generelle Aktivierung in den Reagenzgefäßen des Dura Clone IF Basophil Activation® vermuten. Da im manuellen Ansatz und auch bei den Patienten mit verwertbaren Ergebnissen im Dura Clone IF Basophil Activation® dieselben

Reagenzien verwendet wurden (Activation Solution, Optilyse C und PBS-Puffer), können diese als Ursache ausgeschlossen werden.

Laut Gebrauchsanweisung des Dura Clone IF Basophil Activation® enthalten sowohl die Kontroll- als auch Teströhrchen Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin; BSA) (6). Patienten die reaktiv auf BSA sind, könnten im BAT aufgrund des Vorliegens von Antikörpern gegen BSA eine unspezifische Aktivierung zeigen (27). Die beobachtete Aktivierung in den Leerwerten könnte somit auf das in den Röhrchen vorhandene BSA zurückzuführen sein.

Doch auch wenn eine Sensibilisierung gegen BSA unter anderem unter Kuhmilch- oder Tierhaarallergikern beobachtet werden kann, scheint die Sensibilisierungsrate in der allgemeinen Bevölkerung gering zu sein (27, 131). Scala et al. fanden in einer großen Kohorte von 16.408 Allergikern in Italien in nur 3,6 % aller untersuchten Patienten sIgE gegen BSA (119). Aufgrund ausgesprochener Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Serumalbuminen von Säugetieren könnten die Patienten auch eine Sensibilisierung auf Serumalbumin von anderen Tieren vorweisen (27). Dennoch erscheint es vor diesem Hintergrund unwahrscheinlich, dass bei allen fünf betroffenen Patienten in dieser Studie (30 % der gesamten Studiengruppe) das in den Röhrchen vorhandene BSA der Grund für die Aktivierung war.

Für eine abschließende Aussage hätte eine Untersuchung der betroffenen Proben auf sIgE gegen BSA und ggf. ein Flow CAST® BAT mit rekombinanten BSA weitere Erkenntnisse liefern können. Ohne eine Untersuchung der Patienten auf eine Sensibilisierung gegen BSA kann dessen Vorhandensein nicht als Grund für die Aktivierung ausgeschlossen werden.

Eine weitere Hypothese ist, dass die am Boden der Reagenzgefäße immobilisierten Marker die basophilen Granulozyten näher zusammenbringen. Hierdurch könnte sich die Wahrscheinlichkeit eines Cross-Linkings erhöhen. Okamoto-Uchida et al. konnten in einer Studie zeigen, dass immobilisierte Antigene in Allergietests mit fester Phase (wie dem ImmunoCAP) zu vermehrtem IgE-Cross-Linking und damit zu falsch-positiven Ergebnissen führen können (87). Da in dieser Studie jedoch immobilisierte Antigene untersucht wurden, lassen sich die Ergebnisse nicht direkt auf die vorliegende Fragestellung übertragen. Im Dura Clone IF Basophil Activation® sind lediglich die zur Markierung mit Fluorochromen konjugierten Antikörper immobilisiert. Nach Zugabe der Reagenzien werden sie aller Voraussicht nach vom Boden der Reagenzgefäße gelöst. Außerdem ist für ein IgE-Cross-Linking nach wie vor das Vorhandensein von Allergenen notwendig. In den Leerwerten wurde jedoch kein Allergen hinzugefügt.

Abschließend lässt sich sagen, dass für die im Rahmen dieser Studie beobachteten Ergebnisse von Patienten mit genereller Aktivierung im Dura Clone IF Basophil Activation® keine plausible Erklärung gefunden werden konnte. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um diesen Sachverhalt zu adressieren.

Einsatz der Positivkontrolle Anti-FcεRI mAK im Dura Clone IF Basophil Activation®

Bei elf Patienten wurde neben der Positivkontrolle Anti-IgE des Dura Clone IF Basophil Activation® zusätzlich die Kontrolle Anti-FcεRI mAK des Flow CAST® angewandt. Unter den sieben auswertbaren Patienten wurde im Mittel (\pm SD) eine Aktivierung von 78,1 (\pm 10,3) % erreicht (im Flow CAST® lag die Aktivierung bei 88,2 (\pm 4,5) %). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch Anti-FcεRI eine geeignete Positivkontrolle für den Dura Clone IF Basophil Activation® darstellt. Zu beachten ist, dass die Konzentration nicht der im Flow CAST® entsprach. Aufgrund des Verhältnisses der Reagenzien betrug die Konzentration im Dura Clone IF Basophil Activation® das 2,2-fache.

Vergleich der Positivkontrolle Anti-IgE mit Anti-FcεRI mAK

Da der Dura Clone IF Basophil Activation® mit Anti-IgE eine andere Positivkontrolle als der Flow CAST® verwendet, stellte sich die Frage, ob sich die beiden Kontrollen in ihren Ergebnissen signifikant unterscheiden. Daher wurden die durch die Positivkontrollen hervorgerufenen basophilen Aktivierungen verglichen. Es fiel auf, dass Anti-FcεRI mAK im Flow CAST® in allen Proben zu höheren Aktivierungen führte als Anti-IgE im Dura Clone IF Basophil Activation® (vgl. Abb. 28 und Anhang). Die Signifikanz ($p < 0,05$) der beobachteten Unterschiede konnte mithilfe eines Zweistichproben T-Tests nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 22).

Anti-FcεRI mAK, das an die Fc-Region von IgE bindet, scheint gezielter zu basophiler Aktivierung zu führen als Anti-IgE. Es ist jedoch anzumerken, dass auch die Positivkontrolle Anti-IgE im Dura Clone IF Basophil Activation® bei allen 10 Patienten zu verwertbaren Ergebnissen und Aktivierungen oberhalb des Cut-offs führte. Damit stellen sowohl Anti-FcεRI mAK als auch Anti-IgE brauchbare Positivkontrollen dar, wenn auch letztere zu geringerer Aktivierung führt.

4.2.3 Gating des Dura Clone IF Basophil Activation®

Aufgrund der vom Dura Clone IF Basophil Activation® genutzten Kombination an Markern gibt es verschiedene Gating-Möglichkeiten, um basophile Granulozyten in der Durchflusszytometrie zu analysieren. Die Zellen werden hierfür mit Anti-CD45, Anti-CD3, Anti-CRTH2 und Anti-CD203c markiert (vgl. Kapitel 2.4.5). Die beiden Gating-Möglichkeiten sind in Abb. 35 zu sehen.

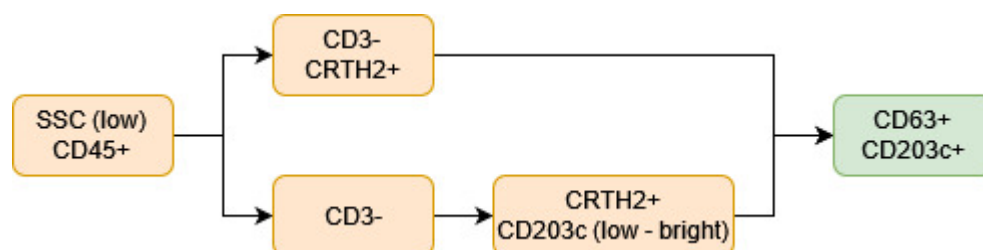


Abbildung 35: Gating-Möglichkeiten des Dura Clone IF Basophil Activation®: Schritte der Identifizierung basophiler Granulozyten (orange) und Messung der Aktivierung (grün)

SSC, Side Scatter, low-bright, geringe bis starke Fluoreszenz

Die vorliegende Studie untersuchte, ob diese beiden Gating-Möglichkeiten zu unterschiedlichen Ergebnissen des Dura Clone IF Basophil Activation® führten. Es wurden Konkordanzanalysen mittels Bland-Altman-Plots durchgeführt, um die Übereinstimmung der beiden Varianten bezogen auf die Anzahl der ermittelten Basophilen und die jeweils gemessenen Aktivierungen zu prüfen.

Im Vergleich der gemessenen Basophilen zeigte der Bland-Altman-Plot zwar einen SDC von 64,7 (vgl. Abb. 25 in Kapitel 3.2.5). Die Mittelwerte der durch die beiden Gating-Varianten gemessenen Zellen unterschieden sich jedoch nur gering und lagen deutlich über den erforderlichen mindestens 300 Basophilen. Damit wird der beobachtete Unterschied als klinisch vertretbar gewertet. Die stärkere Streuung bei Mittelwerten im Bereich von 150-200 (vgl. Abb. 25) könnte damit zu erklären sein, dass geringe Anzahlen an gemessenen Basophilen ein Hinweis auf Störfaktoren in der FACS-Analyse darstellen können, die mit einer größeren Schwankung einhergehen.

Im Vergleich der in den jeweils ermittelten Populationen von Basophilen gemessenen Aktivierung (vgl. Abb. 26 in Kapitel 3.2.5) zeigte der Bland-Altman-Plot, dass 95 % der zukünftig zu messenden Differenzen in einem schmalen Intervall von [-5,3; 3,9] zu erwarten sind. Es ist außerdem zu sehen, dass die Streuung der Differenz für Werte um den entscheidenden Cut-off-Bereich sehr gering ausfällt. Beide Gating-Varianten unterschieden sich in keiner Messung darin, ob die gemessenen Werte oberhalb oder unterhalb der Cut-off-Werte lagen. Die qualitativen Aussagen waren gleich. Insgesamt wurden die Unterschiede daher als klinisch vertretbar eingeschätzt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird von einer ausreichenden Übereinstimmung der beiden Gating-Varianten ausgegangen. Beide Möglichkeiten können damit analog genutzt werden. Für die weitere Auswertung der Ergebnisse dieser Studie wurde die erste Gating-Variante (ohne Nutzung von CD203c) gewählt.

Gating 2 unterscheidet sich lediglich in der zusätzlichen Nutzung des Markers CD203c zur Identifizierung der Basophilen. Daneben werden die Marker CD3 und CRTH2 in zwei separaten Schritten eingesetzt (CD3/SSC und CRTH2/CD203c) (vgl. Abbildungen 8 und 35). Der Schritt über CD3/CRTH2 von Gating 1 erlaubt jedoch bereits die gleichen Aussagen wie die zuvor erwähnten Schritte.

Zu den CRTH2⁺ Zellen gehören T-Lymphozyten sowie eosinophile und basophile Granulozyten. Mithilfe von CD3 können T-Lymphozyten von der Population ausgeschlossen werden (CD3⁺). Eosinophile Zellen zeigen viel Streuung im SSC (21). Daher können diese Zellen im gemeinsamen ersten Schritt (CD45/SSC) bereits ausgeschlossen werden. Ein separater Schritt über CD3/SSC wird damit obsolet. Durch die Schritte über CD45/SSC und CD3/CRTH2 von Gating 1 sind die basophilen Zellen ausreichend identifiziert.

Es ist fragwürdig, ob die zusätzliche Analyse von CD203c ein genaueres Gating ermöglicht. Zur Population der basophilen Granulozyten werden sowohl Zellen mit starker Fluoreszenz von CD203c (aktivierte Basophile) als auch solche mit wenig Fluoreszenz (ruhende Basophile) gezählt. Die Untersuchung von CD203c im Schritt CRTH2/CD203c schließt damit keine weiteren Zellen aus (lediglich das Vorhandensein von CRTH2⁺ ist hier entscheidend; vgl. Abbildung 8).

Die Studienlage zum Vergleich verschiedener Identifizierungsmarker im BAT ist bisher lückenhaft. Eberlein et al. verglichen Kombinationen aus den Markern Anti-CCR3, Anti-IgE, Anti-CRTH2, Anti-CD203c und Anti-CD3. Hierbei wurde durch die Kombination aus CRTH2⁺/CD203c⁺/CD3⁻ die geringste Anzahl an Basophilen gemessen. Ein Vergleich von CRTH2⁺/CD3⁻ und CRTH2⁺/CD203c⁺/CD3⁻ erfolgte aber nicht (39). Eine Studie von Boumiza et al. zeigte für die Kombination aus CD3⁻/CRTH2⁺ aussagekräftige Ergebnisse. CD203c wurde hier nur zur Messung der Aktivierung verwendet (21). Es ist daher davon auszugehen, dass der Einsatz von CD203c neben CD3 und CRTH2 zur Identifizierung nicht notwendig ist.

4.2.4 Quantitativer und qualitativer Vergleich der beiden Tests

Bewertung der Übereinstimmung von Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation®

Um eine Aussage über die Übereinstimmung der Ergebnisse von Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® zu treffen, wurde die Höhe der gemessenen Aktivierungen in einem Bland-Altman-Plot verglichen (vgl. Abbildung 27). Das Intervall der LOA betrug [-23,7; 24,0]. Die Streuung für Werte um die Cut-offs von 5 bzw. 10 % war dabei geringer als für höhere Mittelwerte.

Für die in einem Bland-Altman-Plot errechneten LOA gibt es keine allgemeinen Grenzwerte zur Beurteilung. Die Interpretation der LOA erfolgt anhand der klinischen Fragestellung (51). Im Falle der gemessenen Aktivierung durch die beiden Tests, wäre eine möglichst hohe Übereinstimmung wünschenswert. Als Grenzwerte für die Differenz der beiden Tests ist zum Beispiel ein Intervall von [- 10; 10] %P denkbar. Aus dem Vergleich der quantitativen Ergebnisse würde man somit von einer klinisch nicht ausreichenden Übereinstimmung ausgehen.

Es ist jedoch anzumerken, dass in der Interpretation des BAT kategorische Aussagen mit nominaler Ausprägung getroffen werden („Aktivierung unterhalb des Cut-offs“ bzw. „Aktivierung oberhalb des Cut-offs“). Daher ist eine Konkordanzanalyse mittels Bland-Altman-Plots allein weniger geeignet.

Ein besserer Vergleich ließ sich anhand des Cohens Kappa treffen (79). Das in dieser Studie ermittelte Maß für die Urteilsübereinstimmung in der Untersuchung der Allergene HBV und YJV lag bei $\kappa = 0,77$. Gemäß der von Landis und Koch vorgeschlagenen Kategorisierung (vgl. Tabelle 16) liegt damit eine beachtliche Übereinstimmung vor (Grenzwerte: 0,61-0,80) (80). In die Berechnung des Cohens Kappa wurden nur die durch HBV und YJV gemessenen Aktivierungen einbezogen. In den Leerwerten und Positivkontrollen liegt bei verwertbaren Ergebnissen im BAT automatisch eine Übereinstimmung vor, sodass eine Berücksichtigung dieser Werte für das Cohens Kappa nicht sinnvoll ist.

Anhand dieser Ergebnisse werden die beiden Basophilenaktivierungstests Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® im Rahmen dieser Studie als klinisch ausreichend übereinstimmend beurteilt. Mit dem hohen Wert des Cohens Kappa lag ein aussagekräftiger Marker für die Konkordanz der beiden Tests vor.

Diskussion der Ergebnisse individueller Patienten

In der Betrachtung der einzelnen Patienten ergaben sich dennoch auffällige Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Tests. Während bei acht von zehn Patienten die Ergebnisse übereinstimmten, wurden bei den übrigen beiden Patienten bei Betrachtung der Ergebnisse aller Konzentrationen von HBV und YJV unterschiedliche Aussagen getroffen (vgl. Tabelle 23).

Bei zwei Patienten ist davon auszugehen, dass der Flow CAST® die wahrscheinlichere Diagnose lieferte. So spricht das Ergebnis bei P6 mit der positiven Anamnese und Sensibilisierung auf Bienengift überein (Flow CAST®: Biene und Wespe positiv; Dura Clone IF Basophil Activation®: Biene negativ, Wespe positiv). Bei P26 spricht ein negativer Intrakutantest und fehlendes sIgE auf rekombinante Allergene dafür, dass keine Bienengiftallergie vorliegt (Flow CAST®: Biene negativ, Wespe positiv; Dura Clone IF Basophil Activation®: Biene und Wespe positiv).

Bei P28 wurde aufgrund der Anamnese trotz positivem Intrakutantest und sIgE gegen HBV von einer alleinigen Wespen- und Hornissengiftallergie ausgegangen. Sowohl die Ergebnisse des Dura Clone IF Basophil Activation® als auch des Flow CAST® zeigten jedoch eine Aktivierung auf HBV in der höchsten Konzentration (284/625 ng/ml). Die getroffene Diagnose könnte vor diesem Hintergrund noch einmal reevaluiert werden.

Der Goldstandard zur Überprüfung der vorliegenden Allergie wäre eine Stichprovokation mit dem entsprechenden Insekt. Da diese keinen Teil der Diagnostik darstellt und aus ethischen Gründen nicht in dieser Studie durchgeführt werden kann, kann nicht abschließend geklärt werden, ob die beiden Tests in den beschriebenen Fällen die genauere Aussage getroffen haben (97, 113).

Zwei der Patienten zeigten bei gesicherter Diagnose einer Bienengiftallergie in beiden Tests keine Aktivierung durch HBV. Die Ergebnisse der BATs sind damit als falsch-negativ anzusehen. Falsch-negative Ergebnisse können laut Literatur unter anderem durch falsche Lagerung der Blutproben, Einnahme von Medikamenten oder falsche Allergenkonzentration entstehen (43, 47). Diese Faktoren könnten in dieser Studie weitestgehend ausgeschlossen werden. Hervorzuheben ist, dass einer der beiden Patienten (P15) bereits im ersten Teil der Studie negativ auf das HBV reagierte, aber eine Aktivierung auf rekombinante Allergene zeigte (vgl. Kapitel 3.1.4 und 3.1.5).

Einer der untersuchten Patienten (P23) schied aus der Bewertung aus, da er im Dura Clone IF Basophil Activation® keine Aktivierung in der Positivkontrolle zeigte (Anti-FcεRI mAK: 7,4 %; Anti-IgE: 2,1 %). Damit gilt er als sog. Non-Responder. Laut Ebo et al. liegt der Anteil an Non-

Respondern in der Regel bei 5-10 % (43, 47). Es wird davon ausgegangen, dass eine verringerte Aktivität der Tyrosinkinase Syk zum Ausbleiben der Aktivierung führt (67). Interessanterweise zeigte der Patient im Flow CAST® eine Aktivierung auf die Kontrolle mit Anti-FcεRI mAK (22,2%). Sowohl die Kontrolle Anti-IgE als auch Anti-FcεRI mAK wirken über denselben Signalweg an basophilen Zellen. Damit wäre zu erwarten, dass der Patient als Non-Responder in beiden Tests keine Aktivierung zeigt. Da auch im Flow CAST® die Aktivierung auf die Allergene HBV und YJV ausblieb, ist aber zumindest von einem teilweisen Non-Responder-Status auszugehen.

