

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
am Biederstein
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

In-vitro-Verfahren zur Aktivierung basophiler Granulozyten unter Verwendung des Oberflächenmarkers CD63 bei Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie

Christine Schmidt-Leidescher

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. B. Eberlein
2. Univ.-Prof. Dr. M. W. Ollert

Die Dissertation wurde am 19.06.2007 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2007
angenommen

Betreuung der Arbeit:
Prof. Dr. Bernadette Eberlein

Für Thomas und Susi

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert bzw. auf nationalen Kongressen vorgestellt:

Eberlein-König B., Schmidt-Leidescher C., Rakoski J., Behrendt H., Ring J.:
In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy.
J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 16 (2006) 5-10

Eberlein-König B., Schmidt-Leidescher C., Behrendt H., Ring J.:
Letter to the editor: Predicting side-effects in venom immunotherapy by basophil activation?
Allergy 61 (2006) 897

Eberlein-König B., Schmidt-Leidescher C., Rakoski J., Behrendt H., Ring J.:
Der Basophilen-Aktivierungstest (BASOTEST®) mit Bienen- und Wespengift bei Patienten mit Insektengiftallergie.
Poster auf dem 15. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, 14. – 15.3.2003
Allergo J. 12 (2003) 58

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Auslöser der Insektengiftallergie	3
1.1.1	Insekten	3
1.1.2	Zusammensetzung der Insektengifte	5
1.1.3	Kreuzreaktivität	7
1.2	Pathologie der Insektengiftreaktion	8
1.2.1	Symptome der systemischen anaphylaktischen Reaktion	8
1.2.2	Pathomechanismus der IgE-vermittelten allergischen Reaktion vom Soforttyp (Typ I)	9
1.3	Diagnose und Therapie der Insektengiftallergie	10
1.3.1	Indikationsstellung zur spezifischen Immuntherapie	10
1.3.2	Spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung)	11
1.3.2.1	Durchführung	12
1.3.2.2	Therapiedauer und Kontrolle des Therapieerfolges	13
1.3.2.3	Kontraindikationen	13
1.4	Der Basophilenaktivierungstest (BAT)	14
1.4.1	Grundlagen	14
1.4.2	Durchflusszytometrische Messung	15
1.4.2.1	Durchführung	15
1.4.2.2	Möglichkeiten der Methode	15
1.5	Fragestellung der Arbeit	16
2	Material und Methode	17
2.1	Patienten und Kontrollpersonen	17
2.2	Geräte und Reagenzien	18
2.3	Basophilenaktivierungstest (BAT, Basotest®)	19
2.3.1	Allergene	19
2.3.2	Prinzip	20
2.3.3	Material und Reagenzien	20

VI Inhaltsverzeichnis

2.3.4	Durchführung des Basophilenaktivierungstestes	21
2.3.4.1	Vorbereitungen	21
2.3.4.2	Versuchsablauf	23
2.3.5	Probenanalyse im Durchflusszytometer	24
2.3.6	Einflussparameter	27
2.3.7	Normalwerte	28
2.3.8	Grenzen der Methode	28
2.4	Berechnung der 0,1/1-Ratio	29
3	Ergebnisse	
3.1	Patienten mit Bienengiftallergie	30
3.1.1	Klinische Charakterisierung	30
3.1.2	Basophilenaktivierungstest	31
3.1.2.1	Ergebnisse der Testung mit Bienengift	31
3.1.2.2	Ergebnisse der Testung mit Wespengift	33
3.2	Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie	36
3.2.1	Klinische Charakterisierung	36
3.2.2	Basophilenaktivierungstest	36
3.2.2.1	Ergebnisse der Testung mit Bienengift	37
3.2.2.2	Ergebnisse der Testung mit Wespengift	38
3.3	Patienten mit Wespengiftallergie	41
3.3.1	Klinische Charakterisierung	41
3.3.2	Basophilenaktivierungstest	41
3.3.2.1	Ergebnisse der Testung mit Bienengift	43
3.3.2.2	Ergebnisse der Testung mit Wespengift	44
3.4	Kontrollpersonen ohne Bienen- oder Wespengiftallergie	47
3.5	Berechnung der 0,1/1-Ratio	48
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	63
6	Literatur	66
7	Anhang	83
	Danksagung	91
	Lebenslauf	93

1 Einleitung

Epidemiologische Studien der letzten Jahre zeigen, dass 57 bis 94% der Bevölkerung ein- oder mehrmals von einer Biene oder Wespe gestochen werden [25, 42, 58, 85, 125]. Ein nicht geringer Teil (0,8 bis 5%) ist dabei von systemischen Überempfindlichkeitsreaktionen unterschiedlichen Schweregrades auf diese Insektenstiche betroffen. Bei bis zu 19% zeigen sich gesteigerte örtliche Reaktionen [26, 48, 58, 85, 125].

Tab. 1.1 Klassifikation pathogener Immunreaktionen (erweitert nach Coombs und Gell [108])

Typ	Pathogenese	Klinische Beispiele
I	IgE	Anaphylaxie Allergische Rhinitis Allergisches Asthma bronchiale Allergische Konjunktivitis Allergische Urtikaria Allergische Gastroenteritis (atopisches Ekzem?)
II	Zytotoxisch	Hämolytische Anämie Agranulozytose Thrombozytopenische Purpura
III	Immunkomplexe	Serumkrankheit Immunkomplex Anaphylaxie Vaskulitis Alveolitis Nephritis Arthritis
IV	Zellulär	Kontaktekzem (IVa) Atopisches Ekzem (IVb) Arzneimittlexanthem (IVc) (Purpura pigmentosa) (Id-Reaktionen)
V	Granulomatöse Reaktion	Injektionsgranulome
VI	„stimulierende“ („neutralisierende“) Überempfindlichkeit	Autoimmunthyreoiditis Myasthenia gravis Reverse Anaphylaxie Insulinresistenz Chronische Urtikaria (Unterform mit Autoantikörpern gegen FcεRI)

Dabei liegt fast allen systemischen Reaktionen ein IgE-vermittelter Mechanismus zugrunde, bei dem es klinisch zum Auftreten von Symptomen der Soforttypallergie kommt (Typ I-Reaktion nach Coombs und Gell; Tab. 1.1), die als anaphylaktische Reaktionen bezeichnet werden und in unterschiedlich starker Ausprägung auftreten können (Tab. 1.2).

Tab. 1.2 Klassifizierung systemischer anaphylaktischer Reaktionen nach Schweregrad

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

Es treten nicht alle genannten Symptome obligat auf; die Gradeinteilung erfolgt nach dem jeweils schwersten Symptom [108, 112]

Aufgrund dieser möglicherweise lebensbedrohlichen Auswirkungen von Insektenstichen bei allergischen Patienten müssen entsprechende Maßnahmen zu deren Schutz ergriffen werden. Neben der Karenz (dem Meiden von Risikofaktoren bei Insektengiftallergie, Tab. 1.3) und der medikamentösen Therapie kommt der allergenspezifischen Immuntherapie, der Hyposensibilisierung, eine große Bedeutung zu.

Tab. 1.3 Risikofaktoren bei Insektengiftallergie (nach DGAI-Richtlinien)
[108, 116]

<p>Risikofaktoren der Exposition</p> <p>Berufe mit erhöhter Exposition gegenüber Hautflüglern (Obst- und Bäckereiverkäufer, Feuerwehrleute, Waldarbeiter, Landwirte, Gärtner, Getränkeausfahrer, Müllabfuhr)</p> <p>Intensiv betriebene Freizeitaktivitäten wie Gartenarbeit, Schwimmen, Tennis, Radfahren, Golf</p> <p>Bienenzucht durch den Patienten selbst, in der Familie oder in der Nachbarschaft</p> <p>Motorradfahren</p>
<p>Risikofaktoren durch Grunderkrankungen</p> <p>Begleiterkrankungen (v. a. kardiovaskuläre Erkrankungen, Asthma, Mastozytose)</p> <p>Höheres Lebensalter</p> <p>Körperliche oder psychische Belastungssituationen</p> <p>Medikation mit β-Blockern oder ACE-Hemmern (evtl. auch NSAID)</p> <p>Schwere Allgemeinreaktionen nach Insektenstich (\geq Schweregrad III) in der Vorgeschichte</p>

DGAI: Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie

1.1 Auslöser der Insektengiftallergie

1.1.1 Insekten

Im mitteleuropäischen Raum wird die überwiegende Mehrzahl dieser systemischen Reaktionen durch Stiche der Honigbiene (*Apis mellifera*, im Folgenden als Biene bezeichnet) oder verschiedener Faltenwespen (*Vespula germanica*, *Vespula vulgaris*, im Folgenden als Wespe bezeichnet) hervorgerufen. Selten kommen andere Hymenopteren wie Hornissen (*Vespa crabro*), Hummeln (*Bombus* spp.), Feldwespen (*Polistes*) und andere Wespen (*Dolichovespula* spp.) als Auslöser für systemische Stichreaktionen in Betracht [94, 106] (Systematik s. Abb. 1.1). Grundsätzlich können auch andere Insekten solche Reaktionen hervorrufen (z. B. Ameisen: *Formicidae*, Mücken: *Diptera*, Bremsen); sie sind aber, was die Häufigkeit der Ereignisse betrifft, im mitteleuropäischen Raum nur von geringer Bedeutung.