Vergleich der Aktivierungsmarker CD63 und CD203c

Während der Flow CAST® lediglich CD63 als Aktivierungsmarker verwendet, kommt im Dura Clone IF Basophil Activation® die Kombination von CD63 und CD203c zum Einsatz. Die Mehrheit der kommerziell erhältlichen BATs aus Tabelle 24 nutzte CD63 als Aktivierungsmarker. Ebenso wie CD63 kann auch das Oberflächenantigen CD203c allein als Aktivierungsmarker genutzt werden.

Es stellt sich die Frage, ob einer der beiden Marker dem anderen überlegen ist oder ob beide zu ähnlichen Ergebnissen führen. In einer Studie von Eberlein-König et al. zeigte ein Protokoll mit CD203c im Vergleich zu CD63 eine höhere Sensitivität und höhere Aktivierungen. CD63 dagegen eine höhere Spezifität. Beide Marker wurden als verlässlich eingestuft (36). Bühring et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die alleinige Nutzung von CD63 zu vermehrt falsch-negativen und von CD203c zu vermehrt falsch-positiven Ergebnissen führen könnte, weshalb sie den kombinierten Einsatz von beiden Markern empfahlen (23).

Laut Gebrauchsanweisung des Dura Clone IF Basophil Activation® wird die Kombination aus Anti-CD203c und Anti-CD63 zur Messung der basophilen Aktivierung (CD63+, CD203c^{bright}; vgl. Abb. 8, Q2) empfohlen. Um die Aktivierungsmarker innerhalb des Dura Clone IF Basophil Activation® zu vergleichen, wurde in dieser Studie in einer separaten Auswertung untersucht, ob die alleinige Bestimmung von CD63+ (vgl. Abb. 8 Q2 und Q3) bzw. CD203c^{bright}-Zellen (vgl. Abb. 8, Q1 und Q2) zu einem signifikanten Unterschied in den Ergebnissen führt.

Hierbei zeigte sich, dass die alleinige Verwendung von CD63 zu den gleichen Ergebnissen führte wie die Kombination aus CD63 und CD203c. Die beobachteten Unterschiede waren sehr gering (vgl. Kapitel 3.2.5). Die alleinige Auswertung von CD203c dagegen führte zur Messung von deutlich höheren Aktivierungen. Ein Zweistichproben T-Test ließ mit einem Signifikanzniveau

von $> 0,001$ die Annahme zu, dass der beobachtete Unterschied signifikant ist (vgl. Tabelle 20). In dieser Auswertung zeigten alle Proben basophile Aktivierung oberhalb der Cut-off-Werte (vgl. Kapitel 3.2.5). Damit ist davon auszugehen, dass die Auswertung von CD203c ohne CD63 in dieser Studie zu falsch-positiven Ergebnissen führte.

Einschränkend ist anzumerken, dass das verwendete Gating in dieser Studie für die gemeinsame Nutzung von CD63 und CD203c ausgerichtet war. Die Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen könnte durch ein genaueres Gating auf CD203c möglicherweise reduziert werden. Aufgrund fehlender Konsequenz für diese Studie wurde hiervon jedoch abgesehen.

Insgesamt konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden, dass der kombinierte Einsatz von zwei Aktivierungsmarkern im Dura Clone IF Basophil Activation® zu genaueren Ergebnissen führt. In der Analyse zeigte sich vielmehr, dass die getroffenen Aussagen denen der alleinigen Verwendung von CD63 entsprachen. Zudem zeigte der Dura Clone IF Basophil Activation® eine beachtliche Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Flow CAST®, der lediglich CD63 als Aktivierungsmarker nutzt.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße können die Ergebnisse dieser Studie nur als vorläufig eingestuft werden. Eine abschließende Aussage darüber, ob der kombinierte Einsatz von CD63 und CD203c im Dura Clone IF Basophil Activation® zu besseren Ergebnissen führt als der Flow CAST® ist nicht möglich.

Abschließende Einschätzung des Dura Clone IF Basophil Activation®

Im Rahmen dieser Studie wurde mit einem Cohens Kappa von $\kappa = 0,77$ eine beachtliche Übereinstimmung zwischen den Tests Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® gemessen. Anhand dieses Wertes könnte ein Einsatz des Dura Clone IF Basophil Activation® zunächst befürwortet werden.

Anzumerken ist jedoch, dass der Dura Clone IF Basophil Activation® in nur zehn Fällen verwertbare Ergebnisse lieferte, die dann auch in die Berechnung von Cohens Kappa einfließen. Insgesamt wurden 16 Patienten mit dem Dura Clone IF Basophil Activation® analysiert. Aufgrund des Non-Responders und den fünf Patienten mit zu hohen Leerwerten bzw. Aktivierung in allen Proben schieden sechs Patienten des Dura Clone IF Basophil Activation® aus. Das entspricht einem Anteil von 37,5 %.

Dies spricht dafür, dass der Dura Clone IF Basophil Activation® störanfälliger war als der Flow CAST®. Die genauen Hintergründe hierfür konnten in dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Ohne eine Bestimmung der Gründe, die zu den nicht verwertbaren Ergebnissen führten, kann ein Einsatz nicht uneingeschränkt empfohlen werden. Um genauere Erkenntnisse über den Dura Clone IF Basophil Activation® zu gewinnen, sind weitere Versuche an einer größeren Studienpopulation notwendig. Aufgrund eingeschränkter Ressourcen war dies in dieser Studie nicht möglich.

4.2.5 Praktikabilität in der Routinediagnostik

Um eine Empfehlung bezüglich des möglichen Einsatzes des Dura Clone IF Basophil Activation® in der klinischen Diagnostik aussprechen zu können, war es neben der Bewertung der Übereinstimmung notwendig, weitere Faktoren in die Einschätzung einzubeziehen. So spielen in der praktischen Anwendung auch die Durchführungszeit oder die Kosten pro Test eine Rolle.

Die in dieser Studie durchgeführte Analyse zeigte, dass der Dura Clone IF Basophil Activation® trotz der vom Hersteller versprochenen einfacheren Durchführung nicht schneller war als der Flow CAST®. Im Mittel lag die Durchführungszeit sogar 22:23 min über der des Flow CAST®, was der 1,3-fachen Dauer entspricht. Die längere Durchführungszeit war zum Großteil auf eine längere Inkubationsdauer von insgesamt 45 min (gegenüber 29 min) zurückzuführen.

Es ist dabei fraglich, ob alle Inkubationsschritte im Dura Clone IF Basophil Activation® notwendig sind. Besonders die Inkubation nach der Zugabe von PBS-Puffer zum Lysestopp könnte ggf. ausgelassen werden. Sie wird jedoch in der Gebrauchsanweisung empfohlen. Die in dieser Studie durchgeführte (und vom Hersteller als optional beschriebene) Waschung verlängerte die Durchführungszeit im Mittel um insgesamt 6:18 min. Würden diese beiden Schritte weggelassen werden, könnte Zeit eingespart werden (10 min für die Inkubation und etwa 6 min für die Waschung). Die Durchführungszeit läge allerdings noch immer im Bereich der des Flow CAST® und wäre nicht bedeutend kürzer.

Ein Vorteil des Dura Clone IF Basophil Activation®, der in dieser Studie beobachtet werden konnte, ist die Tatsache, dass im Protokoll kein Färbereagenz zur Probe pipettiert werden muss. Dabei handelt es sich für gewöhnlich um sehr kleine Mengen (beim Flow CAST® 20 µl), wodurch dieser Schritt eine mögliche Fehlerquelle darstellen könnte. Es ist jedoch davon auszugehen, dass dieser Vorgang erfahrenem Laborpersonal keine Schwierigkeiten bereiten sollte.

Eine Einschränkung des Dura Clone IF Basophil Activation® bestand darüber hinaus darin, dass aufgrund der genutzten Marker ein FACS-Gerät mit drei Lasern benötigt wurde (das in dieser Studie genutzte FACSCanto enthält Laser der Wellenlängen 405 nm, 488 nm und 633 nm). Für den Flow CAST® dagegen sind zwei Laser ausreichend (das in dieser Studie genutzte FACSCalibur enthält Laser der Wellenlängen 488 nm und 633 nm). Demzufolge könnte der Flow CAST® vermutlich in mehr Laboren einsetzbar sein als der Dura Clone IF Basophil Activation®.

Im Vergleich der Kosten blieb der BAT von Beckman Coulter Inc. deutlich hinter dem Flow CAST® zurück. So belief sich allein der Preis des Test-Kits pro Test hier auf das 4,6-fache (29,22 € gegenüber 6,30 €). Daneben waren pro Kit nur fünf Positivkontrollen enthalten. Dadurch könnten trotz der angegebenen Anzahl an 25 Tests pro Kit nur maximal fünf Patienten analysiert werden. Da die Positivkontrolle im Flow CAST® frei als Reagenz enthalten war, war dieser deutlich flexibler in der Versuchsanordnung.

Zwar konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass beide Tests eine ausreichende Übereinstimmung aufweisen, jedoch sprechen verschiedene Faktoren gegen einen Einsatz des Dura Clone IF Basophil Activation®. Insgesamt wurde daher vom Ersatz des Flow CAST® durch den Dura Clone IF Basophil Activation® an der Klinik und Poliklinik der Dermatologie und Allergologie am Biederstein zum aktuellen Zeitpunkt abgesehen.

4.2.6 Klinische Relevanz und Ausblick

Ein Einsatz des Dura Clone IF Basophil Activation® konnte im Rahmen dieser Studie nicht empfohlen werden. Dennoch bleibt festzuhalten, dass seine Technik eine spannende Neuerung darstellt. Der Ansatz, dass die für den BAT genutzten Marker nicht in einem Färbereagenz, sondern in Reagenzgefäßen gebunden vorliegen, wurde bisher von keinem kommerziell erhältlichen Testverfahren verfolgt. Er könnte dazu beitragen, die Technologie des BATs weiterzuentwickeln.

Der Basophilenaktivierungstest stellt aktuell keine Routineuntersuchung in der Allergiediagnostik dar, sondern bleibt spezifischen Fragestellungen vorbehalten (97). Die Durchführung ist aufwendig und von zahlreichen manuellen Schritten geprägt. Um sowohl in Diagnostik als auch Forschung laborübergreifend gut vergleichbare Resultate zu erzielen, sind Standardisierungen der durchflusszytometrischen Analyse notwendig. Depince-Berger et al. schlagen hierfür unter anderem einen verkürzten Versuchsablauf mit Verwendung von EDTA-Blut sowie eine technisch

standardisierte Analyse am FACS vor (31). Damit könnte ermöglicht werden, dass der BAT in Zukunft einem größeren Anwendungsfeld zugänglich wird (2, 38, 101).

In diesem Kontext ist daneben erwähnenswert, dass die Gruppe von Arif-Lusson et al. in einer Studie untersuchte, ob sich das Prinzip des Dura Clone IF Basophil Activation® innerhalb eines automatisierten Prozesses nutzen lässt. Hierzu übertrugen sie die Testmethode in einen Ansatz mit 96-Well-Titerplatten. Das Sampling am FACS erfolgte automatisiert.

Dieses Vorgehen erbrachte vergleichbar zuverlässige Ergebnisse bei einer deutlichen Reduktion des benötigten Blutvolumens und des manuellen Aufwands. Durch die Verwendung von Titerplatten und der Automatisierung des Samplings ergab sich eine skalierbare und zeitsparende Methode (2). Anzumerken bleibt, dass ein solch automatisierter Ansatz mit 96-Well-Titerplatten auch für BATs mit einem Färbereagenz denkbar wäre. Hierbei wäre lediglich ein weiterer Pipettierschritt notwendig.

Neben dem Sampling stellt auch die Analyse inklusive Gating der Zellpopulation bisher einen manuellen Schritt dar. Eine Automatisierung könnte zu einer besseren Standardisierung des BATs beitragen. Patil et al. gelang es bereits mithilfe der Software Bioconductor und der Programmiersprache R eine datenbasierte, automatisierte Gating-Strategie zu entwerfen, die sich in ihrer Studie in über 90 % der untersuchten Tests als zufriedenstellend herausstellte (90). Diese Ergebnisse deuten vielversprechend darauf hin, dass die Analyse des BATs langfristig automatisiert und damit auch standardisiert werden kann.

Zuletzt zeigten Behrends et al. in ihrer Studie von 2021, welche Verbesserungen im BAT in Zukunft möglich sind. Auch sie nutzten einen Ansatz mit 96-Well-Titerplatten und automatisiertem Sampling am FACS. Die Analyse erfolgte ähnlich wie bei Patil et al. mithilfe einer in R programmierten Automatisierung. Daneben variierten sie die Zeit der Lagerung der zu untersuchenden Proben. Durch diese Anpassungen entwarfen sie eine Methode, mit deren Hilfe in kurzer Zeit ein großer Umsatz an Proben untersucht werden konnte. Sie könnte eine Möglichkeit darstellen, den BAT routinemäßig in der Allergiediagnostik zu etablieren (7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der BAT sowohl durch den Einsatz neuer Allergene als auch neuer Testverfahren weiter verbessert werden kann. Automatisierungen und mehr Standardisierung können dafür sorgen, dass die Untersuchung deutlich mehr Fragestellungen und Anwendungsfeldern zugänglich gemacht wird. Die genannten Optimierungen haben großes Potential, den Stellenwert des BAT in Diagnostik und Forschung zukünftig noch weiter zu stärken.

5 Zusammenfassung

Die SIT stellt die einzig kausale Therapie der Hymenopteren Giftallergie dar. Für sie ist eine genaue Diagnose des allergieauslösenden Insekts notwendig. Durch die CRD und Etablierung des BATs konnten bereits große Fortschritte in der Allergiediagnostik erzielt werden. Die Unterscheidung von nahverwandten Vespidae-Arten wie den *Vespula spp.* und der *Polistes dominula* stellt aufgrund fehlender Markerallergene aber noch immer eine Herausforderung dar.

Ziel dieser Studie war es, die neu beschriebenen *Polistes*-Allergene PDV PLA2 und Pol d 2 im BAT auf ihre In-Vitro-Reaktivität und mögliche Kreuzreaktivität mit homologen Allergenen zu untersuchen. In einem zweiten Teil wurde mit der Erprobung des Dura Clone IF Basophil Activation® ein neues Testverfahren mit dem etablierten Flow CAST® verglichen.

Für den Vergleich der Allergene wurden 18 Patienten mit sIgE gegen Api m 1/YJV und 17 Patienten mit sIgE gegen Api m 2/YJV auf Aktivierung durch Stimulation mit Api m 1 und PDV PLA2 bzw. Api m 2, Pol d 2 und Ves v 2b untersucht. Die Testverfahren wurden mittels Konkordanzanalysen und anhand der Durchführungszeit und Kosten verglichen.

Bei keinem der untersuchten Patienten lagen relevante Aktivierungen auf PDV PLA2, Pol d 2 oder Ves v 2b vor. In Zusammenschau mit serologischen Untersuchungen scheint eine Kreuzreaktivität zwischen Api m 1 und PDV PLA2 bzw. Api m 2, Pol d 2 und Ves v 2b vernachlässigbar. Es ist jedoch davon auszugehen, dass weder PDV PLA2 noch Pol d 2 Markerallergene darstellen. Eine Limitierung dieser Studie lag in der fehlenden Untersuchung der YJV-Allergiker auf sIgE gegen Ves v 2b. Zur Validierung der Aussage sind außerdem gezielte Untersuchungen von PDV-Allergikern mit sIgE gegen PDV PLA2 nötig. Api m 1 führte (nicht signifikant) zu höheren Aktivierungen als HBV. Ein Einsatz rekombinanter Allergene könnte die Diagnose von HBV-Allergien in Einzelfällen verbessern. Die diagnostische Unterscheidung zwischen PDV- und YJV-Allergikern dagegen wird sich auf verschiedene kreuzreaktive Allergene stützen müssen.

In der Etablierung des neuen Testverfahrens wurden die möglichen Gating-Optionen anhand Bland-Altman-Plots als gleichwertig eingeschätzt. 5 von 16 Patienten (31,3 %) schieden aufgrund Aktivierungen beim Leerwert unklarer Ursache aus der Auswertung aus. Zwar zeigte sich mit einem Cohens Kappa von $\kappa = 0,77$ beachtliche Urteilsübereinstimmung mit dem Flow CAST®, aufgrund der beobachteten Störanfälligkeit, längerer Durchführungszeit und höheren Kosten konnte der Einsatz des Dura Clone IF Basophil Activation® dennoch nicht empfohlen werden.

6 Summary

VIT is the only existing causal therapy for Hymenoptera venom allergy. It requires an accurate diagnosis of the culprit insect. Due to component-resolved diagnostics and the basophil activation test, great progress in allergy diagnostic could be achieved. However, due to the lack of known marker allergens, the diagnostic differentiation of closely related Vespidea species such as *Vespula spp.* and *Polistes dominula* remains a challenge.

The aim of this study was to assess the recently described *Polistes dominula* allergens PDV PLA2 and Pol d 2 in BAT addressing their in-vitro-reactivity and possible immunological IgE cross-reactivity with homologous allergens. Additionally, a new test method for BAT was assessed by establishing the Dura Clone IF Basophil Activation® and comparing it to the Flow CAST® test.

In the first part of the study, basophil activation was measured and compared in 18 patients sensitized to Api m 1/YJV and 17 patients sensitized to Api m 2/YJV upon stimulation with Api m 1 and PDV PLA2 or Api m 2, Pol d 2 and Ves v 2b. The comparison of the test methods was performed by concordance analyses and based on the measured times and costs of both tests.

Neither the *Polistes dominula* allergens PDV PLA2 and Pol d 2 nor the *Vespula vulgaris* allergen Ves v 2b showed significant basophil activation in any patient. According to BAT results and serological findings, pronounced cross-reactivity between Api m 1 and PDV PLA2 or Api m 2, Pol d 2 and Ves v 2b seems to be negligible. Regardless, it can be assumed that neither PDV PLA2 nor Pol d 2 represent marker allergens. A limitation of this study was the lack of including YJV allergic patients with sIgE to Ves v 2b. Furthermore, additional testing of PDV allergic patients sensitized to PDV PLA2 is needed to confirm the findings. Api m 1 induced higher activation than whole bee venom extract (however not significantly). The use of recombinant HBV allergens in BAT could therefore improve the diagnosis of bee venom allergy in individual cases. In contrast, diagnostic differentiation between PDV and YJV allergic patients will have to rely on a variety of cross-reactive allergens.

In the establishment of the new test method for BAT, both possible gating options appeared to be equivalent according to analysis by Bland-Altman plots. 5 out of 16 patients (31.3%) were excluded from the analysis due to background activation of unclear cause. Whilst a Cohen's kappa of $\kappa = 0.77$ indicated substantial agreement with the Flow CAST®, the use of the new Dura Clone IF Basophil Activation® could not be recommended due to higher susceptibility to errors, longer time required to perform the test and higher costs observed in this study.