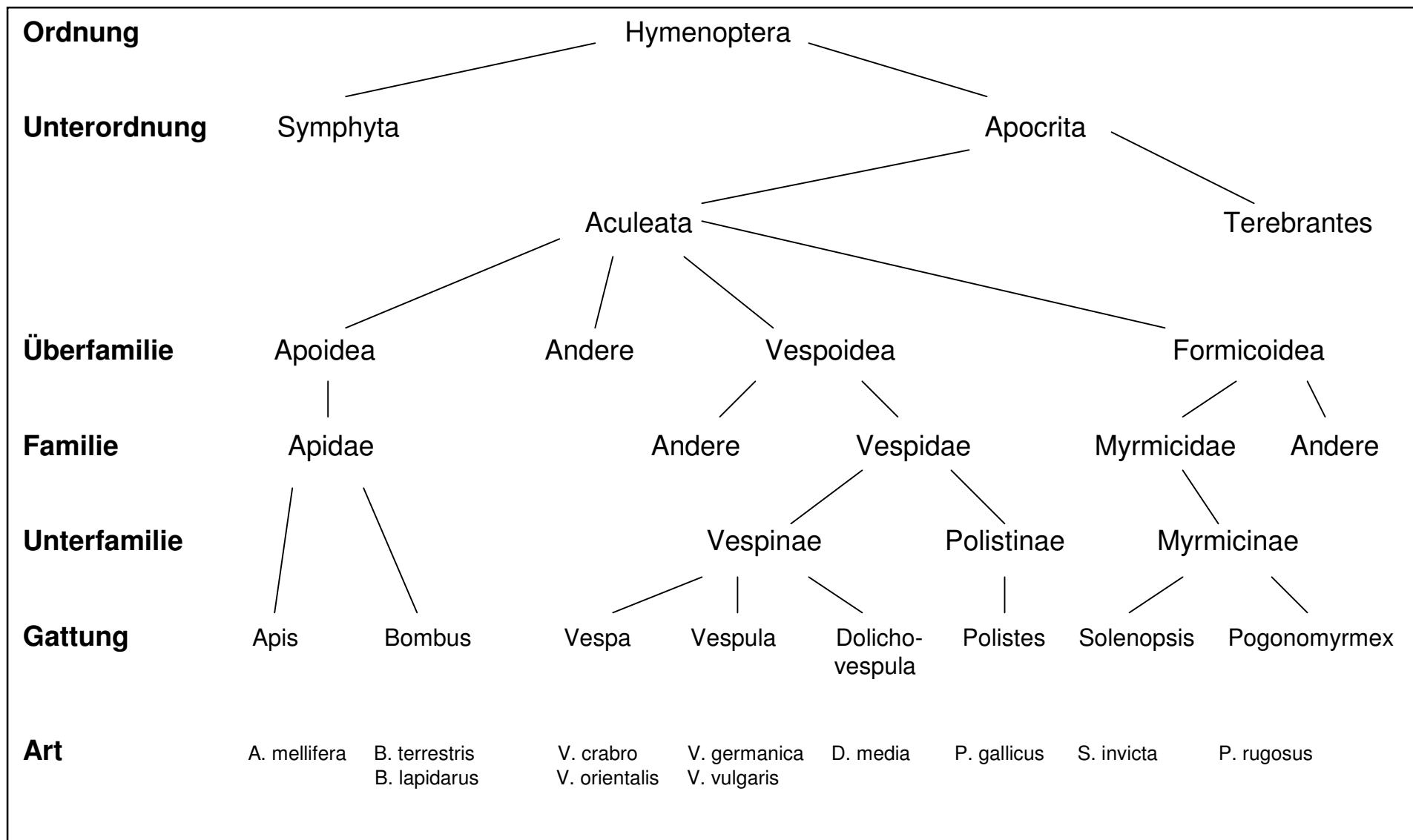


Abb. 1.1 Übersicht über die Systematik der für die Insektengiftallergie wichtigsten Hautflügler (Hymenopteren) [24, 108]

Oft sind Gattung und Art des allergieauslösenden Insektes nicht eindeutig zu ermitteln, da Patienten nicht immer zwischen Bienen und Wespen unterscheiden können. Anamnestische Angaben der betroffenen Personen über Jahreszeit, Aggressivität des Insektes oder Verbleib des Stachels können aber bei der Identifizierung hilfreich sein.

1.1.2 Zusammensetzung der Insektengifte

Die Hymenopterengifte bilden ein komplexes Gemisch aus biogenen Aminen, Proteinen und Peptiden. Die Zusammensetzung von Bienen- und Wespengift ist in Tab. 1.4 und 1.5 wiedergegeben [7, 49, 75, 85]. Da man Bienengift durch Elektrostimulation der Insekten in relativ reiner Form und in hinreichend großen Mengen gewinnen kann, ist seine Zusammensetzung gut erforscht [75].

Tab. 1.4 Inhaltsstoffe von Wespengift [7, 48, 85]

Inhaltsstoffe	Molekulargewicht [Da]	Anteil am Trockengewicht [%]	Besonderheiten
Proteine			
Phospholipasen	35 000	6-14	
Hyaluronidase	45 000	1-3	
Saure Phosphatase	?	?	
Proteasen	?	?	
Antigen 5	25 000	5-10	
Peptide	1 000-6 000		
Kinine	1 000-3 000		Kommt nur bei der Hornisse vor
Chemotaktisches Peptid	1 500		
Hämolyisin	6 000		
Niedermolekulare Substanzen (Mediatoren)	Bis zu 1 000		
Histamin	111	3-6	Kommt nur bei der Hornisse vor
Serotonin	176	1	
Katecholamine	150-200	1	
Acetylcholin	182	1	

Tab. 1.5 Inhaltsstoffe von Bienengift [7, 48, 65, 75]

Inhaltsstoffe	Molekulargewicht [Da]	Anteil am Trockengewicht [%]	Biologische Wirkung
Proteine		15-17	
Phospholipase A2	15 800	6-12	Schädigung der Zellmembran
Hyaluronidase	45 000	1-2	Hydrolyse der Mukopolysaccharide
Saure Phosphatase (Allergen B)	49 000	<1	Hydrolyse der Phosphorsäureester
Lysophospholipase	22 000	<1	Hydrolyse der Lyso-phosphoglyceride
Adolapin	11 092	<1	Störung des Arachidonsäure-stoffwechsels
Allergen C	105 000	<1	?
Andere	bis zu 102 000	≤1	
Peptide		48-70	
Melittin	2 840	40-60	Zerstörung der Lipidmembranen
Apamin	2 038	3	Gleichgewicht des Zellkaliums
Mastzell-degranulierendes Peptid (MCDP)	2 593	2	Stoffwechsel des Zellkalziums und Degranulation
Secapin	2 600	0,5	?
Tertiapin	1 000	0,1	?
Andere	2 bis zu 5 000	≤1	
Niedermolekulare Substanzen		3-10	
Histamin	111	1	Vasodilatation
Noradrenalin	169	1	Einfluss auf adrenerge Nerven
Dopamin	153	1	Nervenerregung
Lipide	bis zu 500	5	?
Kohlenhydrate	bis zu 180	2	?
Aminosäuren	bis zu 200	1	?

Dagegen ist die Charakterisierung von Wespengift aufgrund technischer Probleme bei der Gewinnung (höhere Aggressivität der Insekten und geringere Ausbeute) mit Schwierigkeiten verbunden [84].

Biogene Amine, wie z. B. Histamin, Dopamin und Noradrenalin, steigern die Gefäßpermeabilität, führen zur Vasodilatation und sind damit für die lokale Schmerzreaktion und das lokale Ödem, die nach einem Sticheignis auftreten, verantwortlich. Die Hyaluronsäure begünstigt durch ihre hydrolytische Aktivität die Ausbreitung des Giftes im Gewebe. Peptide, wie Melittin und Apamin, und Phospholipasen sind dagegen eher an hämolytischen, zytotoxischen und neurotoxischen Reaktionen beteiligt. Melittin, das mit ca. 50% den größten Anteil am Bienengift darstellt, zerstört aufgrund seiner molekularen Eigenschaften die Lipidschicht der Zellmembran, hat aber nur geringe allergische Potenz: lediglich ca. 3% der Bienengiftallergiker sind gegen Melittin sensibilisiert [75]. Wegen ihres hohen Molekulargewichtes wirken vor allem die Proteine der Hymenopterenengifte als Allergene. Das Hauptallergen des Bienengiftes bildet die Phospholipase A2, als weitere Allergene wirken Hyaluronidase und saure Phosphatase [75]; bei den Vespidengiften bilden Phospholipase A1 und B, Hyaluronidase und Antigen 5 die Hauptallergene [84]. Hornissengift enthält spezifische Kinine und Acetylcholin.

1.1.3 Kreuzreaktivität

Verschiedene allergische Personen reagieren auf mehr als ein Hymenopterenengift mit systemischen Symptomen. Dabei variiert der Grad der immunologischen Kreuzreaktivität zwischen den Hymenopterenengiften mit der phylogenetischen und systematischen Verwandtschaft der Insekten (Abb. 1.2).

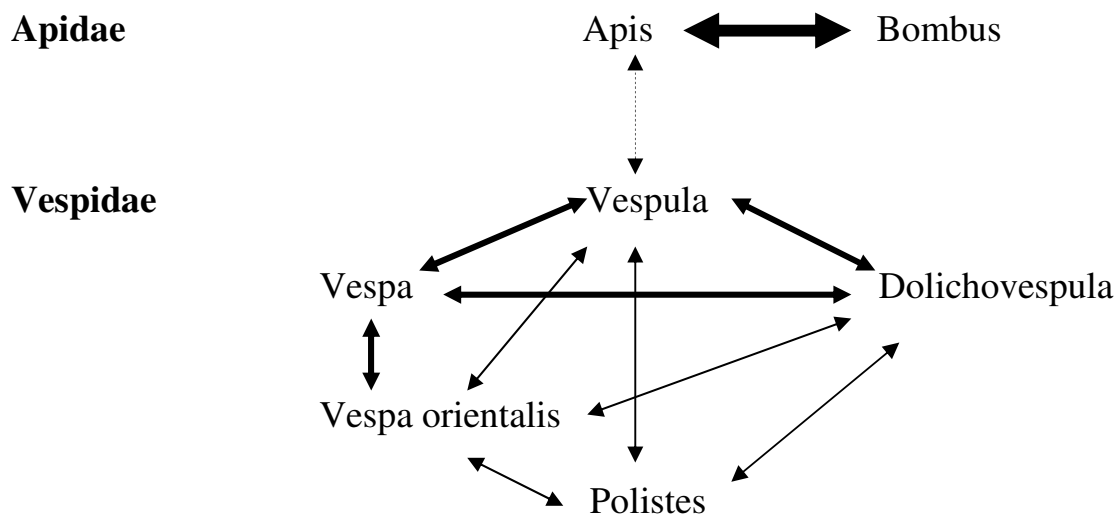


Abb. 1.2 Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Hymenopterenengiften [20]

➡➡➡ Sehr stark, ➡ stark, → schwach, - - - -> sehr schwach

So besteht zwischen den Giften der Vespiden weitgehende Kreuzreaktivität [64, 89, 93, 128, 129], während eine Kreuzreaktivität zwischen Bienen- und Vespidengiften deutlich seltener beobachtet wird [106, 107, 145]. Den Nachweis einer Kreuzreaktivität kann man mit einem RAST-Inhibitionstest führen.