7 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Häufigste Auslöser der Insektengiftallergie innerhalb der Hymenoptera (62) | 2 |
| Abbildung 2: Pathomechanismus der IgE-vermittelten allergischen Reaktion (Soforttyp Allergie) (78) | 8 |
| Abbildung 3: Differenzierende Markerallergene und kreuzreaktive Allergene in der „component-resolved diagnostic“ (15) | 14 |
| Abbildung 4: Aufbau eines Durchflusszytometers (106)..... | 34 |
| Abbildung 5: Beispiel für eine Auswertung des Flow CAST® (Software: BD FACSDiva; Patient: 190812-P1; Probe: Positivkontrolle mit Anti-FcεRI mAK)..... | 36 |
| Abbildung 6: Beispiel für eine Auswertung des Flow CAST® (Software: BD FACSDiva; Patient: 190812-P1; Probe: Negativkontrolle mit Stimulationspuffer) | 37 |
| Abbildung 7: Beispiel für eine Auswertung des Flow CAST® (Software: BD FACSDiva; Patient: 190812-P1; Probe: Yellow Jacket Venom in einer Konzentration von 284 ng/ml)..... | 37 |
| Abbildung 8: Beispiel für eine Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation® (Software: FlowJo; Patient: 200121-P22; Probe: Positivkontrolle mit Anti-IgE); oben: Gating 1 (ohne Verwendung von CD203c); unten: Gating 2 (mit Verwendung von CD203c)..... | 46 |
| Abbildung 9: Beispiel für eine Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation® (Software: FlowJo; Patient: 200121-P22; Probe: Negativkontrolle); oben: Gating 1 (ohne Verwendung von CD203c); unten: Gating 2 (mit Verwendung von CD203c) | 46 |
| Abbildung 10: Beispiel für eine Auswertung des Dura Clone IF Basophil Activation® (Software: FlowJo; Patient: 200121-P22; Probe: Yellow Jacket Venom in einer Konzentration von 57 ng/ml); oben: Gating 1 (ohne Verwendung von CD203c); unten: Gating 2 (mit Verwendung von CD203c)..... | 47 |
| Abbildung 11: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 1 bei Wespengiftallergikern und Bienengiftallergikern ohne Api m 1-Sensibilisierung (YJV-only-Gruppe) | 53 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 12: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 1 bei Api m 1-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 1-Gruppe)..... | 54 |
| Abbildung 13: Verteilung der gemessenen basophilen Aktivierung durch aufsteigende Konzentrationen von Api m 1 in der Api m 1-Gruppe mit Median (weiße Linie), Minimum, Maximum und Quartilen..... | 54 |
| Abbildung 14: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von PDV PLA2 bei Wespengiftallergikern und Bienengiftallergikern ohne Api m 1-Sensibilisierung (YJV-only-Gruppe)..... | 55 |
| Abbildung 15: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von PDV PLA2 bei Api m 1-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 1-Gruppe)..... | 55 |
| Abbildung 16: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 2 bei Wespengiftallergikern (YJV-only-Gruppe)..... | 57 |
| Abbildung 17: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 2 bei Api m 2-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 2-Gruppe)..... | 57 |
| Abbildung 18: Verteilung der gemessenen basophilen Aktivierung durch aufsteigende Konzentrationen von Api m 2 in der Api m 2-Gruppe mit Median (weiße Linie), Minimum, Maximum und Quartilen..... | 58 |
| Abbildung 19: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Ves v 2b bei Wespengiftallergikern (YJV-only-Gruppe)..... | 59 |
| Abbildung 20: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Ves v 2b bei Api m 2-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 2-Gruppe)..... | 59 |
| Abbildung 21: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Pol d 2 bei Wespengiftallergikern (YJV-only-Gruppe)..... | 60 |
| Abbildung 22: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Pol d 2 bei Api m 2-sensibilisierten Bienen- bzw. Bienen- und Wespengiftallergikern (Api m 2-Gruppe)..... | 60 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 23: Vergleich der basophilen Aktivierung durch Stimulation mit HBV und Api m 1. n=5 (links); n=5 (rechts) | 62 |
| Abbildung 24: Ergebnisse des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® für fünf ausgewählte Patienten mit hohen Leerwerten im Dura Clone IF Basophil Activation®..... | 67 |
| Abbildung 25: Bland-Altman-Plot zur Anzahl der gemessenen basophilen Zellen durch beide Gating-Optionen mit Verzerrung $d = \text{Mittelwert der Differenz (Gating 1 - Gating 2)}$ (rot) und Übereinstimmungsgrenzen $d \pm 1,96 \times s$ (grün), wobei s die Standardabweichung der Differenzen bezeichnet. n=153 | 69 |
| Abbildung 26: Bland-Altman-Plot für die Aktivierung gemessen durch beide Gating- Optionen mit Verzerrung $d = \text{Mittelwert der Differenz (Gating 1 - Gating 2)}$ (rot) und Übereinstimmungsgrenzen $d \pm 1,96 \times s$ (grün), wobei s die Standardabweichung der Differenzen bezeichnet. n=153 | 69 |
| Abbildung 27: Bland-Altman-Plot zur Aktivierung gemessen durch Dura Clone IF Basophil Activation® und Flow CAST® mit Verzerrung $d = \text{Mittelwert der Differenz (Flow CAST® - Dura Clone IF Basophil Activation®)}$ (rot) und Übereinstimmungsgrenzen $d \pm 1,96 \times s$ (grün), wobei s die Standardabweichung der Differenzen bezeichnet. n=84 | 72 |
| Abbildung 28: Verteilung der gemessenen basophilen Aktivierung durch die Positivkontrollen Anti-FcεRI mAK und Anti-IgE mit Median (Strich), Mittelwert (Kreuz), Minimum, Maximum und Quartilen | 73 |
| Abbildung 29: Vergleich der Testdauer (in min) von Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® | 76 |
| Abbildung 30: Vergleich der Durchführungszeiten (in min) bei den einzelnen Testschritten des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® | 77 |
| Abbildung 31: Differenz der Durchführungszeiten bei den einzelnen Testschritten des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation® je Abschnitt (in min) | 77 |

Abbildung 32: (a) Vergleich der Sequenzen von *Polistes dominula* venom (PDV) Phospholipase A2 (PLA2) und Api m 1. (b) Dreidimensionale Struktur von Api m 1 (blau) und PDV PLA2 (gelb) mit verlängertem N-Terminus (orange). (c) Überlagerung von Api m 1 und PDV PLA2 mit gekürztem N-Terminus (54) 81

Abbildung 33: Basophile Aktivierung durch Stimulation mit Api m 1 oder PDV PLA2. BAT mit 18 Patienten aus dem Großraum München (MUC) und 12 Patienten aus dem Großraum Barcelona (BCN) mit diagnostizierter Allergie oder Sensibilisierung auf HBV, YJV, HBV/YJV, PDV. Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Api m 1 (links) und PDV PLA2 (rechts). Cut-off bei 10 % (gepunktete Linie) (54) 83

Abbildung 34: Dreidimensionale Struktur der Hyaluronidasen Api m 2, Ves v 2.0101, Ves v 2.0201 und Pol d 2 (14) 85

Abbildung 35: Gating-Möglichkeiten des Dura Clone IF Basophil Activation®: Schritte der Identifizierung basophiler Granulozyten (orange) und Messung der Aktivierung (grün)... 98

8 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Allergene von HBV (14, 15)..... | 4 |
| Tabelle 2: Allergene von YJV (14, 15)..... | 6 |
| Tabelle 3: Allergene von PDV (14, 15) | 7 |
| Tabelle 4: Klassifikation der Anaphylaxie (nach Ring und Messmer, 1977) (49, 103, 105) | 10 |
| Tabelle 5: Bestandteile eines Notfallsets und Wirkungsweise der Medikamente (49, 103)..... | 18 |
| Tabelle 6: Spezifische IgE-Klasseneinteilung im Immulite 2000 XPi und Immuno-CAP Phadia..... | 25 |
| Tabelle 7: Reagenzien im Flow CAST® der Firma Bülmann Laboratories AG (22) | 26 |
| Tabelle 8: Materialien | 27 |
| Tabelle 9: Geräte | 28 |
| Tabelle 10: Allergene | 29 |
| Tabelle 11: Übersicht untersuchter Kontrollen und Allergene in der Testung neuer Allergene... | 31 |
| Tabelle 12: Reagenzien des DuraClone IF Basophil Activation®..... | 38 |
| Tabelle 13: Röhrchen und enthaltene Antikörper des Dura Clone Basophil Activation IF..... | 39 |
| Tabelle 14: Weitere Geräte zur Durchführung des Dura Clone IF Basophil Activation | 39 |
| Tabelle 15: Übersicht der getesteten Kontrollen und Allergene im Testvergleich | 42 |
| Tabelle 16: Kategorisierung von Cohens-Kappa-Werten nach Landis/Koch (1977)(80)..... | 48 |
| Tabelle 17: Vergleich der basophilen Aktivierung durch Stimulation mit HBV und Api m 1 in der Api m 1-Gruppe..... | 61 |
| Tabelle 18: Zweistichproben T-Test zur Untersuchung des Unterschieds der gemessenen Aktivierungen durch verschiedene Konzentrationen von Api m 1 und HBV (284 ng/ml)..... | 63 |
| Tabelle 19: Zusätzlicher Ansatz eines BATs mit der Probe von P30 und den Markern Anti- CCR3, Anti-CD203c und Anti-CD63..... | 68 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 20: Zweistichproben T-Test zur Untersuchung des Unterschieds der gemessenen Aktivierungen durch Nutzung von CD203c gegenüber CD63 mit CD203c | 71 |
| Tabelle 21: Auswertung der Differenzen von Dura Clone IF Basophil Activation® und Flow CAST® im Mittel..... | 72 |
| Tabelle 22: Zweiseitiger Zweistichproben T-Test zur Untersuchung des Unterschieds der gemessenen Aktivierungen durch Anti-FcεRI mAK und Anti-IgE..... | 74 |
| Tabelle 23: Vergleich des Sensibilisierungs- und Allergieprofils mit den qualitativen Ergebnissen des Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation®..... | 75 |
| Tabelle 24: Auswahl kommerziell erhältlicher Basophilenaktivierungstests und deren Marker (42)..... | 93 |

9 Literaturverzeichnis

1. Antonicelli L, Bilo MB, Bonifazi F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(4):341-6.
2. Arif-Lusson R, Agabriel C, Carsin A, Cabon I, Sénéchal H, Poncet P, et al. Streamlining basophil activation testing to enable assay miniaturization and automation of sample preparation. *J Immunol Methods.* 2020;481-482:112793.
3. Baker TW, Forester JP, Johnson ML, Sikora JM, Stolfi A, Stahl MC. Stinging insect identification: Are the allergy specialists any better than their patients? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;116(5):431-4.
4. Baker TW, Forester JP, Johnson ML, Stolfi A, Stahl MC. The HIT study: Hymenoptera Identification Test--how accurate are people at identifying stinging insects? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(3):267-70.
5. Balzer L, Pennino D, Blank S, Seismann H, Darsow U, Schnedler M, et al. Basophil activation test using recombinant allergens: highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. *PLoS One.* 2014;9(10):e108619.
6. BeckmanCoulter. "DuraClone IF Basophil Activation Tube" - Consumable IFU/Setting Sheet. Brea, Kalifornien, USA: Beckman Coulter; 2019.
7. Behrends J, Schwager C, Hein M, Scholzen T, Kull S, Jappe U. Innovative robust basophil activation test using a novel gating strategy reliably diagnosing allergy with full automation. *Allergy.* 2021;76(12):3776-88.
8. Bergmann K-C, Müsken H. Durchführung und Bewertung des Pricktests. *Allergo J.* 1992(1):56-60.
9. Biedermann T. Grundprinzipien von Allergie- und Intoleranzreaktionen. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, editors. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 441-52.

10. Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN, Hypersensitivity EIGoIV. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005;60(11):1339-49.
11. Bilò MB. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. *Allergy*. 2011;66 Suppl 95:35-7.
12. Biosciences B. Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung. Heidelberg, Deutschland: BD Biosciences; 2014.
13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1(8476):307-10.
14. Blank S, Bilò MB, Grosch J. Marker allergens in Hymenoptera venom allergy — Characteristics and potential use in precision medicine. Heidelberg: Springer Nature B.V; 2021.
15. Blank S, Bilo MB, Ollert M. Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(4):354-64.
16. Blank S, Haemmerle S, Jaeger T, Russkamp D, Ring J, Schmidt-Weber CB, et al. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and sensitization in the population-representative German KORA cohort. *Allergo J Int*. 2019;28(6):183-91.
17. Blank S, Michel Y, Seismann H, Plum M, Greunke K, Grunwald T, et al. Evaluation of different glycoforms of honeybee venom major allergen phospholipase A2 (Api m 1) produced in insect cells. *Protein Pept Lett*. 2011;18(4):415-22.
18. Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M, et al. Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight Hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3. *J Immunol*. 2010;184(9):5403-13.
19. Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, Wolf S, Bantleon FI, et al. 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*. 2013;8(4):e62009.
20. Bonifazi F, Jutel M, Biló BM, Birnbaum J, Muller U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy*. 2005;60(12):1459-70.

21. Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy*. 2005;3:9.
22. Bühlmann. "Flow CAST® Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry" - User manual. Schönenbuch: Bühlmann; 2012.
23. Bühring HJ, Streble A, Valent P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;133(4):317-29.
24. Carter NP, Ormerod MG. Introduction to the principles of flow cytometry. *Flow cytometry*. Oxford, New York: Ormerod, Michael G.; 2000. p. 13-5.
25. Caruso B, Bonadonna P, Severino MG, Manfredi M, Dama A, Schiappoli M, et al. Evaluation of the IgE cross-reactions among vespid venoms. A possible approach for the choice of immunotherapy. *Allergy*. 2007;62(5):561-4.
26. Chen J, Guan SM, Sun W, Fu H. Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. *Neurosci Bull*. 2016;32(3):265-72.
27. Chruszcz M, Mikolajczak K, Mank N, Majorek KA, Porebski PJ, Minor W. Serum albumins-unusual allergens. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5375-81.
28. Cifuentes L, Vosseler S, Blank S, Seismann H, Pennino D, Darsow U, et al. Identification of Hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to venom extract by using recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):909-10.
29. de Weck AL, Sanz ML. Cellular allergen stimulation test (CAST) 2003, a review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004;14(4):253-73.
30. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(3):177-89.

31. Depince-Berger AE, Sidi-Yahya K, Jeraiby M, Lambert C. Basophil activation test: Implementation and standardization between systems and between instruments. *Cytometry A*. 2017;91(3):261-9.
32. Duty I. Notes on the occurrence of Vespidae (Hym.) in Mecklenburg, mainly around Rostock. (Zum Vorkommen von Faltenwespen (Hym., Vespidae) in Mecklenburg mit Schwerpunkt im Raum Rostock.). *Entomologische Nachrichten und Berichte*. 1997(41):113–9.
33. Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004;14(1):10-6.
34. Eberlein-König B, Ring J. Diagnosis of IgE-mediated hymenoptera venom anaphylaxis in patients with negative skin tests and negative RAST using cellular in vitro tests. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(6):1223.
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*. 2006;16(1):5-10.
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*. 2006;61(9):1084-5.
37. Eberlein B. Basophil activation test in the diagnosis of insect venom allergies. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(11):1633-4.
38. Eberlein B. Basophil activation as marker of clinically relevant allergy and therapy outcome. *Front in Immunol*. 2020;11(1815).
39. Eberlein B, Hann R, Eyerich S, Pennino D, Ring J, Schmidt-Weber CB, et al. Optimizing of the basophil activation test: Comparison of different basophil identification markers. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015;88B:183-9.
40. 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(1):155-61.

41. Eberlein B, Schiener M, Pascal M, Hilger C, Kuehn A, Revets D, et al. Differences of Pol d 3 and Ves v 3 induced basophil activation between Spanish and German insect venom allergic patients. EAACI Congress; Munich. 2018. Poster Nr. 1228.

42. Eberlein B, Thomas P. Zelluläre Diagnostik in der Allergologie. In: Biedermann T, Heppt W, Renz H, Röcken M, editors. *Allergologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 565-71.

43. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;74(4):201-10.

44. Ebo DG, Faber M, Sabato V, Leysen J, Bridts CH, De Clerck LS. Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy. *Clin Exp Allergy.* 2013;43(2):255-61.

45. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy.* 2004;34(3):332-9.

46. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, et al. 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.* 2007;72(3):196-203.

47. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy.* 2006;61(9):1028-39.

48. Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy.* 2004;59(10):1102-9.

49. Fischer J, Biedermann T. Anaphylaxie. In: Biedermann T, Heppt W, Renz H, Röcken M, editors. *Allergologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 223-30.

50. Galindo-Bonilla PA, Galán-Nieto A, Alfaya-Arias T, García-Rodríguez C, de la Roca-Pinzón F, Feo-Brito F. Component-resolved diagnosis in vespid venom-allergic individuals. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015;43(4):398-402.
51. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(2):141-51.
52. Goldberg A, Confino-Cohen R. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(2):182-4.
53. Golden DB. Long-term outcome after venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(4):337-41.
54. Grosch J, Eberlein B, Waldherr S, Pascal M, San Bartolome C, De La Roca Pinzon F, et al. Characterization of new allergens from the venom of the European Paper Wasp *Polistes dominula*. *Toxins (Basel)*. 2021;13(8):559.
55. Grosch J, Hilger C, Bilò B, Eberlein B, Waldherr S, Kler S, et al. Comparing the venom proteomes of the allergy-relevant hymenoptera species *Polistes dominula* and *Vespula spp.* and characterization of new allergens. ISMA; Amsterdam. 2019. Poster.
56. Grosch J, Hilger C, Bilo MB, Kler S, Schiener M, Dittmar G, et al. Shedding light on the venom proteomes of the allergy-relevant Hymenoptera *Polistes dominula* (European Paper Wasp) and *Vespula spp.* (Yellow Jacket). *Toxins (Basel)*. 2020;12(5).
57. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson IBH, Altmann F, Wöhrl S, et al. 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*. 2001;108(6):1045-52.
58. Höcherl N, Tautz J. Nesting behavior of the paper wasp *Polistes dominula* in Central Europe—a flexible system for expanding into new areas. *Ecosphere*. 2015;6(12):1-11.
59. Hoffman DR, Jacobson RS. Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting? *Ann Allergy*. 1984;52(4):276-8.

60. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015;70(11):1393-405.
61. Hofmann SC, 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*. 2011;127(1):265-7.
62. Jakob T, Blank S, Spillner E. Optimierte Diagnostik der Insektengiftallergie durch rekombinante Allergene. In: Kleine-Tebbe J, Jakob T, editors. *Molekulare Allergiediagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 257-75.
63. Jakob T, Muller U, Helbling A, Spillner E. Component resolved diagnostics for hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017;17(5):363-72.
64. Jeep S, Kirchhof E, O'Connor A, Kunkel G. Comparison of the Phadebas RAST with the Pharmacia CAP system for insect venom. *Allergy*. 1992;47(3):212-7.
65. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):184-90.
66. Juarez C, Blanca M, Miranda A, Sanchez F, Carmona MJ, Avila MJ, et al. Specific IgE antibodies to vespids in the course of immunotherapy with *Vespula germanica* administered to patients sensitized to *Polistes dominulus*. *Allergy*. 1992;47(4):299-302.
67. Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. Syk deficiency in nonreleaser basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(2 Pt 1):279-84.
68. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(2):99-106.
69. Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW, Jr., Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(1):79-90.
70. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(3 Pt 1):328-38.

71. Köhler J, Blank S, Muller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(5):1383-9.
72. 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.* 2005;272(20):5182-90.
73. Koren A, Lunder M, Molek P, Kopač P, Zahirović A, Gattinger P, et al. Fluorescent labeling of major honeybee allergens Api m 1 and Api m 2 with quantum dots and the development of a multiplex basophil activation test. *Allergy.* 2020;75(7):1753-6.
74. Korosec P, Erzen R, Silar M, Bajrovic N, Kopac P, Kosnik M. Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(11):1730-7.
75. Korošec P, Šilar M, Eržen R, Čelesnik N, Bajrović N, Zidarn M, et al. 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.* 2013;161(4):363-8.
76. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Eržen R, Zidarn M, et al. Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3):671-3.
77. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Silar M, Zidarn M, et al. High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(5):1406-8.
78. Kumar S, Verma AK, Das M, Dwivedi PD. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *Int Immunopharmacol.* 2012;13(4):432-9.
79. Kwiecien R, Kopp-Schneider A, Blettner M. Concordance analysis: part 16 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(30):515-21.

80. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
81. Leimgruber A, Mosimann B, Claeys M, Seppey M, Jaccard Y, Aubert V, et al. Clinical evaluation of a new in-vitro assay for specific IgE, the immuno CAP system. *Clin Exp Allergy*. 1991;21(1):127-31.
82. Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Müller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure*. 2000;8(10):1025-35.
83. Matysiak J, Matysiak J, Bręborowicz A, Kokot ZJ. Diagnosis of hymenoptera venom allergy – with special emphasis on honeybee (*Apis mellifera*) venom allergy. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(4):875-9.
84. Monsalve RI, Vega A, Marques L, Miranda A, Fernandez J, Soriano V, et al. Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. *Allergy*. 2012;67(4):528-36.
85. Müller U, Helbling A, Berchtold E. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;89(2):529-35.
86. Muller UR. Insect venoms. *Chem Immunol Allergy*. 2010;95:141-56.
87. Okamoto-Uchida Y, Nakamura R, Matsuzawa Y, Soma M, Kawakami H, Ishii-Watabe A, et al. Different results of IgE binding- and crosslinking-based allergy tests caused by allergen immobilization. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(10):1662-6.
88. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(5):26.
89. Oude Elberink JN, van der Heide S, Guyatt GH, Dubois AE. Immunotherapy improves health-related quality of life of adult patients with dermal reactions following yellow jacket stings. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):883-9.

90. Patil SU, Calatroni A, Schneider M, Steinbrecher J, Smith N, Washburn C, et al. Data-driven programmatic approach to analysis of basophil activation tests. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(4):667-73.
91. Perez-Riverol A, Palma MS, Jakob T. Current challenges in molecular diagnostics of insect venom allergy. *Allergo J Int.* 2020;29(3):79-91.
92. Pfaar O, Bachert C, Bufe A, Buhl R, Ebner C, Eng P, et al. Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases. *Allergo J Int.* 2014;23(8):282-319.
93. Przybilla B, Ring J, Ruëff F. Anaphylaxie. *Der Hautarzt.* 2007;58(12):1025.
94. Przybilla B, Ruëff F. Hymenoptera venom allergy. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.* 2010;8(2):114-29.
95. Przybilla B, Ruëff F. Insect stings: clinical features and management. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(13):238-48.
96. Przybilla B, Ruëff F. Insektengiftallergie. In: Biedermann T, Heppt W, Renz H, Röcken M, editors. *Allergologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 239-48.
97. Przybilla B, Ruëff F, Walker A, Räwer H-C, Aberer W, Bauer CP, et al. Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. *Allergo J.* 2011;20(6):318-39.
98. Quercia O, Cova V, Martini M, Cortellini G, Murzilli F, Bignardi D, et al. CAP-Inhibition, molecular diagnostics, and total IgE in the evaluation of *Polistes* and *Vespula* double Sensitization. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;177(4):365-9.
99. Radauer C, Nandy A, Ferreira F, Goodman RE, Larsen JN, Lidholm J, et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy.* 2014;69(4):413-9.
100. Rafei-Shamsabadi D, Müller S, Pfützner W, Spillner E, Ruëff F, Jakob T. Recombinant allergens rarely allow identification of Hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to whole venom preparations. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(2):493-4.

101. Renz H, Biedermann T, Bufe A, Eberlein B, Jappe U, Ollert M, et al. In-vitro-Allergiediagnostik. *Allergo Journal*. 2010;19(2):110-28.
102. Ring J. *Angewandte Allergologie*. München: Urban & Vogel; 2004. 392 S. : p.
103. Ring J, Beyer K, Biedermann T, Bircher A, Fischer M, Heller A, et al. Leitlinie zu Akuttherapie und Management der Anaphylaxie - Update 2021: S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbands Deutscher Allergologen (AeDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutschen Akademie für Allergologie und Umweltmedizin (DAAU), des Berufsverbands der Kinder- und Jugendärzte (BVKJ), der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI), der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI), der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI), der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP), der Patientenorganisation Deutscher Allergie- und Asthmabund (DAAB) und der Arbeitsgemeinschaft Anaphylaxie - Training und Edukation (AGATE). *Allergo J*. 2021;30(1):20-49.
104. Ring J, Brockow K. Soforttyp-Allergie: Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale, Anaphylaxie. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, editors. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 453-60.
105. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet*. 1977;1(8009):466-9.
106. Rothe G. *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. Zelluläre Diagnostik*. Basel [u.a.]: Karger; 2007. p. 27-70.
107. Ruëff F, Bergmann K-C, Brockow K, Fuchs T, Grübl A, Jung K, et al. Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttypreaktionen. *Allergo J*. 2010;19(6):402-15.

108. Ruëff F, Jakob T. Erkrankungen durch Bienen- und Wespenstiche. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, editors. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 467-73.
109. Rueff F, Placzek M, Przybilla B. Mastocytosis and Hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6(4):284-8.
110. Ruëff F, Przybilla B. Insektengifthyposensibilisierung. *Der Hautarzt*. 2008;59(3):200-5.
111. Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al. 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*. 2009;124(5):1047-54.
112. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Seitz MJ, et al. 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*. 2013;8(5):e63233.
113. Rueff F, Przybilla B, Muller 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*. 1996;51(4):216-25.
114. Ruëff F, Wenderoth A, Przybilla B. Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(6):1027-32.
115. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, 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*. 2000;30(8):1166-71.
116. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guérin JC. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg Immunol (Paris)*. 1994;26(6):211-4.

117. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Jr., Bock SA, Branum A, et al. 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. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):391-7.
118. Savi E, Peveri S, Makri E, Pravettoni V, Incorvaia C. Comparing the ability of molecular diagnosis and CAP-inhibition in identifying the really causative venom in patients with positive tests to *Vespula* and *Polistes* species. *Clin Mol Allergy*. 2016;14:3.
119. Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, Ferrara R, Palazzo P, Pomponi D, et al. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(6):911-21.
120. Schäfer T. Epidemiologie der Insektengiftallergie. *Allergo Journal*. 2009;18(5):353-8.
121. Schiener M, Eberlein B, Moreno-Aguilar C, Pietsch G, Serrano P, McIntyre M, et al. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. *Allergy*. 2017;72(1):98-108.
122. Schiener M, Hilger C, Eberlein B, Pascal M, Kuehn A, Revets D, et al. The high molecular weight dipeptidyl peptidase IV Pol d 3 is a major allergen of *Polistes dominula* venom. *Sci Rep*. 2018;8(1):1318.
123. Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, et al. Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of alpha-1,3-core fucosylation. *Mol Immunol*. 2010;47(4):799-808.
124. Severino MG, Campi P, Macchia D, Manfredi M, Turillazzi S, Spadolini I, et al. European *Polistes* venom allergy. *Allergy*. 2006;61(7):860-3.
125. Shapiro HM. How Flow Cytometers Work. *Practical Flow Cytometry*. 4 ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2003. p. 101-223.
126. Skov LK, Seppälä U, Coen JJ, Crickmore N, King TP, Monsalve R, et al. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Angstrom resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006;62(Pt 6):595-604.

127. Smit J. De veldwespen *Polistes dominulus* en *P. biglumis* rukken op in Nederland (Hymenoptera: Vespidae). Nederlandse Faunistische Mededelingen. 2003;18:81 - 8.
128. Smith PL, Kagey-Sobotka A, Bleecker ER, Traystman R, Kaplan AP, Gralnick H, et al. Physiologic manifestations of human anaphylaxis. *J Clin Invest.* 1980;66(5):1072-80.
129. Sousa N, Martínez-Aranguren R, Fernández-Benitez M, Ribeiro F, Sanz ML. Comparison of basophil activation test results in blood preserved in acid citrate dextrose and EDTA. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20(6):535-6.
130. Spillner E, Blank S, Jakob T. Hymenoptera allergens: from venom to "venome". *Front Immunol.* 2014;5:77.
131. Spitzauer S, Pandjaitan B, Söregi G, Mühl S, Ebner C, Kraft D, et al. IgE cross-reactivities against albumins in patients allergic to animals. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;96(6 Pt 1):951-9.
132. Sturm GJ, Biló MB, Bonadonna P, Hemmer W, Caruso B, Bokanovic D, et al. 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.* 2012;130(3):817; author reply 8-9.
133. Sturm GJ, 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.* 2009;148(3):261-4.
134. Sturm GJ, Varga E-M, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy.* 2018;73(4):744-64.
135. ThermoFischerScientific. ImmunoCAP Tests. Der Standard in der Allergiediagnostik (abgerufen am 28.10.2021) [Available from: <https://www.thermofisher.com/phadia/de/de/our-solutions.html>].
136. Vetter RS, Visscher PK. Bites and stings of medically important venomous arthropods. *Int J Dermatol.* 1998;37(7):481-96.

137. Vos B, Köhler J, Müller S, Stretz E, Ruëff F, Jakob T. Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to *Vespula* venom. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):1225-7, 7.e1.
138. Worm M, Edenharter G, Rueff F, Scherer K, Pfohler C, Mahler V, et al. Symptom profile and risk factors of anaphylaxis in Central Europe. *Allergy.* 2012;67(5):691-8.

10 Anhang

Klinische Daten aller Patienten

| Patient-ID | 190812-P1 | 190812-P2 | 190821-P3 | 190821-P4 | 190828-P5 | 190828-P6 | 190902-P7 | 190906-P8 | 190912-P9 |
|--|--------------|--------------|---------------|----------------|----------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|
| Alter | 41 | 64 | 28 | 23 | 37 | 53 | 38 | 60 | 63 |
| Geschlecht | w | m | w | w | w | m | m | w | w |
| Allergie-Diagnose | W | B und W | W | B | B und W | B und W, Hornisse | B | W | W |
| Anaphylaxie-Grad | II | III | II - III | II | II | III | III | III | II |
| Sensibilisierung ohne klinische Relevanz | | | | W | | | W | | |
| i.c. Biene | | pos. ab 0,01 | neg. | pos. ab 0,0001 | pos. ab 0,0001 | | pos ab 0,0001 | neg. | neg. |
| i.c. Wespe | pos. ab 0,01 | pos. ab 0,01 | pos. ab 0,001 | pos. ab 0,1 | pos. ab 0,001 | pos. ab 0,01 | neg. | pos ab 0,0001 | pos ab 0,0001 |
| weitere Befunde | | | | | | Mastozytose | | | |
| Gesamt-IgE (TIE CAP) | | | | | | | 510 | 61,7 | 128 |
| Gesamt-IgE (TIE DPC) IU/ml | 24,3 | 36 | | 73,5 | 364 | 14,4 | | | |
| Bienengift I1 CAP | | | | | | 26,4 | >100 | | neg. |
| Klasse | | | | | | 4 | 6 | 0 | |
| Bienengift I1 DPC | neg. | 1,63 | | 11 | 7,39 | | | | |
| Klasse | | 2 | | 3 | 3 | | | | |
| rApi m1 (I208CAP) | neg. | neg. | neg. | 3,15 | 0,63 | 9,69 | >100 | | neg. |
| Klasse | | | | 2 | 1 | 3 | 6 | 0 | |
| rApi m2 (I214CAP) | | | neg. | | 13,4 | 0,9 | neg. | | neg. |
| Klasse | | | | | 3 | 2 | | 0 | |
| rApi m2 (A46 DPC) | neg. | 1,37 | | 0,993 | | | | | |
| Klasse | | 2 | | 2 | | | | | |
| rApi m3 (I215CAP) | neg. | neg. | neg. | 1,38 | neg. | 1,67 | 29,4 | | neg. |
| Klasse | | | | 2 | | 2 | 4 | 0 | |
| rApi m5 (I216 CAP) | neg. | neg. | neg. | 7,44 | 0,35 | neg. | 3,8 | | neg. |
| Klasse | | | | 3 | 1 | | 3 | 0 | |
| rApi m10 (I217 CAP) | neg. | neg. | neg. | 5,01 | neg. | 13,7 | 35,5 | | neg. |
| Klasse | | | | 3 | | 3 | 4 | 0 | |
| Wespengift (I3 CAP) | | | | | | 2,37 | 3,07 | | 14,2 |
| Klasse | | | | | | 2 | 2 | 5 | 3 |
| Wespengift (I3 DPC) | 2,11 | 2,78 | | 1,3 | 9,55 | | | | |
| Klasse | 2 | 2 | | 2 | 3 | | | | |
| rVesv1 (I211 CAP) | neg. | neg. | neg. | neg. | 0,52 | neg. | neg. | | neg. |
| Klasse | | | | | 1 | | | 4 | |
| rVesv5 (I209 CAP) KU/l | 1,51 | 0,8 | 9,31 | neg. | 10,7 | 2,37 | neg. | | 89,7 |
| Klasse | 2 | 2 | 3 | | 3 | 2 | | 3 | 5 |
| Hornisse (I75 CAP) | | | | | | 0,47 | | | |
| Klasse | | | | | | | | | |
| CCD, MUXF3 aus Bromelin (O214 CAP) | | | | | | neg. | 1,12 | | neg. |
| Klasse | | | | | | | 2 | 0 | |
| CCD, MUXF3 aus Bromelin (O214 DPC) | neg. | neg. | | 1,34 | 1,77 | | | | |
| Klasse | | | | 2 | 2 | | | | |
| Derm. Pteronyssinus (D1CAP) | | | | | | | 12,3 | | |
| Klasse | | | | | | | 3 | | |
| Derm. Farinae | | | | | | | 13 | | |
| Klasse | | | | | | | 3 | | |
| Lieschgras (G6 CAP) | | | | | | | 3,85 | | |
| Klasse | | | | | | | 3 | | |
| rBet v1 (Birke) (T215 CAP) | | | | | | | neg. | | |
| Klasse | | | | | | | | | |
| Warzenbirke (T3 CAP) | | | | | | | 3,12 | | |
| Klasse | | | | | | | 2 | | |
| Beifuß (W6 CAP) | | | | | | | 3,66 | | |
| Klasse | | | | | | | 3 | | |
| Katzenepithel (E1 CAP) | | | | | | | 8,61 | | |
| Klasse | | | | | | | 3 | | |
| Tryptase (TrypCAP auf Immunocap 250 (Phadia) microg/l | 19 | 5,29 | | 3,26 | 5,08 | 36,6 | 4,57 | 3,14 | 6,31 |

– Anhang –

| Patient-ID | 190924-P10 | 190924-P11 | 190926-P12 | 191029-P13 | 191107-P14 | 191112-P15 | 191113-P16 | 191113-P17 | 191119-P18 |
|--|---------------|-------------|---|--------------|-------------------|------------|-------------------------------------|--------------|-------------------|
| Alter | 53 | 67 | 47 | 48 | 49 | 57 | 61 | 74 | 22 |
| Geschlecht | m | w | w | w | w | w | m | w | m |
| Allergie-Diagnose | W | W | W | B | B | B und W | B und W | B | B und W |
| Anaphylaxie-Grad | I | I | II | II - III | II | II | II | III - IV | II |
| Sensibilisierung ohne klinische Relevanz | B | | | | | | | | |
| i.c. Biene | neg. | neg. | neg. | pos ab 0,001 | pos ab 0,0001 | pos ab 0,1 | pos ab 0,0001 | pos ab 0,001 | pos ab 0,01 |
| i.c. Wespe | pos ab 0,0001 | pos ab 0,01 | pos ab 0,001 | neg bis 0,1 | neg bis 0,1 | pos ab 0,1 | neg | neg bis 0,1 | pos ab 0,01 |
| weitere Befunde | | | RCA saisonalis, Allergie auf Penicillin & Chinolone | | RCA saisonalis | | vor 18 J. Hyposens. gegen YJV | | RCA saisonalis |
| Gesamt-IgE (TIE CAP) | 934 | | 90,5 | 103 | 146 | 20,4 | 77,1 | 83,3 | 144 |
| Bienengift I1 CAP | 1,86 | neg. | neg. | | | | | 13,9 | 8,38 |
| Klasse | 2 | | | 4 | 4 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| rApi m1 (I208CAP) | neg. | neg. | neg. | | | | | 3,98 | 0,69 |
| Klasse | | | | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| rApi m2 (I214CAP) | neg. | | neg. | | | | | | 6,91 |
| Klasse | | 1 | | 4 | 5 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| rApi m3 (I215CAP) | neg. | neg. | neg. | neg. | | | | | 0,19 |
| Klasse | | | | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| rApi m5 (I216 CAP) | neg. | | neg. | | | | | | 9,71 |
| Klasse | | 1 | | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 |
| rApi m10 (I217 CAP) | neg. | neg. | neg. | neg. | | | | | 0,34 |
| Klasse | | | | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Wespengift (I3 CAP) | 16,2 | | 13,2 | neg. | | | | | 2,61 |
| Klasse | 3 | 3 | 3 | 0 | | 3 | 2 | 0 | 2 |
| Wespengift (I3 DPC) | | | | | | | | | |
| Klasse | | | | | | | | | |
| rVesv1 (I211 CAP) | neg. | | 7,55 | | | | | | 1,06 |
| Klasse | | 2 | 3 | 0 | | 3 | 2 | 0 | 2 |
| rVesv5 (A670 DPC) KU/I | | | | | | | | | |
| Klasse | | | | | | | | | |
| rVesv5 (I209 CAP) KU/I | 16,9 | | 7,38 | | | | | | 0,13 |
| Klasse | 3 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hornisse (I75 CAP) | | | | | | | | | |
| Klasse | | | | | | | | | |
| CCD, MUXF3 aus Bromelin (O214 CAP) | neg. | neg. | neg. | | | | | | 13,9 |
| Klasse | | | | 0 | | 0 | 2 | 2 | 3 |
| Derm. Pteronyssinus (D1CAP) | | | neg. | | | | | | |
| Klasse | | | | | | | | | |
| Lieschgras (G6 CAP) | | | 2,31 | | | | | | |
| Klasse | | | 2 | | | | | | |
| rBet v1 (Birke) (T215 CAP) | | | 9,64 | | | | | | |
| Klasse | | | 3 | | | | | | |
| Tryptase (TrypCAP auf Immunocap 250 (Phadia) microg/l | 4,41 | | 3,35 | 4,06 | 2,81 | 6,58 | | 4,13 | |

– Anhang –

| Patient-ID | 191204-P19 | 191204-P20 | 191216-P21 | 200121-P22 | 200129-P23 | 200204-P24 | 200224-P25 | 200804-P26 | 200819-P27 |
|--|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|----------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------|
| Alter | 35 | 51 | 34 | 48 | 73 | 71 | 73 | 28 | 59 |
| Geschlecht | w | m | m | w | m | w | m | m | m |
| Allergie-Diagnose | B | B und W | B | W | B | B und W, Hornisse | B und W | W, Hornisse | W |
| Anaphylaxie-Grad | II | I | I | II | II | I | II | II | IV |
| Sensibilisierung ohne klinische Relevanz | W | | W | B | W | | | | |
| i.c. Biene | pos ab 0,0001 | pos ab 0,01 | pos ab 0,0001 | neg | pos ab 0,001 | pos ab 0,001 | pos ab 0,001 | neg bis 0,1 | neg bis 0,1 |
| i.c. Wespe | neg | pos ab 0,0001 | neg | pos ab 0,0001 | neg bis 0,1 | pos ab 0,1 | pos ab 0,001 | pos ab 0,01 | pos ab 0,1 |
| weitere Befunde | | OAS (Nuss) | | | | | RCA saisonalis | RCA saisonalis, OAS (Apfel) | Masto- zytose |
| Gesamt-IgE (TIE CAP) | 93,8 | 76,7 | 127 | | | 284 | 207 | | 117 |
| Gesamt-IgE (TIE DPC) IU/ml | | | | 89,3 | 49,4 | | | 234 | |
| Bienengift I1 CAP | >100 | 0,885 | > 100 | | | | 5,46 | | |
| Klasse | 6 | 2 | 6 | | | 5 | 3 | | 0 |
| Bienengift I1 DPC | | | | 0,746 | 47,7 | | | 4,02 | |
| Klasse | | | | 2 | 4 | | | 3 | |
| rApi m1 (I208CAP) | 37,3 | | 34,7 | | 20,6 | | 1,71 | | |
| Klasse | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 2 | | 0 |
| rApi m2 (I214CAP) | 18,7 | 1,49 | | | | | | | |
| Klasse | 4 | 2 | | | | | 0 | | 0 |
| rApi m2 (A46 DPC) | | | <0,1 | | | | | 0,122 | |
| Klasse | | | 0 | 0 | 0 | | | 0 | |
| rApi m3 (I215CAP) | 1,43 | | 12,7 | | 2,08 | | 1,27 | | |
| Klasse | 2 | 0 | 3 | 0 | 2 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| rApi m5 (I216 CAP) | | 1,34 | 8,72 | | | | | | |
| Klasse | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| rApi m10 (I217 CAP) | 1,28 | | 2,54 | | 4,17 | | 1,01 | | |
| Klasse | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| Wespengift (I3 CAP) | 0,463 | 29,9 | | | | | 2,68 | | 1,92 |
| Klasse | 1 | 4 | | | | 3 | 2 | | 2 |
| Wespengift (I3 DPC) | | | 2,74 | 56,9 | 0,409 | | | 4,16 | |
| Klasse | | | 2 | 5 | 1 | | | 3 | |
| rVesv1 (I211 CAP) | <0,1 | 1,87 | 0,72 | | 0,11 | | 0,34 | 0,78 | 0,42 |
| Klasse | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| rVesv5 (A670 DPC) KU/I | | | | | | | | 5,44 | |
| Klasse | | | | | | | | 3 | |
| rVesv5 (I209 CAP) KU/I | | 16 | 0,18 | 60,9 | 0,5 | | 2,35 | | 1,39 |
| Klasse | 0 | 3 | 0 | 5 | 1 | 2 | 2 | | 2 |
| Hornisse (I75 CAP) | | | | | | | | | |
| Klasse | | | | | | 3 | | | |
| CCD, MUXF3 aus Bromelin (O214 CAP) | 2,85 | | | | | | | | |
| Klasse | 2 | 0 | | | | 3 | 0 | | 0 |
| CCD, MUXF3 aus Bromelin (O214 DPC) | | | <0,1 | 0,718 | | | | 2,96 | |
| Klasse | | | 0 | 2 | 0 | | | 2 | |
| Derm. Pteronyssinus (D1CAP) | | | | | | | | 4 | |
| Klasse | | | | | | | | 4 | |
| Lieschgras (G6 CAP) | | | | | | | 1,29 | | |
| Klasse | | | | | | | 2 | 4 | |
| rBet v1 (Birke) (T215 CAP) | | | | | | | 12,3 | | |
| Klasse | | | | | | | 3 | 4 | |
| Warzenbirke (T3 CAP) | | | | | | | 14,8 | | |
| Klasse | | | | | | | 3 | | |
| Tryptase (TrypCAP auf Immunocap 250 (Phadia) microg/l | 2,57 | 4,97 | 5,51 | 4 | | | 7,61 | 3,09 | 20,4 |

– Anhang –

| Patient-ID | 200824-P28 | 200826-P29 | 200831-P30 | 200831-P31 | 200923-P32 | 201027-P33 | 201029-P34 |
|--|--------------|--------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| Alter | 32 | 44 | 36 | 77 | 64 | 37 | 75 |
| Geschlecht | m | m | m | m | w | w | m |
| Allergie-Diagnose | W, Hornisse | B | W | W | B und W | B | B und W |
| Anaphylaxie-Grad | II | III | II | II | II | II | I |
| Sensibilisierung ohne klinische Relevanz | B | W | B | B | | W | |
| i.c. Biene | pos ab 0,001 | pos ab 0,01 | pos ab 0,01 | neg bis 0,1 | pos ab 0,0001 | pos ab 0,001 | neg bis 0,1 |
| i.c. Wespe | pos ab 0,001 | pos ab 0,001 | pos ab 0,01 | pos ab 0,0001 | pos ab 0,01 | pos ab 0,1 | pos ab 0,0001 |
| weitere Befunde | | Mastozytose | | | | | |
| Gesamt-IgE (TIE CAP) | 127 | 186 | 22,6 | 108 | 6,97 | 54,4 | 196 |
| Bienengift I1 CAP | | 2,75 | 0,97 | 7,28 | 0,54 | 3,36 | 3,6 |
| Klasse | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| rApi m1 (I208CAP) | | 0,95 | 0,85 | 0,135 | | 2,03 | |
| Klasse | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| rApi m2 (I214CAP) | | | | 0,657 | | | |
| Klasse | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| rApi m3 (I215CAP) | | | | 0,1 | | 0,16 | 0,28 |
| Klasse | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| rApi m5 (I216 CAP) | | | | 0,29 | | 0,51 | |
| Klasse | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| rApi m10 (I217 CAP) | | | | 0,68 | | | 3,1 |
| Klasse | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| Wespengift I3 CAP) | | 2,28 | 0,74 | 57,6 | 0,81 | 1,74 | 9,98 |
| Klasse | 4 | 2 | 2 | 5 | 2 | 2 | 3 |
| rVesv1 (I211 CAP) | | | | 9,14 | | | 0,12 |
| Klasse | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| rVesv5 (I209 CAP) KU/I | | 1,85 | | 21,5 | 0,52 | 1,34 | 10,6 |
| Klasse | 3 | 2 | 0 | 4 | 1 | 2 | 3 |
| Hornisse (I75 CAP) | | | | | | | |
| Klasse | 3 | | | | | | |
| CCD, MUXF3 aus Bromelin (O214 CAP) | | | | 9,52 | | | 0,24 |
| Klasse | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Tryptase (TrypCAP auf Immunocap 250 (Phadia) microg/l | 3,56 | 26,7 | 5,69 | 2,2 | 5,09 | | 14,3 |

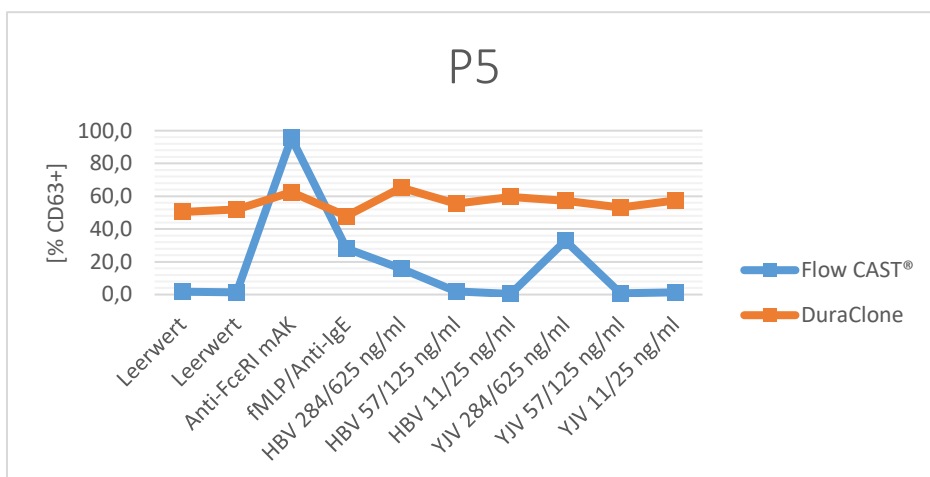
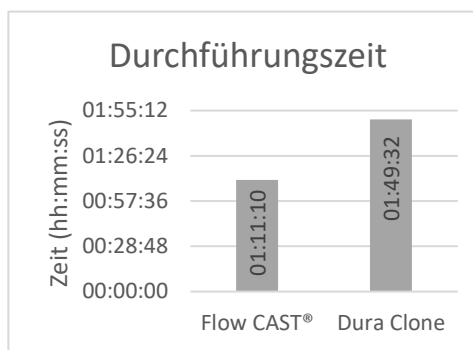
Ergebnisse des Flow CAST® in der Erprobung homologer Allergene

| Nr | Inhalt | Konzentration [ng/ml] | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 | P12 | P13 | P14 | P15 | P16 | P17 | P18 | P19 | P20 | P21 |
|----|------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
| 1 | LW | | 0,8 | 1,4 | 0,2 | 0,6 | 2,5 | 0,4 | 0,2 | 2,7 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 1,0 | 0,4 | 0,4 | 1,6 | | 1,0 | 1,8 | 2,0 | 4,8 | 1,2 |
| 2 | LW | | 0,8 | 1,2 | 0,4 | | 0,8 | 0,2 | 0,6 | | | 0,2 | 0,8 | 0,0 | | | 2,5 | 1,0 | | 1,6 | 1,6 | 1,2 | |
| 3 | Anti-FceRI | | 98,4 | 92,3 | 76,5 | 86,8 | 96,7 | 87,0 | 7,4 | 69,5 | 84,4 | 97,1 | 95,1 | 96,5 | 19,7 | 82,3 | 64,9 | 81,2 | 4,4 | 88,0 | 83,6 | 34,4 | 76,4 |
| 4 | fMLP | | 39,7 | 69,9 | 57,3 | 24,7 | 64,1 | 53,3 | 45,8 | 48,8 | 20,6 | 43,0 | 48,0 | 17,4 | 40,1 | 22,5 | 30,8 | 11,2 | 8,4 | 42,5 | 63,7 | 26,2 | 78,2 |
| 5 | HBV | 284 | 0,2 | 35,1 | 0,4 | 33,5 | 24,5 | 65,3 | 12,9 | 2,4 | 0,2 | 3,9 | 0,2 | 0,4 | 1,0 | 5,0 | 7,7 | 47,6 | 0,4 | 2,6 | 52,9 | 2,3 | 82,8 |
| 6 | YJV | 284 | 86,3 | 48,3 | 74,1 | 11,6 | 23,8 | 20,6 | 0,0 | 67,7 | 73,4 | 92,5 | 85,5 | 92,5 | 0,0 | 0,4 | 70,7 | 84,0 | 0,2 | 5,0 | 0,4 | 37,8 | 22,8 |
| 7 | Pol PLA2 | 1000 | 0,4 | 6,1 | 0,2 | 0,6 | 0,2 | 10,8 | 0,6 | 0,7 | 1,4 | 0,4 | 2,2 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 2,1 | 1,1 | 1,6 | 1,2 | 2,6 | | 0,4 |
| 8 | Pol PLA2 | 200 | 0,2 | 3,4 | 0,0 | 0,8 | 0,2 | 1,6 | 0,8 | 2,1 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 0,0 | 2,0 | 1,4 | 0,4 | 1,0 | 1,2 | | 0,6 |
| 9 | Pol PLA2 | 40 | 0,6 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 1,4 | 0,2 | 1,7 | 0,6 | 0,2 | 0,8 | 0,8 | 0,2 | 0,2 | 1,4 | 3,4 | 1,4 | 2,2 | 1,6 | | 0,8 |
| 10 | Pol PLA2 | 8 | 0,2 | 3,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 0,0 | 0,6 | 0,2 | 0,6 | 0,2 | 2,2 | 0,3 | 1,0 | 2,2 | 1,4 | | 1,0 |
| 11 | Pol PLA2 | 1,6 | 0,4 | 3,6 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 1,0 | 0,2 | 1,8 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 2,2 | 3,5 | 1,8 | 1,6 | 1,6 | | 0,8 |
| 12 | Api m 1 | 1000 | 3,6 | 71,1 | 0,2 | 41,0 | 31,5 | 59,4 | 1,4 | 5,7 | 6,9 | 0,6 | 0,8 | 0,4 | 7,7 | 33,9 | 31,5 | 65,1 | 1,2 | 6,2 | 52,4 | | 24,2 |
| 13 | Api m 1 | 200 | 0,6 | 61,8 | 0,2 | 43,5 | 36,7 | 68,9 | 2,2 | 2,9 | 3,0 | 0,2 | 0,8 | 1,0 | 8,1 | 15,7 | 22,5 | 67,4 | 2,2 | 5,8 | 68,8 | | 30,8 |
| 14 | Api m 1 | 40 | 0,8 | 47,2 | 0,0 | 60,5 | 13,8 | 61,9 | 3,0 | 2,1 | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 1,4 | 1,8 | 3,8 | 38,3 | 45,6 | 2,4 | 2,6 | 79,8 | | 44,8 |
| 15 | Api m 1 | 8 | 0,2 | 40,8 | 1,1 | 46,7 | 1,0 | 62,6 | 3,8 | 1,2 | 0,4 | 0,0 | 0,8 | 1,0 | 0,0 | 1,4 | 22,8 | 42,4 | 1,8 | 2,2 | 73,3 | | 67,7 |
| 16 | Api m 1 | 1,6 | 0,8 | 22,2 | 0,0 | 22,3 | 0,6 | 28,8 | 7,0 | 2,5 | 0,8 | 0,0 | 1,2 | 0,6 | 0,2 | 1,0 | 4,4 | 19,8 | 1,6 | 2,4 | 41,2 | | 84,3 |
| 17 | Api m 2 | 1000 | 0,0 | 50,0 | 0,0 | 1,0 | 44,8 | 0,6 | | 1,0 | 1,6 | 0,4 | 37,4 | 1,2 | 3,8 | 18,9 | 15,9 | | | 3,2 | 56,5 | 20,4 | |
| 18 | Api m 2 | 200 | 0,6 | 22,5 | 0,0 | 0,6 | 60,9 | 1,0 | | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 32,9 | 0,8 | 5,4 | 41,5 | 46,8 | | | 2,0 | 65,3 | 9,6 | |
| 19 | Api m 2 | 40 | 0,4 | 21,1 | 0,4 | 0,6 | 43,3 | 1,2 | | 3,1 | 0,0 | 0,4 | 10,8 | 1,0 | 1,0 | 40,5 | 40,1 | | | 2,4 | 34,4 | 2,3 | |
| 20 | Api m 2 | 8 | 1,4 | 17,7 | 0,4 | 0,2 | 10,1 | 0,2 | | 3,1 | 0,6 | 0,4 | 6,9 | 0,8 | 0,0 | 14,5 | 11,3 | | | 0,8 | 7,0 | 2,1 | |
| 21 | Api m 2 | 1,6 | 1,0 | 8,7 | 0,2 | 0,0 | 2,2 | 0,6 | | 4,1 | 0,6 | 0,0 | 1,6 | 0,4 | 0,6 | 3,6 | 3,0 | | | 1,4 | 2,2 | 2,5 | |
| 22 | Ves v 2b | 1000 | 1,0 | 5,3 | 0,8 | 0,0 | 2,1 | 9,5 | | 1,4 | 3,3 | 0,4 | 1,2 | 0,2 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | | | 2,4 | 5,6 | 3,7 | |
| 23 | Ves v 2b | 200 | 0,8 | 5,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | | 1,3 | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 1,2 | 0,8 | 0,6 | 1,0 | | | 1,2 | 1,4 | 2,5 | |
| 24 | Ves v 2b | 40 | 0,4 | 3,0 | 0,0 | 0,2 | 1,2 | 0,8 | | 1,4 | 0,8 | 0,2 | 0,8 | 1,8 | 0,4 | 0,8 | 1,8 | | | 2,0 | 1,6 | 1,9 | |
| 25 | Ves v 2b | 8 | 0,6 | 3,4 | 0,2 | 0,8 | 0,0 | 0,2 | | 3,0 | 0,6 | 0,4 | 0,8 | 0,2 | 0,0 | 0,6 | 1,0 | | | 0,8 | 1,8 | 2,4 | |
| 26 | Ves v 2b | 1,6 | 0,8 | 2,4 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | | 5,8 | 0,8 | 0,2 | 1,0 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | | | 0,6 | 1,0 | 1,2 | |
| 27 | Pol d 2 | 1000 | 0,2 | 6,0 | 0,4 | 1,0 | 6,9 | 7,6 | | 1,7 | 4,3 | 0,2 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,2 | 1,4 | | | 0,8 | 1,2 | 2,1 | |
| 28 | Pol d 2 | 200 | 0,0 | 2,3 | 0,0 | 0,4 | 5,3 | 0,4 | | 2,0 | 0,4 | 0,0 | 0,6 | 1,2 | 0,4 | 0,4 | 2,8 | | | 1,4 | 0,8 | 2,7 | |
| 29 | Pol d 2 | 40 | 0,4 | 2,7 | 0,2 | 0,8 | 2,2 | 0,6 | | 3,2 | 0,6 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 2,0 | | | 0,6 | 0,8 | 1,6 | |
| 30 | Pol d 2 | 8 | 0,6 | 3,8 | 0,0 | 0,2 | 1,0 | 1,2 | | 3,2 | 1,2 | 0,0 | 0,4 | 2,2 | 0,4 | 0,2 | 1,2 | | | 1,0 | 1,6 | 1,8 | |
| 31 | Pol d 2 | 1,6 | 0,2 | 3,3 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 1,4 | | 2,8 | 0,2 | 0,2 | 1,4 | 1,0 | 0,2 | 0,8 | 0,8 | | | 0,6 | 1,2 | 0,4 | |