1.2 Pathologie der Insektengiftreaktion

1.2.1 Symptome der systemischen anaphylaktischen Reaktion

Eine schmerzhaft, juckende und brennende Lokalreaktion infolge eines Hymenopterenstiches ist normal, da diese Gifte sowohl toxische, als auch allergisierende Substanzen enthalten. Unter ungünstigen Umständen, z. B. bei einer sehr hohen Zahl an Stichen oder bei ungünstiger Lokalisation (z. B. Mund- oder Rachenschleimhaut) kann es auch bei einem nicht allergischen Patienten auf Grund von systemischen toxischen Reaktionen zur lebensbedrohlichen Situation kommen [110]. Dabei stehen Hämolyse, Rhabdomyolyse, zentralnervöse Störungen, Niereninsuffizienz und Leberparenchymschäden im Vordergrund. Solche Ereignisse sind aber selten und lassen sich anhand der Anamnese eindeutig identifizieren.

Die häufigste und gravierendste Form der Überempfindlichkeitsreaktion auf Bienen- und Wespenstiche ist jedoch die systemische, IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktion. Typisch für eine Reaktion vom Soforttyp (Typ I) ist dabei das schnelle Auftreten der Symptome innerhalb von wenigen Minuten nach Kontakt mit dem entsprechenden Antigen. Dabei ist bei einem Allergiker bereits der Stich eines einzigen Insektes ausreichend, um Reaktionen auszulösen, die bis zum anaphylaktischen Schock reichen können (Tab. 1.2).

Die Symptome erstrecken sich dabei von leichten Hautreaktionen (Juckreiz, Hautrötung, Urticaria, Angioödem) über respiratorische (Atemnot, Bronchospasmus, Beklemmungsgefühl, Hustenreiz, Stridor), kardiovaskuläre (Blutdruckabfall, Herzrhythmusstörungen) und gastrointestinale Symptome (Übelkeit, Erbrechen, Defäkation) bis zum Schockzustand mit Kreislaufversagen, Zyanose und Bewusstlosigkeit, der ohne medizinische Versorgung zum Tode führen kann.

Auch treten oft zusätzliche Symptome auf, wie z. B. Sehstörungen, Hyperventilation, Benommenheit, Schwindel, Hitzewallungen und Harnabgang, die ebenfalls auf eine allergische Reaktion hinweisen [23, 41]. Viele Patienten geben darüber hinaus subjektive Beschwerden an, wie Parästhesien oder Kopfschmerzen, die aufgrund des gehäufteten Auftretens ebenfalls für eine allergische Reaktion sprechen [84].

Zu beachten ist dabei, dass Symptome, die schnell abklingen, nach einigen Stunden erneut auftreten können. In der Regel sind sie aber nur vorübergehend, dauern nicht lange an und verschwinden meist, ohne Folgeschäden zu hinterlassen. Nur in seltenen Fällen wird von ernsthaften Schädigungen, wie Myokardinfarkt, schweren zentralnervösen Störungen oder Abort bei Schwangeren, berichtet [96].

1.2.2 Pathomechanismus der IgE-vermittelten allergischen Reaktion vom Soforttyp (Typ I)

Die Immunantwort gegen Allergene scheint von mehreren Faktoren, einschließlich genetischen, entwicklungsbedingten und Umweltfaktoren, abzuhängen [57, 55].

Die Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I-Reaktion nach Coombs und Gell) [60, 68, 114] (Tab. 1.1) ist charakterisiert durch sofortige allergische Reaktion unmittelbar nach Kontakt mit harmlosen Fremdstoffen (Allergene oder Antigene). Die allergischen Reaktionen werden durch Antikörper der Immunglobulin E (IgE-)Klasse [59] vermittelt, die eine hohe Affinität zu Zellrezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten besitzen.

Bei Kontakt mit einem Antigen bilden B-Zellen unter Mitwirkung von T-Lymphozyten spezifische IgE-Antikörper. IgE ist ein Immunglobulin mit dem Molekulargewicht 190 000, das sich vom IgG durch eine zusätzliche Domäne im Fc-Anteil des Moleküls unterscheidet. Über diese Domäne binden die IgE-Antikörper an hochaffine FcεRI-Zellrezeptoren in der Membran von Gewebemastzellen und basophilen Granulozyten [63, 101, 126, 144]. Eine menschliche Mastzelle besitzt etwa 10^4 bis 10^6 dieser IgE-Rezeptoren [63].

Erneuter Kontakt mit dem gleichen Antigen führt zur Brückenbildung zwischen aktivierten Zellen: Benachbarte Antikörper auf der Oberfläche von sensibilisierten Zellen werden durch Antigenmoleküle quervernetzt. Diese Vernetzung von IgE-Molekülen auf der Zelloberfläche von Mastzellen und Basophilen führt über verschiedene Energie- und Kalzium-abhängige Schritte sowie Phosphorylierungsreaktionen zur Aktivierung der Zellen und Ausschüttung verschiedener gespeicherter Mediatorsubstanzen, die in sekretorischen Granula enthalten sind, wie z. B. Histamin, Heparin, neutrale Proteinase, saure Hydrolasen und chemotaktische Faktoren [46]. Sekundäre Mediatoren (Leukotriene, Prostaglandine und Zytokine), die ebenfalls als Folge der Zellaktivierung gebildet werden, sind für das muköse und kutane Ödem, die vermehrte Gefäßpermeabilität, die Kontraktion der glatten Muskulatur und das Anlocken von Entzündungszellen verantwortlich.

Neben der systemischen Anaphylaxie sind allergische Rhinitis, Heuschnupfen, Asthma bronchiale und Urticaria weitere typische allergische Erkrankungen vom Soforttyp.

In der Regel setzen systemische allergische Reaktionen nach wenigen Minuten bis innerhalb einer halben Stunde ein. Manchmal treten die Symptome aber auch mit zeitlicher Verzögerung auf, wobei vermutlich die Immunkomplex-Reaktion vom Typ III oder die IgE-vermittelte verzögerte Reaktion eine Rolle spielen [84, 105].

1.3 Diagnose und Therapie der Insektengiftallergie

1.3.1 Indikationsstellung zur spezifischen Immuntherapie

Anaphylaktische Reaktionen auf Hymenopterenstiche können potentiell lebensgefährlich sein. So werden in Deutschland etwa 15 bis 40 Todesfälle pro Jahr auf eine Hymenoptereingiftallergie zurückgeführt [26]. Wahrscheinlich liegt die Häufigkeit der Hymenoptereingiftallergie mit tödlichem Ausgang deutlich höher, da besonders bei Todesfällen aus ungeklärter Ursache eine Insektengiftanaphylaxie in Betracht gezogen werden muss. Überdurchschnittlich häufig konnten in diesen Fällen post mortem Hymenoptereingift-spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden [25, 132].

Aufgrund dieser möglicherweise lebensbedrohlichen Auswirkungen von Insektenstichen bei allergischen Patienten müssen entsprechende Maßnahmen zu deren Schutz ergriffen werden. Neben der Karenz und der medikamentösen Therapie kommt der allergenspezifischen Immuntherapie, der Hyposensibilisierung, eine große Bedeutung zu.

Die Diagnose einer Insektengiftallergie und die Indikation zur Hyposensibilisierung basieren auf Anamnese, Hauttest und der Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper [29, 45, 147]. Eine Indikation zur Hyposensibilisierung besteht grundsätzlich, wenn anamnestisch eine systemische Reaktion vom Soforttyp auf ein Stichereignis nachgewiesen ist und die IgE-vermittelte Allergie mittels Hauttests und der Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper im Serum (CAP-FEIA-System) verifiziert ist. Diese Bestimmung der Insektengift-spezifischen IgE-Antikörper im Serum sollte frühestens 2 Wochen nach dem letzten Stichereignis erfolgen [78, 99, 111]. Dieser zeitliche Abstand ist nötig, da die spezifischen IgE-Antikörper direkt nach einem Stichereignis zunächst abfallen können, im Laufe der folgenden Wochen aber auf Grund der Allergenexposition deutlich ansteigen [74]. Außerdem kann dieser IgE-Anstieg einen wichtigen Hinweis auf das ursächliche Insekt geben, das oftmals von den Patienten nicht eindeutig angegeben werden kann [47].

In manchen Fällen, wenn z. B. RAST und/oder Hauttest trotz eindeutiger Anamnese negativ ausfallen, können zusätzliche zelluläre In-vitro-Tests als Entscheidungshilfe sinnvoll sein. Dies kann möglicherweise der Fall sein, wenn das allergische Ereignis längere Zeit zurückliegt. So können mit der Methode der In-vitro-Histaminfreisetzung (BHR), dem Cellular Antigen Stimulation Test (CAST®) oder dem Basophilenaktivierungstest (BAT), der Gegenstand dieser Arbeit ist, wesentliche Zusatzinformationen gewonnen werden [13, 14, 30, 39]. Obwohl ca. 80% der Patienten mit schweren Lokalreaktionen im Hauttest eine positive Reaktion zeigen und allergenspezifische IgE-Antikörper im RAST aufweisen [79], beträgt das Risiko, bei einem erneuten Stich mit einer systemischen Reaktion zu antworten, lediglich etwa 5%. Aus diesem Grund stellen lokale Reaktionen auf Hymenopterenstiche ebenfalls keine Indikation für eine Hyposensibilisierung dar. In diesen Fällen wird pathogenetisch sowohl eine IgE-vermittelte Spätreaktion als auch eine zelluläre Immunantwort diskutiert [143]. Nicht wenige Patienten reagieren in Hauttest und RAST auf Bienen- und Wespengift positiv. Ist in der Anamnese eine systemische Reaktion nachgewiesen, aber nicht bekannt, um welches Insekt es sich beim allergieauslösenden Stich gehandelt hat, können In-vitro-Tests wie der Basophilenaktivierungstest möglicherweise zur Klärung beitragen. Sprechen die Testergebnisse nicht eindeutig für ein bestimmtes Insekt, so müssen die Patienten mit beiden Giftextrakten hyposensibilisiert werden.

Bei etwa 25% der Gesamtbevölkerung kann man eine Sensibilisierung gegenüber Hymenopterengift durch die Bestimmung des spezifischen IgE im Serum und/oder entsprechende Hauttests nachweisen, ohne dass klinisch gravierende allergische Symptome auftreten [26, 48, 84, 125]. Eine Indikation zur weiteren Diagnostik und zur Therapie ist in diesen Fällen nicht gegeben und nur dann indiziert, wenn ein offensichtlicher zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von systemischen Reaktionen und einem vorausgegangenem Insektenstichereignis besteht.

1.3.2 Spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung)

Da mit der Hymenopterengiftallergie ein potentiell lebensbedrohliches Risiko verbunden ist und eine sichere Allergenmeidung praktisch kaum möglich ist, kommt der spezifischen Immuntherapie, der Hymenopterengift-Hyposensibilisierung, eine große Bedeutung zu. Dabei werden unter stationären Bedingungen wiederholt zunehmende Mengen des allergieauslösenden Giftes subkutan injiziert, bis die sogenannte Erhaltungsdosis erreicht ist, die im Falle eines erneuten Stiches Symptombefreiheit garantieren soll [16, 18].

Dafür gibt es unterschiedliche Dosierungsschemata [9, 11, 108], nach denen die Dosis bis zur Erhaltungsdosis von 100 µg/4 Wochen gesteigert wird (Tab. 1.6).

Tab. 1.6 Dosierungsschema für die Schnell-Hyposensibilisierung bei Patienten, bei denen eine maximale Steigerung der Dosis möglich ist [108]

Tag	Konventionell [µg]	Hamburg-Schema [µg]	„Ultra-Schnell“ [µg]
1	0,02 0,04 0,08 0,2	0,001 0,01	0,01 0,1 1,0 10,0 20,0 40,0 80,0
2	0,4 0,8 1,0 4,0	0,1 0,4 0,7	100,0 100,0
3	8,0 10,0 20,0 30,0	1,0 4,0 7,0	
4	10,0 20,0 60,0 70,0	10,0 40,0 70,0	
5	40,0 50,0 60,0 70,0	100,0	
6	80,0 90,0 100,0		
8			100,0
15	100,0	100,0	
22	100,0	100,0	100,0
36	100,0	100,0	
50	100,0	100,0	100,0 (Tag 43)
71	100,0	100,0	100,0 (Tag 71)
92	100,0	100,0	
120	100,0	100,0	100,0 (Tag 99)

Danach weiter alle 4 Wochen für mindestens 3 Jahre [108]

1.3.2.1 Durchführung

In unserem Hause wird entsprechend dem Hamburg-Schema unter stationären Bedingungen mit 1 bis 3 Injektionen pro Tag über 5 Tage mit steigender Dosis behandelt. Das Vorgehen muss dabei je nach Verträglichkeit dem Patienten

individuell angepasst werden. Bei 3 bis 35% der behandelten Patienten kommt es mindestens einmal während der Steigerung der Dosis zu systemischen Komplikationen [19, 115]. Nach Abklingen der Symptome bei entsprechender medikamentöser Behandlung kann die Hyposensibilisierung aber mit einer um 1 bis 2 Schritte reduzierten Dosis weitergeführt werden. Solche systemischen Komplikationen treten häufiger bei Hyposensibilisierung mit Bienen- als mit Wespengift auf [117]. Bei den meisten behandelten Patienten kann man mehr oder weniger schwerwiegende Lokalreaktionen an der Injektionsstelle beobachten, diese klingen aber in der Mehrzahl der Fälle bei entsprechender Therapie ohne Komplikationen ab. Weitere Dosissteigerungen werden in der Regel gut vertragen.

Nach Erreichen der Erhaltungsdosis von 100 µg wird diese zuerst wöchentlich, dann nach 2, 3 und 4 Wochen ambulant injiziert. Bei Vorliegen besonderer Risikofaktoren (s. Tab. 1.3) kann von vornherein eine Erhaltungsdosis von 200 µg pro 4 Wochen angestrebt werden.

1.3.2.2 Therapiedauer und Kontrolle des Therapieerfolges

Nach neuesten Erkenntnissen sollte die Therapie mindestens über 3 bis 5 Jahre fortgeführt werden, da man keine sichere Aussage darüber treffen kann, ab welchem Zeitpunkt der Schutz vor erneuter systemischer Reaktion besteht und eine weitere Behandlung nicht mehr notwendig ist [108].

Bei Vorliegen besonderer Risikofaktoren sollte die Behandlung grundsätzlich 5 Jahre lang erfolgen (eventuell auch länger). Bei Patienten mit Mastozytose ist eine lebenslange Hyposensibilisierung nötig [94].

Die bisher einzige objektive Möglichkeit, um den Therapieerfolg zu beurteilen, stellt die Stichprovokation dar. Diese wird, wenn der Patient zustimmt, nach Erreichen der Erhaltungsdosis (am besten nach etwa 6 bis 18 Monaten) mit dem lebenden Insekt in Notfallbereitschaft durchgeführt.

Der Erfolg der spezifischen Immuntherapie zeigt sich in der Tatsache, dass etwa 80 bis 100% der Patienten mit systemischen allergischen Reaktionen in der Anamnese nach Hyposensibilisierungstherapie bei einem erneuten Stichereignis nicht mehr mit ähnlich schwerer Symptomatik reagieren [98].

1.3.2.3 Kontraindikationen

Patienten unter Medikation mit β -Blockern oder ACE-Hemmern sollten nicht hyposensibilisiert werden [2, 5, 140].

Während einer Schwangerschaft sollte eine Hyposensibilisierung nicht begonnen werden, eine begonnene Therapie kann aber bei guter Verträglichkeit weitergeführt werden [130].

Bei malignen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder schwerer Immundefizienz muß im Einzelfall nach Nutzen-Risiko-Abwägung entschieden werden [61].

1.4 Der Basophilenaktivierungstest (BAT)

1.4.1 Grundlagen

Wie bereits oben erwähnt können zelluläre In-vitro-Tests wie der Basophilenaktivierungstest wesentliche Zusatzinformationen zu den klinischen Routineverfahren wie Anamnese, Hauttestung und Bestimmung der spezifischen IgE-Moleküle im Serum liefern. Dies ist z. B. der Fall, wenn das allergieauslösende Insekt aufgrund der Anamnese nicht eindeutig bestimmt werden kann, die Testergebnisse widersprüchlich ausfallen und die Indikation zur Hyposensibilisierungstherapie nicht eindeutig gestellt werden kann.

Wir haben im folgenden die Bedeutung des Basophilenaktivierungstests (BAT) näher untersucht, der auf dem Nachweis der Expression des Oberflächenmarkers CD63 auf aktivierten basophilen Granulozyten nach Stimulation mit Bienen- und Wespengift beruht [35, 39, 40, 67]. Basophile Granulozyten sind die seltensten zirkulierenden Leukozyten im Blut und machen nur 0,5 bis 1% der gesamten weißen Blutzellpopulation aus [60, 68, 91, 114] (Tab. 1.7).

Tab. 1.7 Referenzwerte der verschiedenen Leukozytenpopulationen [91]

Zelltyp	Referenzwerte %
Lymphozyten	25-40
Monozyten	2-10
Neutrophile Granulozyten	
Segmentkernige	50-70
Stabkernige	3-5
Eosinophile Granulozyten	2-4
Basophile Granulozyten	0,5-1

CD63 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, das in hoher Dichte auf der Zellmembran von aktivierten basophilen Granulozyten

nach Stimulation mit Allergen, anti-IgE oder fMLP (s. Kapitel 2) exprimiert wird [63]. Die CD63-Expression nach Stimulation der Zellen kann quantitativ mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden.

1.4.2 Durchflusszytometrische Messung

Die Technik der Durchflusszytometrie (Flowzytometrie) bietet die Möglichkeit, auf einfache Art und Weise und ohne großen Personal- und Zeitaufwand Parameter des Immunsystems auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Dabei ist es möglich, sowohl Informationen über die Zellmorphologie zu erhalten, als auch molekulare Parameter auf der Oberfläche einzelnen Zellen zu bestimmen und zu identifizieren [43, 118], die bestimmte Eigenschaften und Funktionen der Zellen widerspiegeln.

1.4.2.1 Durchführung

Einzelne Zellen fließen hintereinander in einer dünnen Kapillare durch ein Laserlicht, das durch diese Zellen gestreut wird. Anhand dieser Streuung wird das jeweilige Zellvolumen gemessen und in einem Diagramm aufgetragen. Durch Analyse dieser Parameter ist es möglich, bestimmte Zellpopulationen in einem Zellgemisch zu erkennen und herauszufiltern. Zusätzlich können charakteristische Oberflächenmoleküle auf diesen Zellen bestimmt werden, die auf bestimmte Leistungen oder Eigenschaften der Zellen hinweisen. Dazu müssen vor der Messung den Zellen fluoreszierende Antikörper zugegeben werden, die gegen spezielle Oberflächenmoleküle der Zellen gerichtet sind und an diese binden. Diese Antikörper werden durch das Laserlicht angeregt und senden Lichtsignale aus, die von Detektoren registriert und analysiert werden.

1.4.2.2 Möglichkeiten der Methode

Die Flowzytometrie ermöglicht es somit, neben morphologischen Eigenschaften auch diejenigen Moleküle auf der Zelloberfläche zu messen, die zur Gruppe der Leukozytendifferenzierungsantigene gehören und im CD-System (cluster of differentiation) festgelegt sind. Im Falle des Basotest® ist das Zielmolekül der Oberflächenmarker CD63, ein Glykoprotein von 53kDa, das sich auf der Lyso-somenmembran verschiedener Zelltypen wie basophiler Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, Thrombozyten u. a., befindet. Da CD63 nach Allergenkontakt mit hoher Dichte auf der Zellmembran aktivierter basophiler Granulozyten exprimiert wird, kann er als Indikator für die Zelldegranulation und

Mediatorausschüttung herangezogen werden [35, 40, 43, 67]. Dazu werden mit Hilfe eines monoklonalen anti-IgE-PE-Antikörpers zunächst die basophilen Granulozyten mit hoher IgE-Expression auf der Oberfläche aus der Zellpopulation herausselektiert, während im nächsten Schritt dann durch Zugabe eines anti-gp53-FITC-Antikörpers ein „gate“ auf aktivierte basophile Granulozyten gesetzt wird (vgl. 2.3.2).