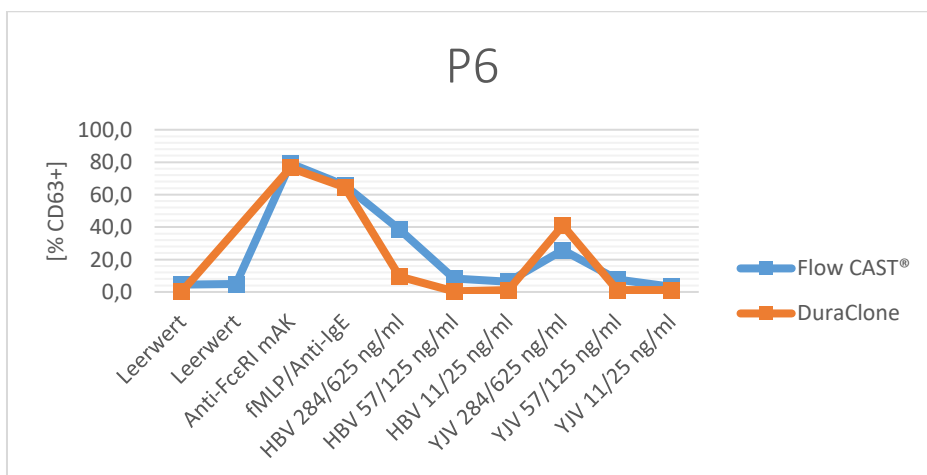
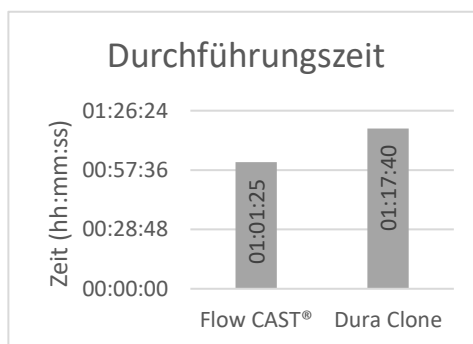
| Nr | Inhalt | Konzentration [ng/ml] | Kontrolle 1 | Kontrolle 2 | Kontrolle 3 | Kontrolle 4 |
|----|------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | LW | | 1,2 | 0,6 | 0,8 | 1,4 |
| 2 | LW | | 0,8 | | 0,6 | 0,4 |
| 3 | Anti-FceRI | | 95,0 | 93,7 | 78,6 | 94,1 |
| 4 | fMLP | | 81,7 | 68,4 | 13,9 | 25,3 |
| 5 | HBV | 284 | 1,6 | 0,6 | 0,6 | 1,0 |
| 6 | YJV | 284 | 0,4 | 0,8 | 0,0 | 0,4 |
| 7 | Pol PLA2 | 1000 | 1,6 | 0,8 | 0,8 | 0,0 |
| 8 | Pol PLA2 | 200 | 0,8 | 0,2 | 0,0 | 0,4 |
| 9 | Pol PLA2 | 40 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 0,6 |
| 10 | Pol PLA2 | 8 | 1,4 | 0,2 | 0,4 | 0,0 |
| 11 | Pol PLA2 | 1,6 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 1,0 |
| 12 | Api m 1 | 1000 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 0,4 |
| 13 | Api m 1 | 200 | 0,8 | 0,0 | 0,4 | 0,8 |
| 14 | Api m 1 | 40 | 0,4 | 0,8 | 0,4 | 0,4 |
| 15 | Api m 1 | 8 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 16 | Api m 1 | 1,6 | 0,4 | 0,6 | 1,2 | 0,4 |
| 17 | Api m 2 | 1000 | 0,2 | 0,8 | 0,4 | 1,2 |
| 18 | Api m 2 | 200 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 0,4 |
| 19 | Api m 2 | 40 | 0,8 | 1,2 | 0,6 | 0,4 |
| 20 | Api m 2 | 8 | 0,8 | 1,0 | 0,4 | 0,6 |
| 21 | Api m 2 | 1,6 | 0,4 | 0,8 | 0,6 | 0,2 |
| 22 | Ves v 2b | 1000 | 2,4 | 1,4 | 0,4 | 1,4 |
| 23 | Ves v 2b | 200 | 1,6 | 0,8 | 0,4 | 0,4 |
| 24 | Ves v 2b | 40 | 0,4 | 0,4 | 1,0 | 0,4 |
| 25 | Ves v 2b | 8 | 0,2 | 1,2 | 0,2 | 0,4 |
| 26 | Ves v 2b | 1,6 | 0,4 | 0,6 | 1,0 | 1,2 |
| 27 | Pol d 2 | 1000 | 0,6 | 0,4 | 1,0 | 0,8 |
| 28 | Pol d 2 | 200 | 0,8 | 0,0 | 0,2 | 0,4 |
| 29 | Pol d 2 | 40 | 0,2 | 1,2 | 0,2 | 0,8 |
| 30 | Pol d 2 | 8 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 1,4 |
| 31 | Pol d 2 | 1,6 | 0,8 | 0,8 | 0,2 | 0,2 |

Vergleich von Flow CAST® und Dura Clone IF Basophil Activation®

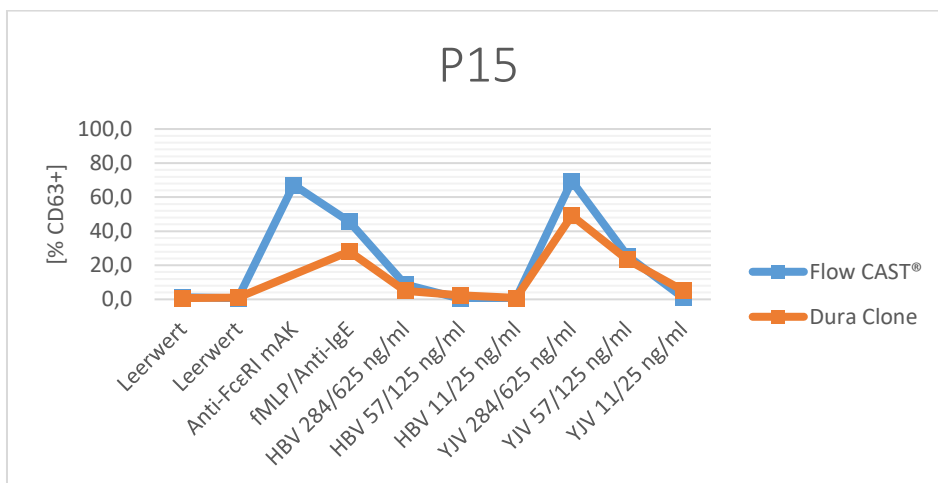
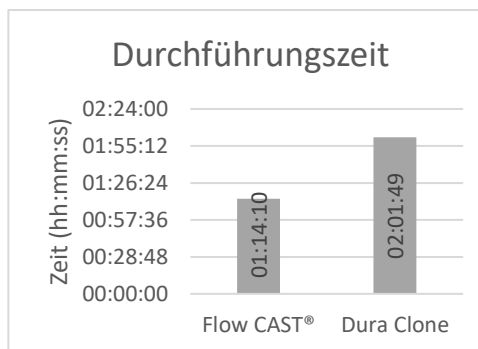
| | P5 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 1,8 | 50,4 |
| 2 | Leerwert | 1,4 | 51,9 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 95,5 | 62,5 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 28,1 | 47,9 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 15,8 | 65,2 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 2,0 | 55,5 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 0,4 | 59,5 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 32,8 | 57,2 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 0,8 | 53,1 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 1,4 | 57,5 |



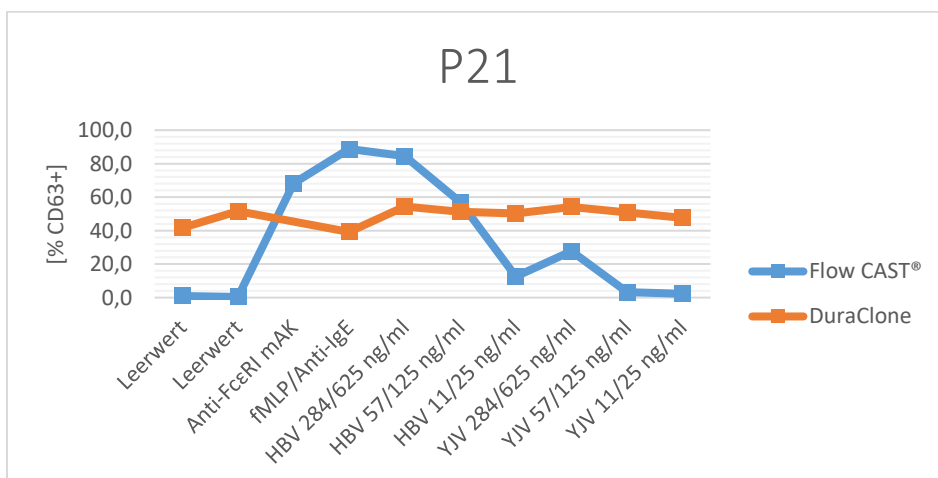
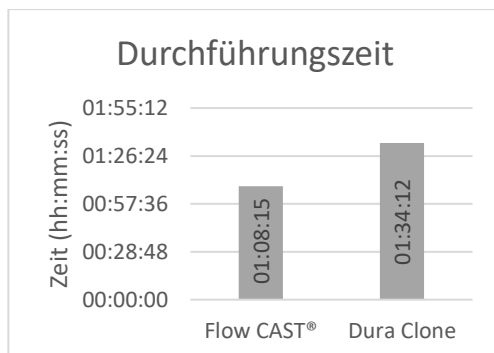
| | P6 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 4,6 | 0,2 |
| 2 | Leerwert | 5,0 | |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 79,2 | 76,5 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 65,8 | 64,6 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 38,4 | 9,5 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 8,2 | 0,4 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 6,4 | 1,1 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 25,8 | 41,0 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 7,6 | 1,1 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 3,2 | 1,1 |



| P15 | | Flow CAST® | Dura Clone |
|-----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 1,2 | 0,7 |
| 2 | Leerwert | 0,6 | 1,0 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 67,1 | |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 45,6 | 28,2 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 8,7 | 5,1 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 0,4 | 2,4 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 0,6 | 0,9 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 69,5 | 49,2 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 25,5 | 23,2 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 1,0 | 5,2 |

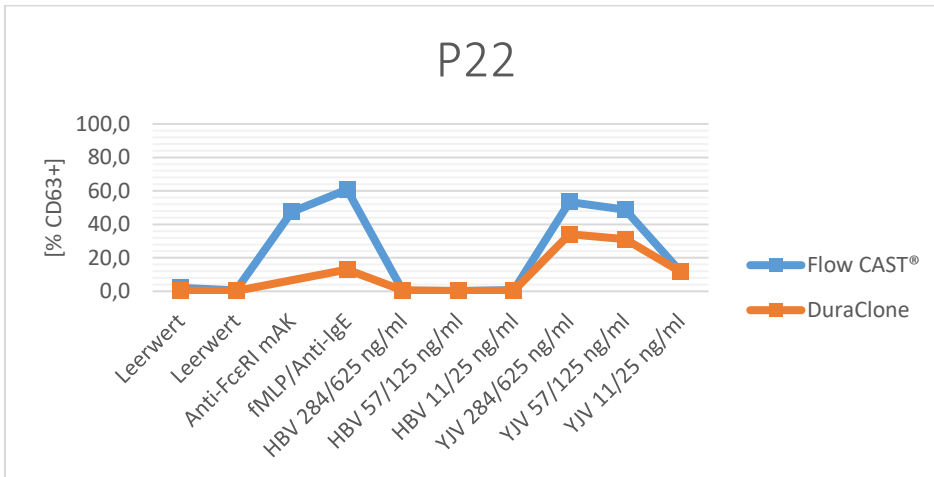
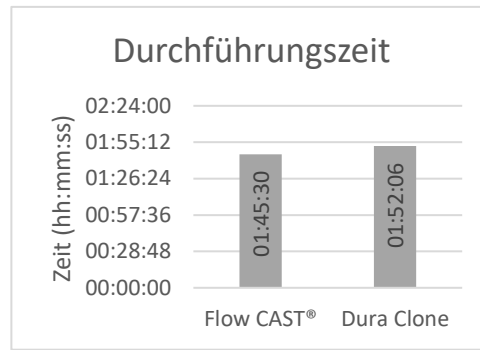


| P21 | | Flow CAST® | Dura Clone |
|-----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 1,0 | 41,7 |
| 2 | Leerwert | 0,4 | 51,7 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 68,2 | |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 88,8 | 39,2 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 84,6 | 54,4 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 57,0 | 51,3 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 12,6 | 50,3 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 27,7 | 54,1 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 3,2 | 50,9 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 2,2 | 47,7 |

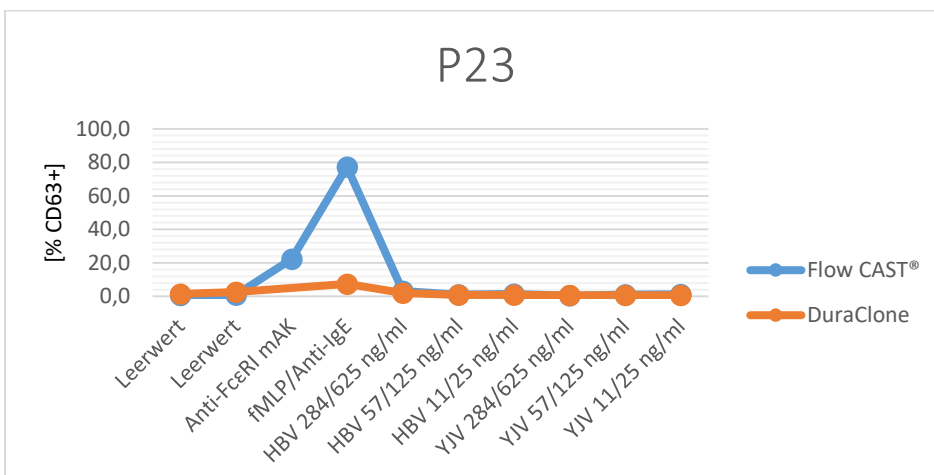
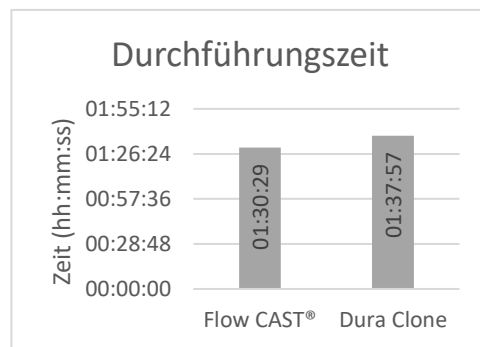


– Anhang –

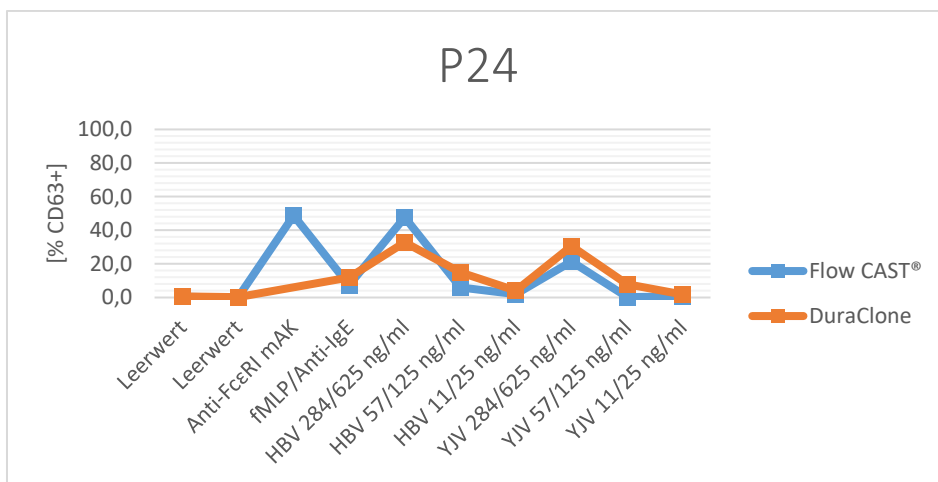
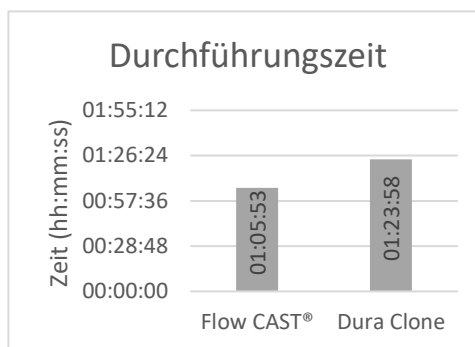
| | P22 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 2,0 | 0,3 |
| 2 | Leerwert | 0,6 | 0,2 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 47,5 | |
| 4 | fMPL/Anti-IgE | 60,8 | 13,0 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 0,4 | 0,6 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 0,2 | 0,2 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 0,8 | 0,4 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 53,4 | 34,1 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 48,7 | 31,1 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 11,6 | 11,7 |