Weitere Einsatzgebiete der Durchflusszytometrie sind, neben den allergischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Lymphome, Leukämien, Viruserkrankungen, die Onkologie u.a.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des Basophilenaktivierungstests (BAT) bei 57 Patienten mit Insektengiftallergie zu untersuchen, wobei folgende Punkte von besonderem Interesse waren:

- Ermittlung der Sensitivität des Basophilenaktivierungstests für anamnestisch angegebene Bienengift-, Wespengift- und kombinierte Bienen- und Wespengiftallergie
- Ermittlung der Spezifität des BATs für anamnestisch angegebene Bienengift-, Wespengift- und kombinierte Bienen- und Wespengiftallergie
- Ermittlung der Konkordanz zwischen Anamnese, Hauttest, RAST und BAT
- Untersuchungen, inwieweit der BAT in der Lage ist, Zusatzinformationen zu den bei herkömmlichen klinischen Testverfahren ermittelten Daten zu liefern, die u. a. bei der Indikationsstellung zur spezifischen Immuntherapie hilfreich sein können
- Überprüfung, ob Ergebnisse aus dem Basophilenaktivierungstest Hinweise auf das Auftreten von Nebenwirkungen während der Immuntherapie geben können

2 Material und Methode

2.1 Patienten und Kontrollpersonen

Es wurden 57 Patienten mit systemischer allergischer Reaktion vom Soforttyp auf Hymenopterenstiche in der Anamnese untersucht. Der Schweregrad der jeweiligen Reaktion wurde mit Grad I bis Grad III angegeben (Tab. 1.2; vgl. Anhang, S. 79) [108].

Zunächst wurde bei den Testpersonen ein Prick-Schwellentest an den Unterarmbeugeseiten durchgeführt, bei dem die Konzentration der eingesetzten Hymenoptereingift-Testlösung (Venomil; Fa. Bencard, München, Deutschland) zur Ermittlung der Reaktionsschwelle in Zehnerpotenz-Schritten von 0,01 µg/ml auf 100 µg/ml gesteigert wurde.

Jeweils ein Tropfen der Allergenverdünnungen wurde auf die Haut aufgetragen. Anschließend wurde die Haut mit einer Prick-Lanzette im schrägen Winkel kurz angestochen und angehoben. Nach 15 Minuten wurde die Testlösung abgewischt und das Testergebnis abgelesen [32].

Fiel der Prick-Test negativ aus, wurde intracutan mit Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 µg/ml getestet. Dazu wurden die Allergenverdünnungen intracutan injiziert, wobei stets eine kleine Quaddel entstehen musste. Als Reaktionsschwelle wurde diejenige Konzentrationsstufe bezeichnet, bei der es zum Auftreten einer zumindest einfach positiven Hauttest-Reaktion kam (Reaktion vom Soforttyp, positives Testergebnis bei Quaddeldurchmesser >3 mm für den Prick-Test und für den Intrakutantest, gemäß Richtlinien der EAACI) [108, 139]. Für beide Verfahren ist es wichtig, eine positive (Histamin) und eine negative Kontrolle (Kochsalz) mitzuführen, die bei der Auswertung des Testergebnisses berücksichtigt werden. Eine Ablesung nach einem oder mehreren Tagen kann auch verzögerte Reaktionen erfassen.

Mit Hilfe des RAST (Pharmacia CAP RAST FEIA, Uppsala, Schweden) kann die Menge an allergenspezifischen IgE im Serum bestimmt werden. Dazu wird eine Serumprobe der allergischen Probanden mit einem Testantigen inkubiert, das an eine Trägersubstanz gebunden ist. Es bilden sich Immunkomplexe aus, deren Zahl mit der allergenspezifischen IgE-Konzentration im Serum korreliert. In einem weiteren Schritt werden die Immunkomplexe mittels radioaktiv markierter Anti-IgE-Antikörper nachgewiesen. Die Serumkonzentration des spezifischen IgE ist proportional der Strahlungsintensität der fixierten Immunkomplexe. Die Ergebnisse des RAST werden im Allgemeinen in 6 Klassen

geordnet angegeben. Dabei bedeuten: Klasse 0 = negativ, Klasse 1 = schwach positiv und Klassen 2 bis 6 = positiv mit ansteigender Intensität.

Nach Durchführung von Intrakutantest und RAST [45] wurde die Indikation zur Hyposensibilisierung gestellt.

Die Patienten stellten sich zu Beginn der Hyposensibilisierungsbehandlung in der Klinik vor, wobei die Blutentnahme zur Testdurchführung vor der ersten Giftinjektion erfolgte. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme verneinten alle Patienten die Einnahme antiallergischer Medikamente sowie von β -Blockern und/oder ACE-Hemmern [2, 5, 52, 140]. Kontraindikationen für eine Hyposensibilisierungstherapie bestanden nicht. Ein grippaler Infekt oder allergische Beschwerden lagen in keinem Falle vor. Im Einzelnen handelte es sich um folgende 3 Patientengruppen:

- 12 Patienten mit systemischer Reaktion auf Bienengift:

6 Männer, 6 Frauen; zwischen 10 und 70 Jahren

(mittleres Alter: 41,7 Jahre \pm 20,1)

Grad I: n=2, Grad II: n=7, Grad III: n=3

- 6 Patienten mit systemischer Reaktion auf Bienen- und Wespengift:

5 Männer, 1 Frau; zwischen 30 und 68 Jahren

(mittleres Alter: 45,3 Jahre \pm 15,2)

Grad I: n=1, Grad II: n=5, Grad III: n=0

- 39 Patienten mit systemischer Reaktion auf Wespengift:

18 Männer, 21 Frauen; zwischen 13 und 79 Jahren

(Mittleres Alter: 46,5 Jahre \pm 16,2)

Grad I: n=8, Grad II: n=23, Grad III: n=8

Die Kontrollgruppe bestand aus 10 Personen (5 Männer, 5 Frauen; zwischen 32 und 67 Jahren; mittleres Alter: 50,1 Jahre \pm 12,3) mit negativer Anamnese bezüglich einer Hymenopterenengiftallergie und mit negativem RAST für Bienen- und Wespengift. Ein Hauttest wurde nicht durchgeführt.

2.2 Geräte und Reagenzien

- Brutschrank mit 37°C (Typ UL 40, Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland)
- Schwenkmischer (SM1, Desaga GmbH, Wiesloch, Deutschland)
- Eisbad mit Deckel
- Vortex-Mischer (REAX 2000, Heidolph GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland)

- Kühlzentrifuge mit freischwingenden Einstzen für 12 x 75 mm Röhrchen (Universal 32-R, Fa. Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Durchflusszytometer (FACScan™, Becton-Dickinson Immunocytometry System, Heidelberg, Deutschland) mit 488 nm Lichtanregung (Argonlaser) und CellQuest™-Software
- Laborglasflaschen 100, 200 und 1000 ml (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
- Variable Transferpipetten (Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 10 bis 100 Öl und 200 bis 1000 Öl mit Pipettenspitzen (Eppendorf Tips Standard)
- Dispenser, Dispenserspitzen (Labopet 240, Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Österreich) und Einwegpipetten (10 ml x 2 und 5 ml x 0,1, Greiner Labortechnik)
- Einmal-Probenröhrchen (Falcon-Röhrchen, 12 x 75 mm, 6 ml, Omnilab Laborzentrum, Bremen, Deutschland)
- Eppendorfgefe (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Reagenzglasgestelle für Einmal-Probenröhrchen (Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland) und Eppendorfgefe (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Heparinr hrchen zur venösen Blutentnahme
- Steriles, pyrogenfreies Reinstwasser zur Rekonstitution von Lysing Solution und Stimulationspuffer
- Bidestilliertes Wasser zur Herstellung der Waschlösung

2.3 Basophilenaktivierungstest (BAT, Basotest®)

2.3.1 Allergene

Für die Hauttestungen und den Basophilen-Freisetzungstest wurden Reless®-Bienengift (*Apis mellifera*) und Reless®-Wespengift (*Vespula* spp.) der Firma ALK-SCHERAX Arzneimittel GmbH, 22569 Hamburg, verwendet.

Je 1100  g Lyophilisat des Bienen- und Wespengiftes wurden in 11 ml Reinstwasser gelöst und in Aliquots zu 200 Öl in NUNC Cryotubes überführt. Die Cryotubes wurden in der vorgekühlten Kühlfalle bei -80 C für 2 Tage tiefgefroren, anschließend über Nacht lyophilisiert und bei -20 C in Eppendorf-Tubes eingefroren.

Für jede Versuchsreihe wurde jeweils ein Aliquot des Bienen- und Wespengiftes frisch aufgetaut, mit 200 l Waschlösung rekonstituiert (Konzentration der Stammlösung: 100  g/ml) und für den Testkit verwendet.

2.3.2 Prinzip

Der Basotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg) ermöglicht die Untersuchung der allergenspezifischen Aktivierung von basophilen Granulozyten in heparinisiertem humanen Vollblut nach Stimulation mit Bienen- und Wespengift in verschiedenen Konzentrationen. Dabei führt die Aktivierung der Basophilen zur Fusion cytoplasmatischer Granula mit der Plasmamembran und zur nachfolgenden Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren.

Im Falle des Basotest® wird die Expression des Glykoproteins CD63 (= gp53), eines Oberflächenmoleküls auf aktivierten humanen basophilen Granulozyten, quantitativ bestimmt. CD63 dient dabei als Marker der Aktivierung und Degranulation der Basophilen nach Stimulation mit Bienen- und Wespengift [35, 40, 54]. Der Degranulationsprozess wird durch Inkubation der Vollblutproben auf Eis gestoppt. Danach werden die Zellen mit einem Antikörperreagenz angefärbt, das aus zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern besteht. Diese beiden Antikörper sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verbunden: Der Antikörper anti-IgE-PE ist mit Phycoerythrin konjugiert und bindet an humanes Immunglobulin E. Auf diese Weise werden im Zellgemisch der Probe die basophilen Granulozyten, die IgE-Moleküle auf ihrer Oberfläche gebunden haben, erkannt und markiert. Der monoklonale Antikörper anti-gp53-FITC ist mit Fluorescein konjugiert und bindet an das Glykoprotein CD63 (= gp53), das nur von aktivierten basophilen Granulozyten nach Allergenkontakt auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Durch diesen Antikörper werden also ausschließlich aktivierte basophile Granulozyten markiert.