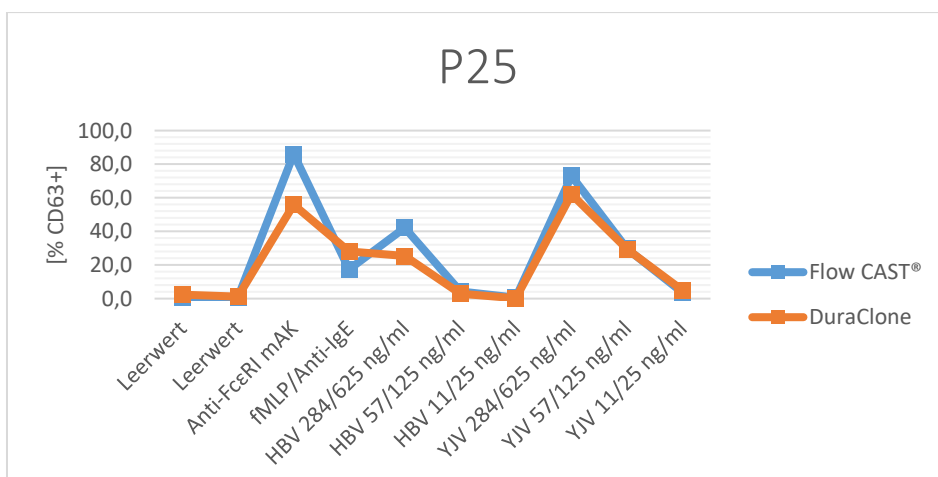
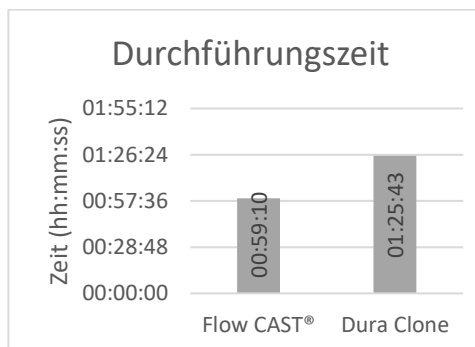
| | P23 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 0,6 | 1,5 |
| 2 | Leerwert | 0,8 | 2,5 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 22,2 | |
| 4 | fMPL/Anti-IgE | 77,3 | 7,4 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 3,2 | 2,1 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 1,0 | 0,8 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 1,4 | 0,8 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 0,4 | 0,6 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 1,0 | 0,6 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 1,2 | 0,6 |



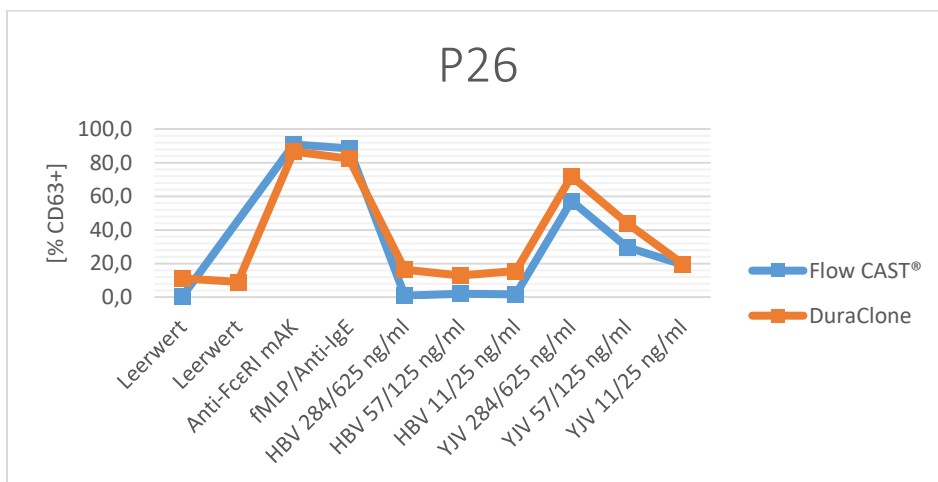
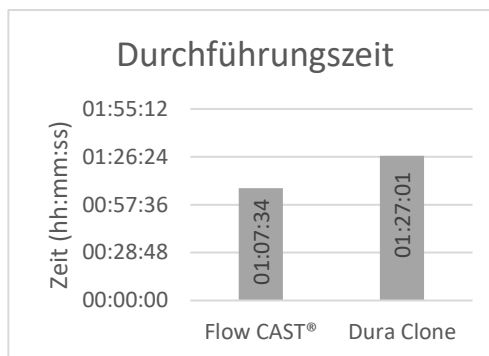
| | P24 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 0,4 | 0,6 |
| 2 | Leerwert | 0,0 | 0,2 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 48,8 | |
| 4 | fMPLP/Anti-IgE | 7,2 | 11,8 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 47,7 | 32,8 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 6,1 | 14,9 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 2,0 | 4,1 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 21,3 | 30,5 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 0,2 | 7,8 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 0,6 | 1,9 |



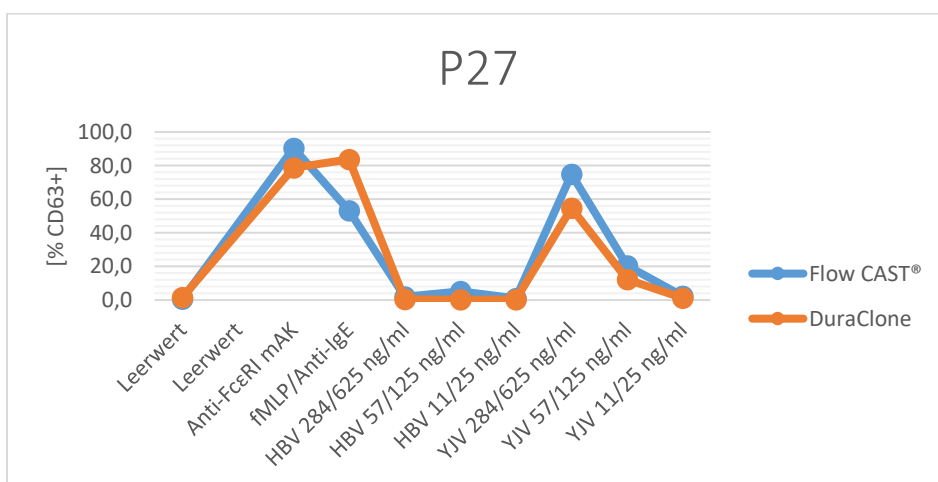
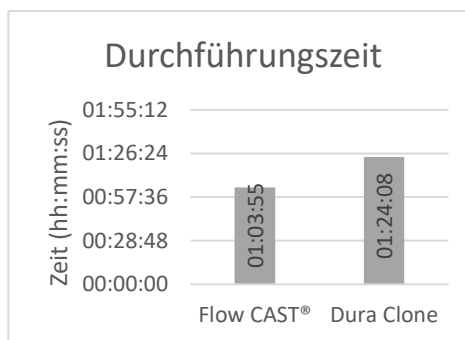
| | P25 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 0,8 | 2,3 |
| 2 | Leerwert | 0,8 | 1,3 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 86,0 | 55,8 |
| 4 | fMPLP/Anti-IgE | 17,4 | 28,0 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 42,2 | 25,4 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 4,2 | 2,9 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 0,6 | 0,2 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 73,1 | 62,1 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 29,5 | 29,4 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 3,6 | 4,8 |



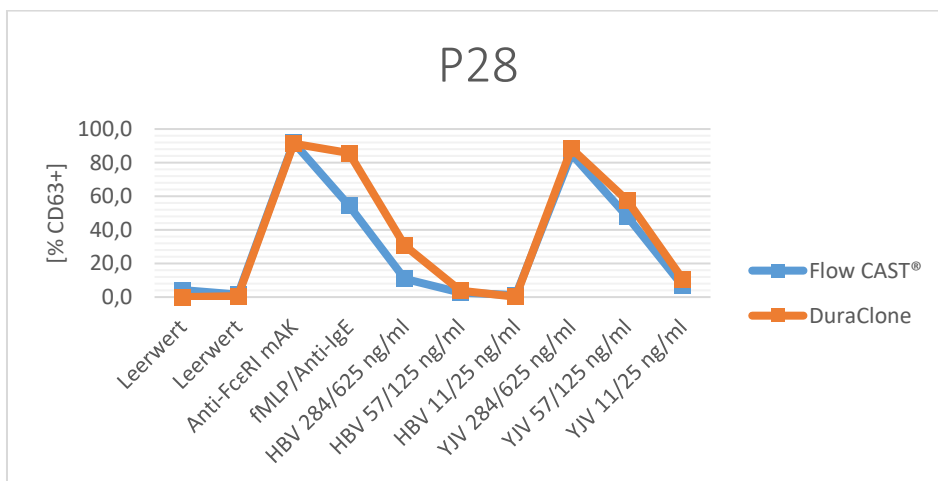
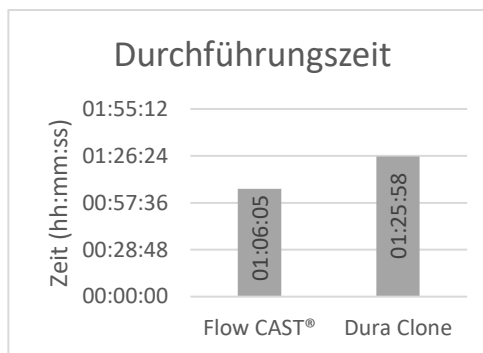
| | P26 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 0,4 | 11,1 |
| 2 | Leerwert | | 9,1 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 90,8 | 86,6 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 88,5 | 82,3 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 0,8 | 16,2 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 2,0 | 12,9 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 1,6 | 15,5 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 57,2 | 71,9 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 29,7 | 44,0 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 19,3 | 19,8 |



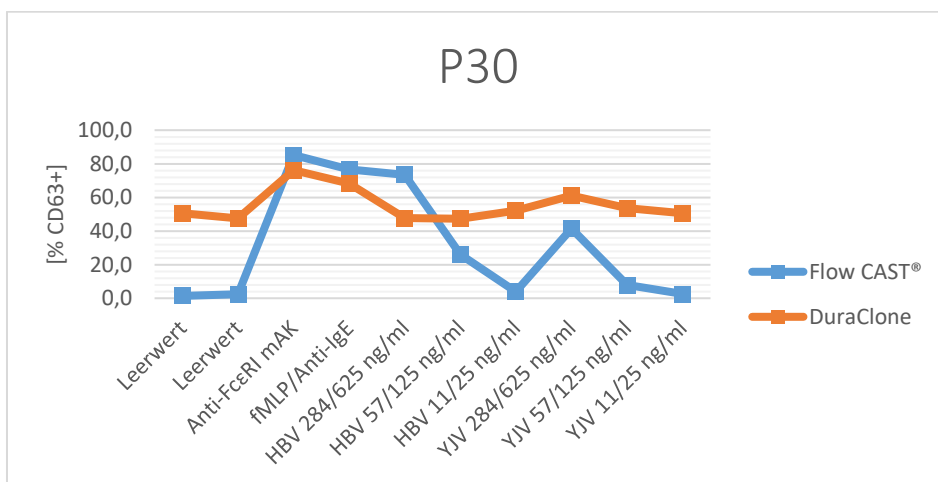
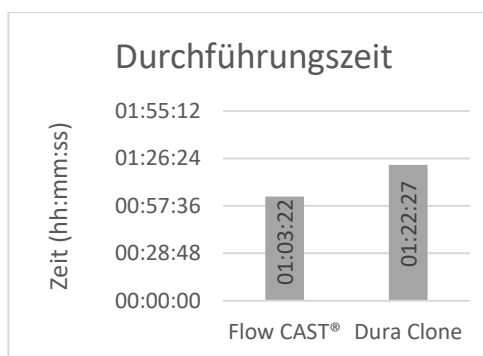
| | P27 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 0,6 | 1,7 |
| 2 | Leerwert | | |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 90,4 | 78,7 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 53,2 | 83,7 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 2,0 | 0,4 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 5,2 | 0,2 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 1,0 | 0,2 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 75,0 | 54,7 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 20,4 | 12,2 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 2,4 | 1,3 |



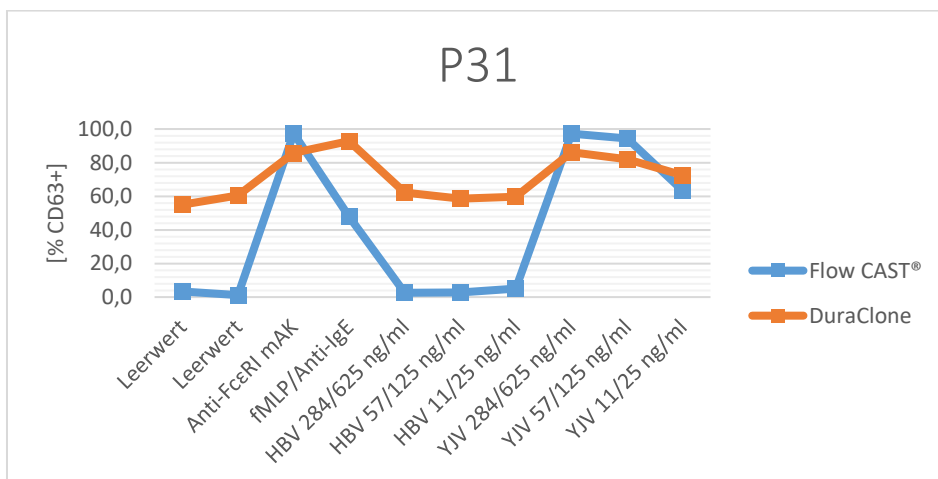
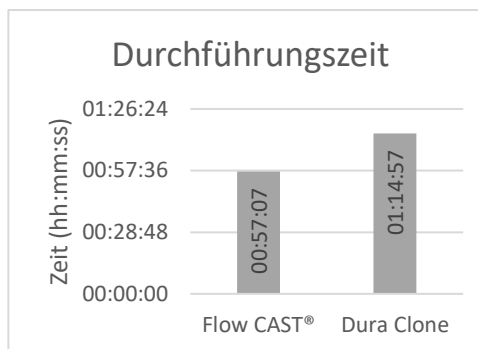
| | P28 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 4,2 | 0,0 |
| 2 | Leerwert | 1,6 | 0,6 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 92,0 | 91,3 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 54,4 | 85,7 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 10,8 | 30,6 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 2,6 | 3,7 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 1,2 | 0,2 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 85,2 | 88,3 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 48,0 | 57,5 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 6,6 | 10,6 |



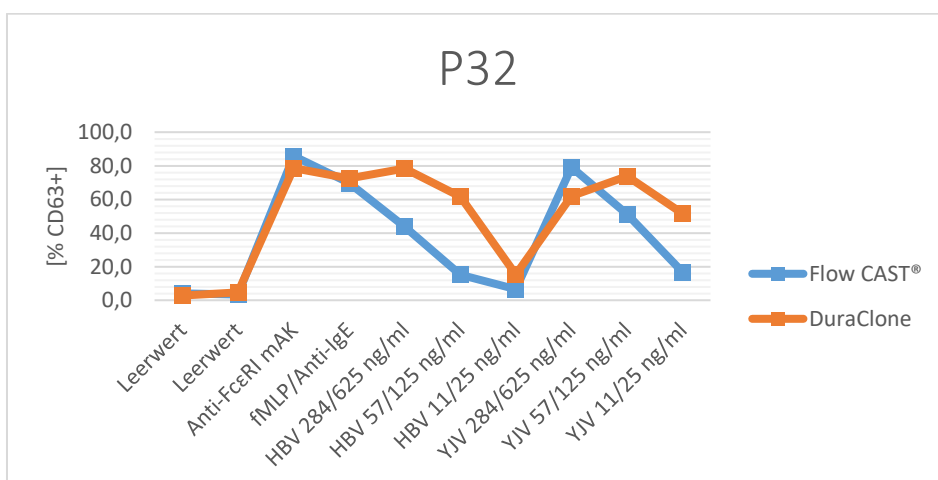
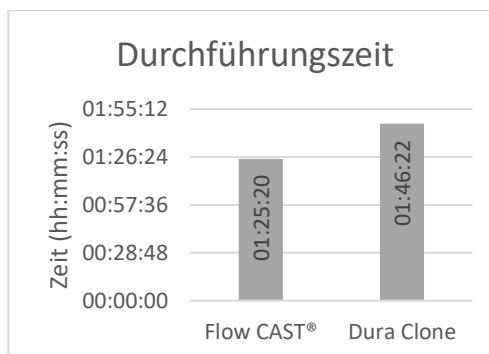
| | P30 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 1,4 | 50,5 |
| 2 | Leerwert | 2,4 | 47,6 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 85,2 | 76,2 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 76,6 | 68,2 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 73,4 | 47,7 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 26,0 | 47,3 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 4,0 | 52,1 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 41,4 | 61,1 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 8,0 | 53,6 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 2,6 | 50,5 |



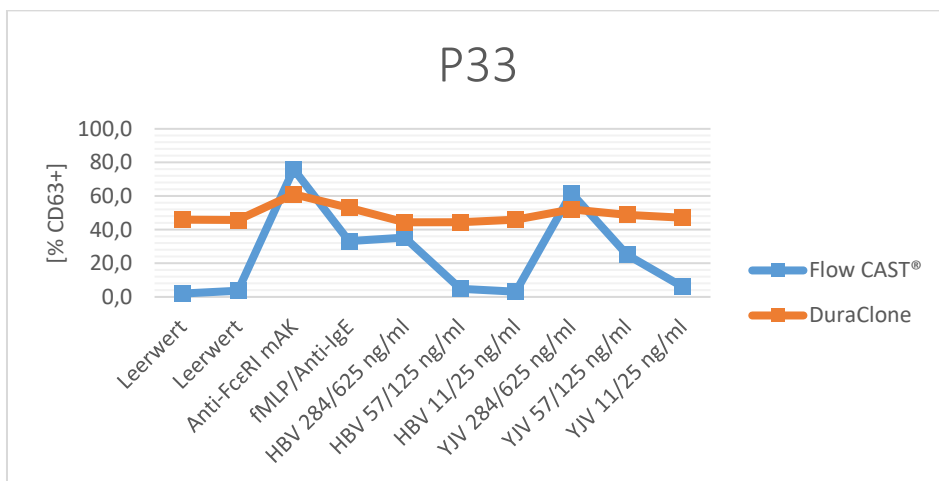
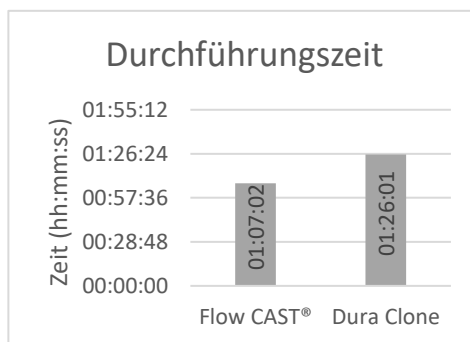
| | P31 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 3,4 | 55,0 |
| 2 | Leerwert | 1,2 | 60,5 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 97,4 | 85,8 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 48,0 | 92,8 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 2,6 | 62,2 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 2,8 | 58,6 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 5,0 | 59,8 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 97,2 | 86,2 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 94,4 | 82,1 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 63,4 | 72,5 |