Anschließend werden die Erythrozyten durch Lyse aus dem Reaktionsansatz entfernt und die Leukozyten fixiert. Nach 2 Waschschritten wird der Prozentsatz an aktivierten basophilen Granulozyten im Durchflusszytometer bestimmt.

Parallel zu den Testansätzen mit heparinisiertem Patientenvollblut, die mit drei unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Bienen- und Wespengiftes versetzt werden, werden pro Patient jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle kommt das chemotaktische Peptid N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) zum Einsatz, als Negativkontrolle wird Waschlösung verwendet.

2.3.3 Material und Reagenzien

- Heparinisiertes Vollblut der Testpersonen:

Jedem Patienten wurde in einem heparinversetzten Röhrchen venöses Blut entnommen. Das Vollblut wurde sofort auf einen Schüttler überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur durchgemischt. Zwischen Blutentnahme und Weiterverarbeitung des Blutes im Testansatz lagen nie mehr als 3 Stunden.

- Basotest®-Testkit der Firma Orpegen Pharma, Heidelberg [4]; im Testkit enthalten sind:
 1. 1 Fläschchen (2ml) Zweifarb-Antikörperreagenz („staining reagent“); es enthält 2 monoklonale Antikörper: anti-IgE-PE und anti-gp53-FITC; das Antikörperreagenz wurde im dunklen Kühlschrank aufbewahrt.
 2. 1 Fläschchen mit lyophilisiertem Stimulationspuffer („stimulation buffer“, enthält Interleukin-3) zur Rekonstitution in 2 ml pyrogenfreiem Reinstwasser. Nach Rekonstitution wurde der Puffer in Aliquots von 180 µl bei -20 °C gelagert.
 3. 1 Röhrchen (200µl) mit dem chemotaktischen Peptid fMLP (200 x Stammlösung; 0,4 mM). Zum Gebrauch wurden 5µl in 1 ml Waschlösung verdünnt und nach Gebrauch verworfen.
 4. 1 Fläschchen (20 ml) Lysing Solution zur Lyse der Erythrozyten und gleichzeitigen Fixierung der Leukozyten (10 x Stammlösung); die Stammlösung wurde mit Reinstwasser 1 : 10 verdünnt und nach Gebrauch verworfen.
 5. 1 Fläschchen Instamed-Salze für die Waschlösung („salts for washing solution“) zur Rekonstitution in 1000 ml Aqua bidest. Die gebrauchsfertige Waschlösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und alle 2 Wochen erneuert.

Der Testkit wurde bei 2 bis 8°C im dunklen Kühlschrank gelagert. Die Lysing Solution, sowie die fMLP- und Allergen-Arbeitslösungen wurden nach Gebrauch verworfen und für jede Testreihe frisch hergestellt.

2.3.4 Durchführung des Basophilenaktivierungstestes

2.3.4.1 Vorbereitungen

1. Die Salze für die Waschlösung wurden in 1000ml Aqua bidest aufgelöst.
2. Pro Patient wurde 1 Aliquot (180 µl) des eingefrorenen Stimulationspuffers aufgetaut.
3. Es wurden jeweils 3 Verdünnungsstufen sowohl der Bienen- als auch der Wespengiftstammlösungen frisch hergestellt (1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml im Testansatz):
 Je 1 Aliquot des lyophilisierten und tiefgefrorenen Bienen- und Wespengiftes wurde aufgetaut und in 200 µl Waschlösung in Eppendorfgläsern gelöst (Endkonzentration der Stammlösung: 100 µg/ml). Daraus wurden 50 µl entnommen und mit 450 µl Waschlösung versetzt (Endkonzentration 10 µg/ml = Verdünnung 0).

In den Fällen, in denen 1 bis 2 Patienten gleichzeitig getestet werden sollten, wurden zur Herstellung der 3 Allergenverdünnungsstufen für den Testansatz folgende Mengen an Allergen und Waschlösung eingesetzt:

	Menge des Allergens (Bienen- oder Wespen Gift)	Menge der zugegebenen Waschlösung	Konzentration des Allergens im Verdünnungs- ansatz	Konzentration des Allergens im Testansatz (220 µl) bei Zugabe von 100 µl der jeweiligen Verdünnung
Verdünnung 1 (300 µl)	66 µl Verdünnung 0	234 µl	2,2 µg/ml	1,00 µg/ml
Verdünnung 2 (300 µl)	30 µl Verdünnung 1	270 µl	0,22 µg/ml	0,10 µg/ml
Verdünnung 3 (300 µl)	30 µl Verdünnung 2	270 µl	0,022 µg/ml	0,01 µg/ml

Sollten 3 bis 4 Patienten gleichzeitig getestet werden, wurden folgende Mengen an Allergen und Waschlösung zur Herstellung der Verdünnungen eingesetzt:

	Menge des Allergens	Menge der zugegebenen Waschlösung	Konzentration des Allergens im Verdünnungs- ansatz	Konzentration des Allergens im Testansatz (220 µl) bei Zugabe von 100 µl der jeweiligen Verdünnung
Verdünnung 1 (500 µl)	110 µl Verdünnung 0	390 µl	2,2 µg/ml	1,00 µg/ml
Verdünnung 2 (500 µl)	50 µl Verdünnung 1	450 µl	0,22 µg/ml	0,10 µg/ml
Verdünnung 3 (500 µl)	50 µl Verdünnung 2	450 µl	0,022 µg/ml	0,01 µg/ml

4. 5 µl des fMLP wurden in 1 ml Waschlösung im Eppendorf-Gefäß gelöst und auf dem Vortex-Mischer gut vermischt.
5. Die Lysing Solution wurde mit Reinstwasser 1:10 verdünnt (pro Patient wurden 16 ml benötigt).

6. Vorbereiten des Eiswasserbades
7. Vorkühlen der Kühlzentrifuge (4°C)
8. Einschalten und Kalibrieren des Durchflusszytometers

2.3.4.2 Versuchsablauf

Jeder Testansatz bestand pro Patient aus 8 Probenröhrchen (5 ml): eine Positiv-, eine Negativkontrolle, 3 Bienengiftverdünnungen und 3 Wespengiftverdünnungen.

Degranulation:

1. Je 100 µl heparinisiertes Vollblut wurden auf den Boden von 8 Probenröhrchen aliquotiert. Es sollte dabei kein Blut an den Röhrchenwänden hängen bleiben.
2. Zugabe von je 20 µl Stimulationspuffer zu den Vollblutproben; die Proben wurden kurz vermischt und für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte bei Raumtemperatur die
3. Zugabe von 100 µl fMLP-Arbeitslösung (Röhrchen Nr.1; Positivkontrolle)
4. Zugabe von 100 µl Waschlösung (Röhrchen Nr.2; Negativkontrolle)
5. Zugabe von 100 µl Bienengiftverdünnung 1 (Röhrchen Nr. 3; 1 µg/ml)
6. Zugabe von 100 µl Bienengiftverdünnung 2 (Röhrchen Nr. 4; 0,1 µg/ml)
7. Zugabe von 100 µl Bienengiftverdünnung 3 (Röhrchen Nr. 5; 0,01 µg/ml)
8. Zugabe von 100 µl Wespengiftverdünnung 1 (Röhrchen Nr. 6; 1 µg/ml)
9. Zugabe von 100 µl Wespengiftverdünnung 2 (Röhrchen Nr. 7; 0,1 µg/ml)
10. Zugabe von 100 µl Wespengiftverdünnung 3 (Röhrchen Nr. 8; 0,01 µg/ml)
11. Alle 8 Röhrchen wurden auf dem Vortex-Mischer gut vermischt und 20 min lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
Anschließend wurde die Degranulation durch Inkubation der Proben für 5 min im Eisbad gestoppt.

Färbung mit Zweifarb-Antikörperreagenz:

12. Zu jeder Probe im Eisbad wurden 20 µl des Antikörper-Reagenz zugegeben, gut vermischt und für 20 min im Eisbad im Dunkeln inkubiert (Markierung der aktivierten basophilen Granulozyten).

Lyse und Fixierung:

13. Anschließend wurden die Proben aus dem Eisbad genommen, bei Raumtemperatur mit 2 ml Lysing Solution versetzt und gut vermischt.
14. Inkubation der Proben für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln (Fixierung der Leukozyten und Lyse der Erythrozyten).
15. Abzentrifugieren der Proben in der Kühlzentrifuge (vorgekühlt) für 5 min bei 4°C und 1750 rpm. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen.

Waschen:

16. Zugabe von 3 ml Waschlösung zu jeder Probe und Mischen.
17. Abzentrifugieren der Proben in der Kühlzentrifuge für 5 min bei 4 °C und 1750 rpm. Der Überstand wurde verworfen.
18. Der Zellniederschlag wurde mit 200 µl Waschlösung versetzt, gut gemischt und bis zur Messung im Zytometer im dunklen Eisbad aufbewahrt. Die Messung sollte am besten direkt im Anschluss an die Testdurchführung, auf jeden Fall aber innerhalb von 2 Stunden nach Beendigung des Tests erfolgen.

2.3.5 Probenanalyse im Durchflusszytometer

Nach Durchführung des Basotests® wurden die Proben bei Anregung im blaugrünen Lichtbereich (Argonlaser, 488 nm) im Durchflusszytometer (FACScan™: Becton-Dickinson Immunocytometry System, Heidelberg; Software: CellQuest™) analysiert. Ausgewertet wurde dabei der Prozentsatz an aktivierten basophilen Granulozyten.

Dazu wurde ein Analysefenster („gate“) gesetzt, welches im „Dot Plot“-Diagramm die gemessenen Zellen auf Zellen mit starker IgE-Expression (= basophile Granulozyten) eingrenzt (Abb. 2.1). Während der Auswertung wurde durch das Setzen eines Schwellenwertes im Fluoreszenz2-(FL2)-Kanal ein Analysefenster („living gate“) auf basophile Granulozyten mit sehr hoher IgE-

Expression gesetzt. Damit wurden die Basophilen erfasst, die nach Aktivierung durch das Antigen das Glykoprotein CD63 (= gp53) exprimieren (Abb. 2.2). Zur Auswertung wurden dabei pro Probe mindestens 1000 Basophile herangezogen.

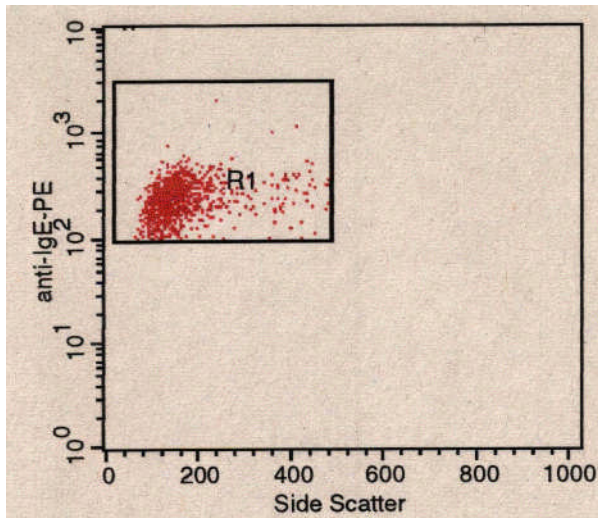


Abb. 2.1 Analysefenster, festgelegt auf basophile Granulozyten

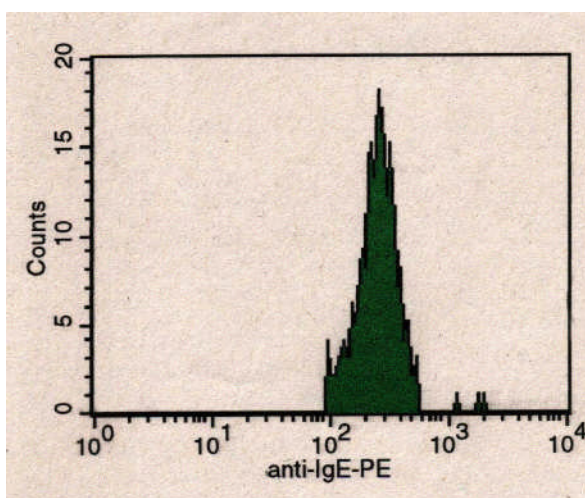


Abb. 2.2 „Gate“, festgelegt auf basophile Granulozyten mit starker IgE-Expression

Zur Bestimmung des Prozentsatzes an Basophilen, die das Aktivierungsantigen CD63 exprimieren, wurden im Fluoreszenz1(FL1)-Histogramm im Kontrollansatz Marker gesetzt. Unter Beibehaltung dieser Marker wurde dann der Prozentsatz an aktivierten Zellen bestimmt (Abb. 2.3 bis 2.5). Ergebnisse mit einer Aktivierung der basophilen Granulozyten von mehr als 15% wurden, gemäß Herstellerangaben, als positiv gewertet.

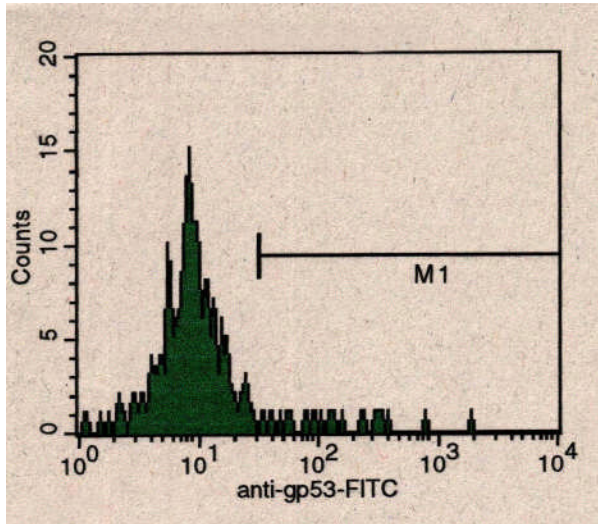


Abb. 2.3 Histogramm einer Negativkontrolle (Probe mit Waschlösung) mit einer Aktivierung von 3,9%; Erwartungswert: 1,8 bis 9,5%

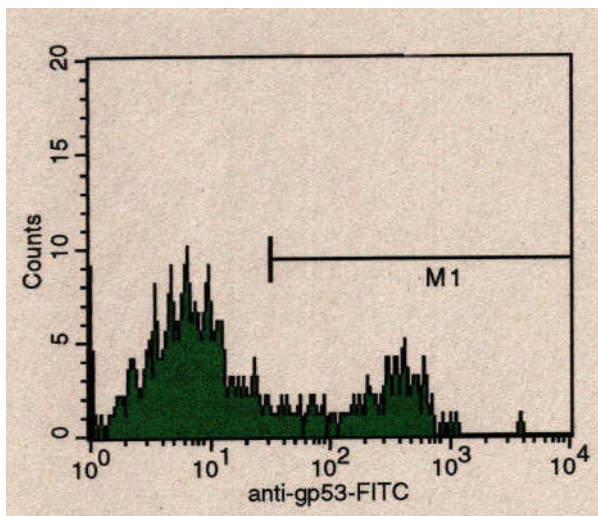


Abb. 2.4 Histogramm einer Positivkontrolle (Probe mit fMLP) mit einer Aktivierung von 35,5%; Erwartungswert: 25,2 bis 59,5%

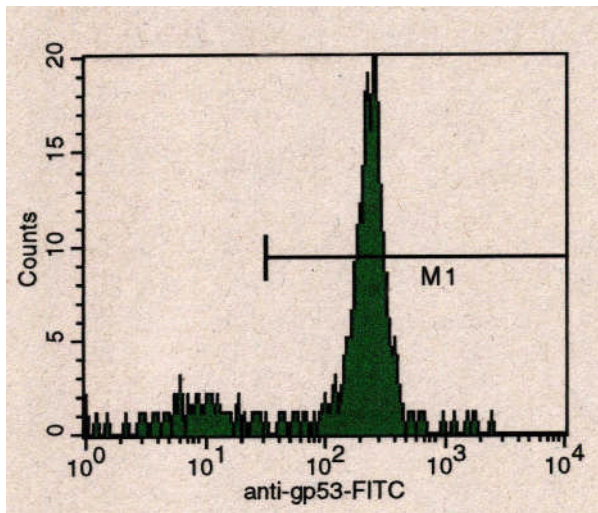


Abb. 2.5 Histogramm eines positiven Testergebnisses (Probe mit Allergen) mit einer Aktivierung von 90,6%; Erwartungswert: über 15%

2.3.6 Einflussparameter

Die Testergebnisse können durch verschiedene Parameter beeinflusst und möglicherweise verfälscht werden [4]. Folgende Punkte sind dabei zu beachten:

1. Heparinisiertes Vollblut sollte auf jeden Fall innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet und bis zu Testbeginn bei Zimmertemperatur durchmischt werden. Im unserem Falle wurde das Vollblut nie länger als 3 Stunden bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Die Blutentnahmeröhrchen sollten dabei ausschließlich mit Heparin für pharmazeutische Zwecke versetzt sein, da nur so sichergestellt ist, dass keine Verunreinigung mit Endotoxin stattfinden kann.
2. Vor dem ersten Einsatz des Basotests® und bei Verwendung von natürlichen Allergenen muss zunächst die optimale Allergenkonzentration bestimmt werden. Dazu wurde das Allergen mit Waschlösung auf verschiedene Konzentrationen verdünnt (1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,001 µg/ml), um danach die optimale Allergenkonzentration mit Hilfe von Vollblutproben allergischer Patienten zu ermitteln. In unserem Falle erwiesen sich die Allergenkonzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml als optimale Verdünnungsstufen.
3. Die Verwendung von pyrogenfreiem Reinstwasser bei der Rekonstitution verschiedener Lösung (z. B. der Lysing Solution) des Basotest®-Kits ist essentiell, da Pyrogene zur unerwünschten Degranulation von basophilen

Granulozyten führen und somit möglicherweise ein falsch positives Ergebnis vortäuschen könnten. Zur Verdünnung der Allergenstamm-lösungen und der fMLP-Positivkontrolle sowie als Negativkontrolle sollte unbedingt Waschlösung verwendet werden.

4. Die Blutproben sollten während des Versuchs immer abgedeckt sein, um eine Verunreinigung mit Allergenen aus der Luft zu vermeiden.

2.3.7 Normalwerte

Die Referenzwerte an aktivierten basophilen Granulozyten wurden anhand von heparinisiertem Frischblut allergischer und nicht allergischer Personen bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte:

	Aktivierte basophile Granulozyten (CD63-positiv) [%]
Negativkontrolle (Waschlösung)	1,8 – 9,5
Positivkontrolle (fMLP)	25,2 – 59,5

Probanden, deren Blutproben eine Aktivierung der basophilen Granulozyten von mehr als 15% aufwiesen, wurden als allergisch gegen das getestete Antigen angesehen [4].

Die Messung der verschiedenen Verdünnungsstufen des eingesetzten Allergens sollte eine Aktivierung der Basophilen in Abhängigkeit von der Allergenkonzentration ergeben.

2.3.8 Grenzen der Methode

1. Die Proben müssen 95% lebende Zellen oder mehr enthalten und sie müssen voll antikoaguliert sein. Bei zu lange gelagerten Proben mit einem zu hohen Anteil an toten Zellen kann die ausgetretene DNA zu einer unspezifischen Färbung der Zellen führen. Gleiches gilt für unvollständig koagulierte Proben, da Thrombozytenaggregate ebenfalls zu einer unspezifischen Färbung führen können.

2. Durch die Verdünnung der Allergenstammlösung kommt es zu einem Aktivitätsverlust, so dass die stark verdünnten Allergenlösungen nicht gelagert werden können, sondern für jede Testreihe frisch hergestellt werden müssen.
3. Die zu testenden Patienten sollten mindestens 48 Stunden vor Blutentnahme keine Antihistaminika eingenommen haben, Kortikosteroide sollten mindestens 2 Wochen vorher abgesetzt werden.
4. Bei einigen Personen werden die basophilen Granulozyten von dem im Test eingesetzten anti-IgE-Antikörper nicht erkannt. Es kann demzufolge keine Stimulation durch Positivkontrolle oder Antigen nachgewiesen werden.