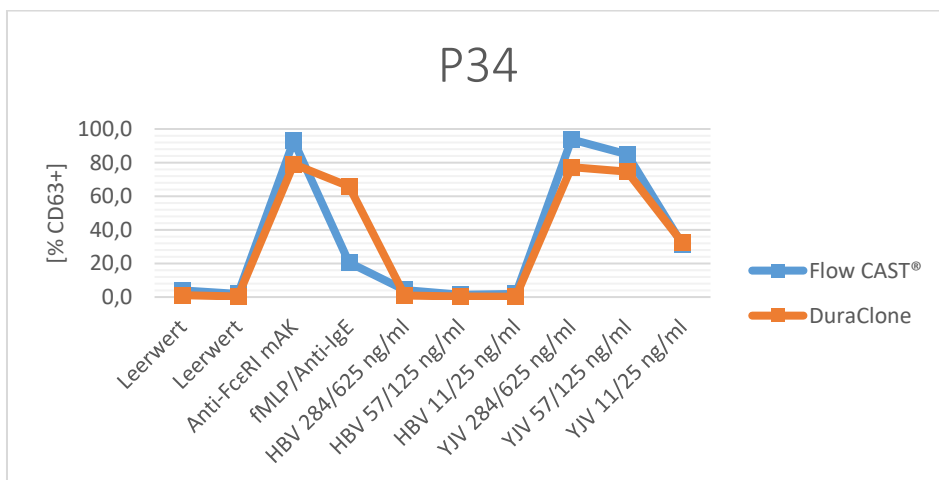
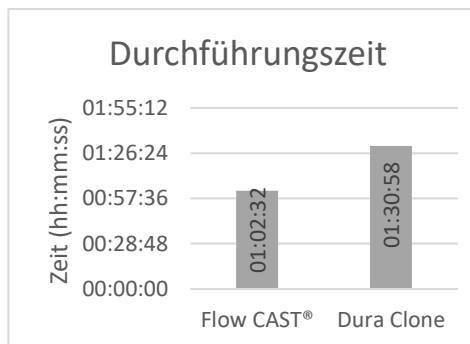
| | P32 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 4,1 | 2,8 |
| 2 | Leerwert | 3,4 | 4,6 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 85,8 | 78,6 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 69,9 | 72,4 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 43,8 | 78,3 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 15,2 | 61,7 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 6,6 | 15,3 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 79,2 | 62,0 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 51,2 | 73,8 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 16,6 | 51,5 |



| | P33 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 2,0 | 45,9 |
| 2 | Leerwert | 3,6 | 45,8 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 76,0 | 61,1 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 33,2 | 53,0 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 35,4 | 44,4 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 4,8 | 44,5 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 3,2 | 45,9 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 61,8 | 52,1 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 25,0 | 48,8 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 6,0 | 47,2 |



| | P34 | Flow CAST® | Dura Clone |
|----|-------------------|------------|------------|
| 1 | Leerwert | 4,0 | 1,1 |
| 2 | Leerwert | 1,8 | 0,4 |
| 3 | Anti-FcεRI mAK | 93,0 | 79,1 |
| 4 | fMLP/Anti-IgE | 20,6 | 65,9 |
| 5 | HBV 284/625 ng/ml | 4,2 | 0,8 |
| 6 | HBV 57/125 ng/ml | 1,4 | 0,4 |
| 7 | HBV 11/25 ng/ml | 1,8 | 0,2 |
| 8 | YJV 284/625 ng/ml | 93,8 | 77,4 |
| 9 | YJV 57/125 ng/ml | 85,0 | 74,7 |
| 10 | YJV 11/25 ng/ml | 31,0 | 32,1 |



Vergleich der Durchführungszeiten

| Flow CAST® | Vorbereitung | Herstellung Allergendilution | Verdünnung | 1. Schritt | Inkubation | Lyse | Inkubation | Zentrifugieren | Waschpuffer | Auswertung | Gesamt |
|------------|--------------|------------------------------|------------|------------|------------|-------|------------|----------------|-------------|------------|----------|
| 190828-P5 | 02:05 | | 01:53 | 05:22 | 25:00 | 01:00 | 04:00 | 05:00 | 01:18 | 25:32 | 01:11:10 |
| 200923-P6 | 01:51 | | | 05:11 | 25:00 | 00:52 | 04:00 | 05:00 | 01:08 | 18:23 | 01:01:25 |
| 191112-P15 | 02:00 | 01:42 | 02:47 | 04:03 | 25:00 | 00:55 | 04:00 | 05:00 | 00:58 | 19:07 | 01:05:32 |
| 191216-P21 | 01:38 | | 02:37 | 04:16 | 25:00 | 00:58 | 04:00 | 05:00 | 01:04 | 23:42 | 01:08:15 |
| 200121-P22 | 02:14 | | 02:17 | 06:09 | 25:00 | 01:12 | 04:00 | 05:00 | 01:13 | 48:11 | 01:35:16 |
| 200129-P23 | 01:46 | | 01:46 | 04:45 | 25:00 | 01:12 | 04:00 | 05:00 | 01:02 | 34:38 | 01:19:09 |
| 200204-P24 | 01:53 | | 01:59 | 04:58 | 25:00 | 01:08 | 04:00 | 05:00 | 00:58 | 13:32 | 00:58:28 |
| 200224-P25 | 01:54 | 01:12 | 01:58 | 05:25 | 25:00 | 00:41 | 04:00 | 05:00 | 01:02 | 12:58 | 00:59:10 |
| 200804-P26 | 02:08 | 01:06 | 02:05 | 05:18 | 25:00 | 00:48 | 04:00 | 05:00 | 01:21 | 20:48 | 01:07:34 |
| 200819-P27 | 01:51 | | 02:02 | 05:13 | 25:00 | 01:00 | 04:00 | 05:00 | 01:09 | 18:40 | 01:03:55 |
| 200824-P28 | 01:57 | | 02:07 | 05:06 | 25:00 | 01:01 | 04:00 | 05:00 | 01:05 | 20:49 | 01:06:05 |
| 200831-P30 | 01:54 | 01:21 | 02:03 | 05:00 | 25:00 | 00:55 | 04:00 | 05:00 | 01:04 | 17:05 | 01:03:22 |
| 200831-P31 | | | | 05:37 | 25:00 | 00:54 | 04:00 | 05:00 | 00:56 | 15:40 | 00:57:07 |
| 200923-P32 | 01:54 | 01:26 | 01:50 | 05:08 | 25:00 | 01:10 | 04:00 | 05:00 | 01:17 | 38:35 | 01:25:20 |
| 201027-P33 | 01:47 | | 02:08 | 05:12 | 25:00 | 00:53 | 04:00 | 05:00 | 01:25 | 21:37 | 01:07:02 |
| 201029-P34 | 01:29 | | | 05:34 | 25:00 | 00:48 | 04:00 | 05:00 | 01:14 | 19:27 | 01:02:32 |
| Mittelwert | 01:53 | 01:21 | 02:07 | 05:09 | 25:00 | 00:58 | 04:00 | 05:00 | 01:08 | 23:03 | 01:08:13 |
| SD | | | | | | | | | | | 00:09:58 |

| Dura Clone IF Basophil Activation® | Vorbereitung | Herstellung Allergendilution | Verdünnung | 1. Schritt | Inkubation | Lyse | Inkubation | PBS Puffer | Inkubation | PBS Puffer | Zentrifugation | Resuspension | Auswertung | Gesamt |
|------------------------------------|--------------|------------------------------|------------|------------|------------|-------|------------|------------|------------|------------|----------------|--------------|------------|----------|
| 190828-P5 | 02:10 | | 02:03 | 05:08 | 25:00 | 01:35 | 10:00 | 01:19 | 10:00 | 00:30 | 05:00 | 01:12 | 45:35 | 01:49:32 |
| 200923-P6 | 01:59 | | | 05:35 | 25:00 | 01:22 | 10:00 | 01:09 | 10:00 | 00:56 | 05:00 | 00:58 | 15:41 | 01:17:40 |
| 191112-P15 | 02:19 | 02:51 | 03:05 | 04:12 | 25:00 | 02:35 | 10:00 | 01:47 | 10:00 | | | | 1:00:00 | 02:01:49 |
| 191216-P21 | 02:43 | | 01:48 | 04:38 | 25:00 | 01:55 | 10:00 | 01:59 | 10:00 | | 05:00 | 02:09 | 29:00 | 01:34:12 |
| 200121-P22 | 03:07 | 02:00 | 02:25 | 06:40 | 25:00 | 02:08 | 10:00 | 01:31 | 10:00 | | 05:00 | 01:38 | 42:37 | 01:52:06 |
| 200129-P23 | 02:54 | | 02:06 | 04:45 | 25:00 | 01:46 | 10:00 | 01:14 | 10:00 | 00:27 | 05:00 | 01:07 | 33:38 | 01:37:57 |
| 200204-P24 | 01:45 | 01:37 | 02:29 | 05:19 | 25:00 | 01:47 | 10:00 | 01:10 | 10:00 | 00:28 | 05:00 | 01:10 | 18:13 | 01:23:58 |
| 200224-P25 | 02:22 | 01:14 | 01:43 | 05:49 | 25:00 | 02:04 | 10:00 | 01:32 | 10:00 | 00:39 | 05:00 | 01:10 | 19:10 | 01:25:43 |
| 200804-P26 | 02:00 | 01:12 | 02:30 | 05:33 | 25:00 | 01:56 | 10:00 | 01:02 | 10:00 | 00:40 | 05:00 | 01:46 | 20:22 | 01:27:01 |
| 200819-P27 | 01:57 | | 02:08 | 04:59 | 25:00 | 02:15 | 10:00 | 01:44 | 10:00 | 00:59 | 05:00 | 01:42 | 18:24 | 01:24:08 |
| 200824-P28 | 02:07 | 01:12 | 02:03 | 05:43 | 25:00 | 01:43 | 10:00 | 01:25 | 10:00 | 01:21 | 05:00 | 01:02 | 19:22 | 01:25:58 |
| 200831-P30 | 02:20 | | 02:12 | 05:27 | 25:00 | 01:54 | 10:00 | 01:24 | 10:00 | 00:56 | 05:00 | 01:04 | 17:10 | 01:22:27 |
| 200831-P31 | | | | 05:48 | 25:00 | 01:35 | 10:00 | 01:36 | 10:00 | 00:57 | 05:00 | 01:02 | 13:59 | 01:14:57 |
| 200923-P32 | 02:06 | 01:20 | 02:35 | 05:42 | 25:00 | 01:45 | 10:00 | 01:15 | 10:00 | 00:49 | 05:00 | 01:04 | 39:46 | 01:46:22 |
| 201027-P33 | 02:18 | | 02:06 | 05:37 | 25:00 | 01:52 | 10:00 | 01:25 | 10:00 | 00:59 | 05:00 | 01:24 | 20:20 | 01:26:01 |
| 201029-P34 | 01:54 | 01:45 | 02:23 | 04:58 | 25:00 | 02:04 | 10:00 | 01:34 | 10:00 | 01:04 | 05:00 | 01:09 | 24:07 | 01:30:58 |
| Mittelwert | 02:16 | 01:39 | 02:15 | 05:22 | 25:00 | 01:53 | 10:00 | 01:27 | 10:00 | 00:50 | 05:00 | 01:18 | 25:10 | 01:30:36 |
| SD | | | | | | | | | | | | | | 00:10:54 |

Zweistichproben T-Tests

Unterschied der gemessenen Aktivierungen durch verschiedene Konzentrationen von Api m 1 und HBV (284 ng/ml)

| | HBV 1000 ng/ml | | | HBV 200 ng/ml | |
|---|----------------|------------|---|---------------|------------|
| Mittelwert | 32,304 | 35,283 | Mittelwert | 32,304 | 36,814 |
| Varianz | 841,35476 | 395,247757 | Varianz | 841,35476 | 613,064827 |
| Beobachtungen | 10 | 10 | Beobachtungen | 10 | 10 |
| Pearson Korrelation | 0,56612618 | | Pearson Korrelation | 0,7188094 | |
| Hypothetische Differenz der Mittelwerte | 0 | | Hypothetische Differenz der Mittelwerte | 0 | |
| Freiheitsgrade (df) | 9 | | Freiheitsgrade (df) | 9 | |
| t-Statistik | -0,39 | | t-Statistik | -0,69 | |
| P(T<=t) einseitig | 0,35 | | P(T<=t) einseitig | 0,25 | |
| Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test | 1,83 | | Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test | 1,83 | |
| P(T<=t) zweiseitig | 0,70565581 | | P(T<=t) zweiseitig | 0,50500999 | |
| Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test | 2,26215716 | | Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test | 2,26215716 | |
| | | | | | |
| | HBV 40 ng/ml | | | HBV 8 ng/ml | |
| Mittelwert | 32,304 | 35,301 | Mittelwert | 32,304 | 32,005 |
| Varianz | 841,35476 | 797,363388 | Varianz | 841,35476 | 903,047294 |
| Beobachtungen | 10 | 10 | Beobachtungen | 10 | 10 |
| Pearson Korrelation | 0,73760406 | | Pearson Korrelation | 0,89557285 | |
| Hypothetische Differenz der Mittelwerte | 0 | | Hypothetische Differenz der Mittelwerte | 0 | |
| Freiheitsgrade (df) | 9 | | Freiheitsgrade (df) | 9 | |
| t-Statistik | -0,46 | | t-Statistik | 0,07 | |
| P(T<=t) einseitig | 0,33 | | P(T<=t) einseitig | 0,47 | |
| Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test | 1,83 | | Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test | 1,83 | |
| P(T<=t) zweiseitig | 0,65863248 | | P(T<=t) zweiseitig | 0,9458264 | |
| Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test | 2,26215716 | | Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test | 2,26215716 | |
| | | | | | |
| | HBV 1,6 ng/ml | | | | |
| Mittelwert | 32,304 | 20,498 | | | |
| Varianz | 841,35476 | 704,694551 | | | |
| Beobachtungen | 10 | 10 | | | |
| Pearson Korrelation | 0,88988798 | | | | |
| Hypothetische Differenz der Mittelwerte | 0 | | | | |
| Freiheitsgrade (df) | 9 | | | | |
| t-Statistik | 2,82 | | | | |
| P(T<=t) einseitig | 0,01 | | | | |
| Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test | 1,83 | | | | |
| P(T<=t) zweiseitig | 0,02014033 | | | | |
| Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test | 2,26215716 | | | | |

– Anhang –

Unterschied gemessener Aktivierungen mithilfe von CD203c gegenüber CD63 mit CD203c

| | Q2: CD63+, CD203c+ | CD203c+ |
|---|--------------------|------------|
| Mittelwert | 26,56463158 | 61,6106316 |
| Varianz | 918,7917251 | 580,900446 |
| Beobachtungen | 95 | 95 |
| Pearson Korrelation | 0,774476134 | |
| Hypothetische Differenz der Mittelwerte | 0 | |
| Freiheitsgrade (df) | 94 | |
| t-Statistik | -17,80446256 | |
| P(T<=t) einseitig | 3,58715E-32 | |
| Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test | 1,661225855 | |
| P(T<=t) zweiseitig | 7,1743E-32 | |
| Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test | 1,985523442 | |

Unterschied gemessener Aktivierungen durch Anti-FcεRI mAK und Anti-IgE

| | Anti-FcεRI mAK | Anti-IgE |
|---|----------------|------------|
| Mittelwert | 78,063 | 53,56 |
| Varianz | 307,6184233 | 897,993778 |
| Beobachtungen | 10 | 10 |
| Pearson Korrelation | 0,859389145 | |
| Hypothetische Differenz der Mittelwerte | 0 | |
| Freiheitsgrade (df) | 9 | |
| t-Statistik | 4,45694495 | |
| P(T<=t) einseitig | 0,000792113 | |
| Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test | 1,833112933 | |
| P(T<=t) zweiseitig | 0,001584227 | |
| Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test | 2,262157163 | |

11 Lebenslauf

| | |
|---------------------------|---|
| Persönliche Daten | Sebastian Waldherr geb. 01.09.1995, Erding |
| Schulbildung | 2002-2006 Grundschule, Finsing 2006-2014 Franz-Marc-Gymnasium, Markt Schwaben |
| Hochschulbildung | 2015-2017 Ludwig-Maximilians-Universität München 2017-2022 Technische Universität München 2018 Universidad de Zaragoza, Spanien (Erasmus) |
| Praktisches Jahr | Klinikum rechts der Isar (Urologie), München Klinik Bogenhausen (Innere) Universitätsklinikum Augsburg (Chirurgie) |
| Hochschulabschluss | 12/2022 Dritte Ärztliche Prüfung |

12 Danksagung

Mein tiefster Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Bernadette Eberlein für das entgegengebrachte Vertrauen und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit sowie ihre allseits konstruktive Hilfe, Motivation und Unterstützung. Nicht zuletzt danke ich ihr auch für die Unterstützung meiner Teilnahme am FAAM EuroBAT Digital 2020.

Ich möchte Herrn Dr. rer. nat. Martin Köberle für die Bereitschaft danken, diese Arbeit als Mentor zu begleiten. Danke an Herrn Prof. Dr. med. Tilo Biedermann für die Möglichkeit, meine Promotion an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie absolvieren zu können.

Des Weiteren spreche ich Herrn PD Dr. rer. nat. Simon Blank und Johannes Grosch vom Helmholtz Zentrum München meinen aufrichtigen Dank aus für die stets gute Zusammenarbeit, ihr entgegengebrachtes Vertrauen im Umgang mit den von ihnen bereitgestellten Allergenen und ihre Hilfe bei jeglichen Rückfragen.

Herzlichen Dank an Frau Franziska Martin für Ihre Geduld und ihr immer offenes Ohr, als sie mich in die Technik des BATs einführte, sowie ihre andauernde Unterstützung auch an den Tagen, als mal nichts zu funktionieren schien. Außerdem danke ich Frau Martina Hils für ihre unabdingbare Hilfe im Umgang mit dem FACSCanto und in der Etablierung des Dura Clone IF Basophil Activation®. Daneben bedanke ich mich beim gesamten Team des Allergie- und des Forschungslabors dafür, dass ich Räume und Gerätschaften benutzen konnte.

Mein größter Dank gebührt allen Patient:innen, deren Bereitschaft zur Teilnahme diese Studie und Promotion erst ermöglicht haben. Ebenso danke ich dem gesamten Personal der Allergieambulanz, die mich stets tatkräftig in der Rekrutierung von Patient:innen unterstützten.

Vielen Dank an Frau Birgit Waschulzik und dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie für ihren Beistand in allen statistischen Fragestellungen und der Bereitstellung von Fachliteratur. Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Sandra Hartung für ihre Hilfe in allen graphischen Anliegen und bei Lukas Letsch, dessen Blick fürs Detail kaum ein Tippfehler entgangen sein dürfte.

Zuletzt danke ich Bianca Kain und Maximilian Pritz von tiefstem Herzen für ihre unermüdliche Geduld, ihr offenes Ohr und den stetigen Antrieb, mit dem sie mich zu jeder Zeit motivieren und auch in schwierigen Momenten wieder aufbauen konnten. Danke für alles.