2.4 Berechnung der 0,1/1-Ratio

Kosnik et al. [69] veröffentlichten Ergebnisse, nach denen sie einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Basophilenaktivierung im BAT und dem Risiko für gravierende Nebenwirkungen im Rahmen einer Hyposensibilisierungstherapie postulierten. Dazu ermittelten sie für jeden Patienten den Quotienten aus dem Grad der Basophilenaktivierung bei den Allergenverdünnungen 0,1 und 1 µg/ml (0,1/1-Ratio in Prozent) und setzten diesen in Bezug zum Auftreten von Nebenwirkungen bei der anschließenden Immuntherapie.

Gleiches wurde für die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse durchgeführt: Bei 52 Patienten, die sich einer Immuntherapie unterzogen, wurde die 0,1/1-Ratio ermittelt und mit dem Grad der auftretenden systemischen Nebenwirkungen verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten mit Bienengiftallergie

3.1.1 Klinische Charakterisierung

Unter den Patienten befanden sich 6 Männer und 6 Frauen zwischen 10 und 70 Jahren, die alle in der Anamnese eine systemische anaphylaktische Reaktion auf einen Bienenstich zeigten (vgl. Tab. 3.1).

Darunter waren 2 Patienten mit einer Reaktion Grad I, 7 Patienten mit einer Reaktion Grad II und 3 Patienten mit einer Reaktion Grad III.

Tab. 3.1 Klinische Charakterisierung der Patientengruppen

Anaphylaktische Reaktion in der Anamnese	Patientenanzahl (n)	Männer (n)	Frauen (n)	Alter [Jahre]	Durchschnittsalter und Standardabweichung [Jahre]	Schweregrad der letzten Reaktion (n)		
						I	II	III
Bienenstich	12	6	6	10-70	41,7±20,1	2	7	3
Bienen- und Wespenstich	6	5	1	30-68	45,3±15,2	1	5	0
Wespenstich	39	18	21	13-79	46,5±16,2	8	23	8
Gesamt	57	29	28	10-79	45,3±17,0	11	35	11

Der Hauttest auf Bienengift war in 12 Fällen positiv, der auf Wespengift in 6 Fällen. Bienengiftspezifische IgE-Antikörper waren bei 11 Patienten nachweisbar, IgE-spezifische Antikörper gegen Wespengift bei 8 Patienten.

Ein Patient zeigte keine bienenspezifischen IgE-Antikörper bei positivem Hauttest. Sowohl RAST als auch Hauttest für Bienengift waren bei 11 der 12 getesteten Patienten positiv. RAST und Hauttest für Wespengift fielen bei 5 Patienten positiv aus (Tab. 3.2).

3.1.2 Basophilenaktivierungstest

3.1.2.1 Ergebnisse der Testung mit Bienengift

Die bei der Durchführung des Basophilenaktivierungstests erhaltenen Ergebnisse (gemessen wurde jeweils die Aktivierung der basophilen Granulozyten in Prozent) sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Als positive Reaktion wurde eine Aktivierung über 15% gewertet.

Tab. 3.2 Ergebnisse des Hauttests, des RAST und des Basophilenaktivierungstests bei Patienten mit anamnestisch belegter anaphylaktischer Reaktion auf Bienengift (s. auch Abb. 3.1)

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST-Klasse	Pos. Kontr. %	Neg. Kontr. %	Bienengift			Wespengift		
						1 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
6* ♀/28J	III	pos/neg	4/0	43,1	11,8	47,7	36,6	23,2	14,9	13,1	12,5
11 ♂/13J	II	pos/pos	4/3	25,8	2,4	85,6	74,1	8,5	90,4	65,9	3,8
12 ♀/37J	III	pos/neg	4/2	53,8	7,6	78,6	76,3	76,9	14,8	4,3	7,9
25** ♀/36J	I	pos/pos	2/0	49,1	2,6	72,8	7,0	2,7	81,9	19,9	3,0
32 ♂/68J	II	pos/pos	4/3	62,9	3,3	79,8	84,9	71,2	85,9	53,8	7,9
35 ♂/63J	II	pos/pos	4/2	56,1	1,4	77,9	56,0	18,7	81,9	74,2	50,8
39* ♀/42J	II	pos/neg	2/0	59,2	2,5	45,5	31,4	19,3	9,2	7,6	7,1
43*** ♀/57J	II	pos/neg	0/0	17,7	2,9	43,6	22,2	4,8	2,2	2,9	2,1
46 ♂/10J	II	pos/neg	3/2	36,8	7,2	53,9	11,3	4,8	19,9	9,5	5,9
48 ♀/28J	II	pos/neg	5/2	35,2	3,1	90,6	88,3	52,2	20,0	3,8	2,1
54 ♂/70J	III	pos/pos	5/3	21,8	2,3	51,5	57,0	8,3	71,9	33,4	13,1
57 ♂/48J	I	pos/pos	3/2	81,6	1,6	92,4	85,2	10,7	87,7	61,3	5,5

* RAST und Hauttest für Wespengift negativ

** RAST für Wespengift negativ, aber Hauttest positiv (einziger Fall)

*** RAST für Bienengift negativ, aber Hauttest positiv (einziger Fall)

Positive Ergebnisse sind fett gedruckt

Tab. 3.3 zeigt die Verteilung der Basophilenaktivierung in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Bienengiftverdünnung.

Tab. 3.3 Basophilenaktivierung bei Patienten mit Bienengiftallergie in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Bienengiftverdünnung

Basophilenaktivierung [%]	Bienengiftkonzentration 1,0 µg/ml		Bienengiftkonzentration 0,1 µg/ml		Bienengiftkonzentration 0,01 µg/ml	
	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]
0 – 5					3	41,7
5 – 10			1	8,3	2	
10 – 15			1	8,3	1	8,3
15 – 20					2	16,7
20 – 25			1	8,3	1	8,3
25 – 30						
30 – 35			1	16,7		
35 – 40			1			
40 – 45	1	25,0				
45 – 50	2					
50 – 55	2	16,7			1	8,3
55 – 60			2	16,7		
60 – 65						
65 – 70						
70 – 75	1	33,3	1	16,7	1	16,7
75 – 80	3		1		1	
80 – 85			1	25,0		
85 – 90	1	8,3	2			
90 – 95	2	16,7				
95 – 100						

Bei allen 12 Patienten dieser Gruppe war der Basophilenaktivierungstest bei Einsatz der höchsten Bienengiftkonzentration positiv. Das entspricht einer Sensitivität von 100%.

Bei der Bienengiftverdünnung 1 (1,0 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 12 Patienten, also bei 100% der untersuchten Proben. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 43,6% und 92,4%. Als Median ergab sich ein Wert von 75,4% [50].

Bei der Bienengiftverdünnung 2 (0,1 µg/ml) fand sich bei 10 Patienten ein positives Ergebnis, was einem Prozentsatz von 83,3 der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten erstreckte sich dabei von 7,0% bis 88,3%. Als Median ergab sich ein Wert von 56,5%.

Bei der Bienengiftverdünnung 3 (0,01 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 6 Patienten, also bei 50% der untersuchten Proben. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 2,7% und 76,9%. Als Median ergab sich ein Wert von 14,7%.

3.1.2.2 Ergebnisse der Testung mit Wespengift

In Tab. 3.4 ist die Verteilung der Basophilenaktivierung in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftverdünnung zusammengefasst.

Tab. 3.4 Basophilenaktivierung bei Patienten mit Bienengiftallergie in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftverdünnung

Basophilenaktivierung [%]	Wespengiftkonzentration 1,0 µg/ml		Wespengiftkonzentration 0,1 µg/ml		Wespengiftkonzentration 0,01 µg/ml	
	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]
0 – 5	1	16,7	3	41,7	4	75
5 – 10	1		2		5	
10 – 15	2	16,7	1	8,3	2	16,7
15 – 20	1	8,3	1	8,3		
20 – 25	1	8,3				
25 – 30						
30 – 35			1	8,3		
35 – 40						
40 – 45						
45 – 50						
50 – 55			1	8,3	1	8,3
55 – 60						
60 – 65			1	16,7		
65 – 70			1			
70 – 75	1	8,3	1	8,3		
75 – 80						
80 – 85	2	33,3				
85 – 90	2					
90 – 95	1	8,3				
95 – 100						

Bei der Wespengiftverdünnung 1 (1,0 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 8 Patienten; das entspricht 66,7% der untersuchten Proben. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag dabei zwischen 2,2% und 90,4%. Als Median ergab sich ein Wert von 46,0%.

Bei der Wespengiftverdünnung 2 (0,1 µg/ml) fand sich bei 6 Patienten ein positives Ergebnis, was einem Prozentsatz von 50,0 der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten erstreckte sich von 2,9% bis 74,2%. Der Median lag bei 16,5%.

Bei der Wespengiftverdünnung 3 (0,01 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei einem Patienten, was 8,3% der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 2,1% und 50,8%. Als Median ergab sich ein Wert von 6,5%.

Abb. 3.1 zeigt die durchschnittliche Aktivierung der basophilen Granulozyten im BAT bei Patienten mit anamnestisch belegter Allergie gegen Bienenstiche in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Giftkonzentration.

Tab. 3.5 bietet einen zusammenfassenden Vergleich der Ergebnisse von Hauttest, RAST und Basophilenaktivierungstest bei dieser Patientengruppe.

Demnach liegt im vorliegenden Patientenkollektiv die Sensitivität des BAT bei 100%, des RAST bei 91,7% und des Hauttests bei 100%.

Tab. 3.5 Ergebnisse von Hauttest, RAST und BAT bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf Bienenstiche in der Anamnese

Getestetes Allergen	Positiver Hauttest (n)	Giftspezifische IgE-Antikörper (RAST-Klasse: n)							Positiver Basophilenaktivierungstest bei Allergenkonzentrationen von		
		0	1	2	3	4	5	6	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
Bienengift	12	1	0	2	2	5	2	0	12	10	6
Wespengift	6	4	0	5	3	0	0	0	8	6	1

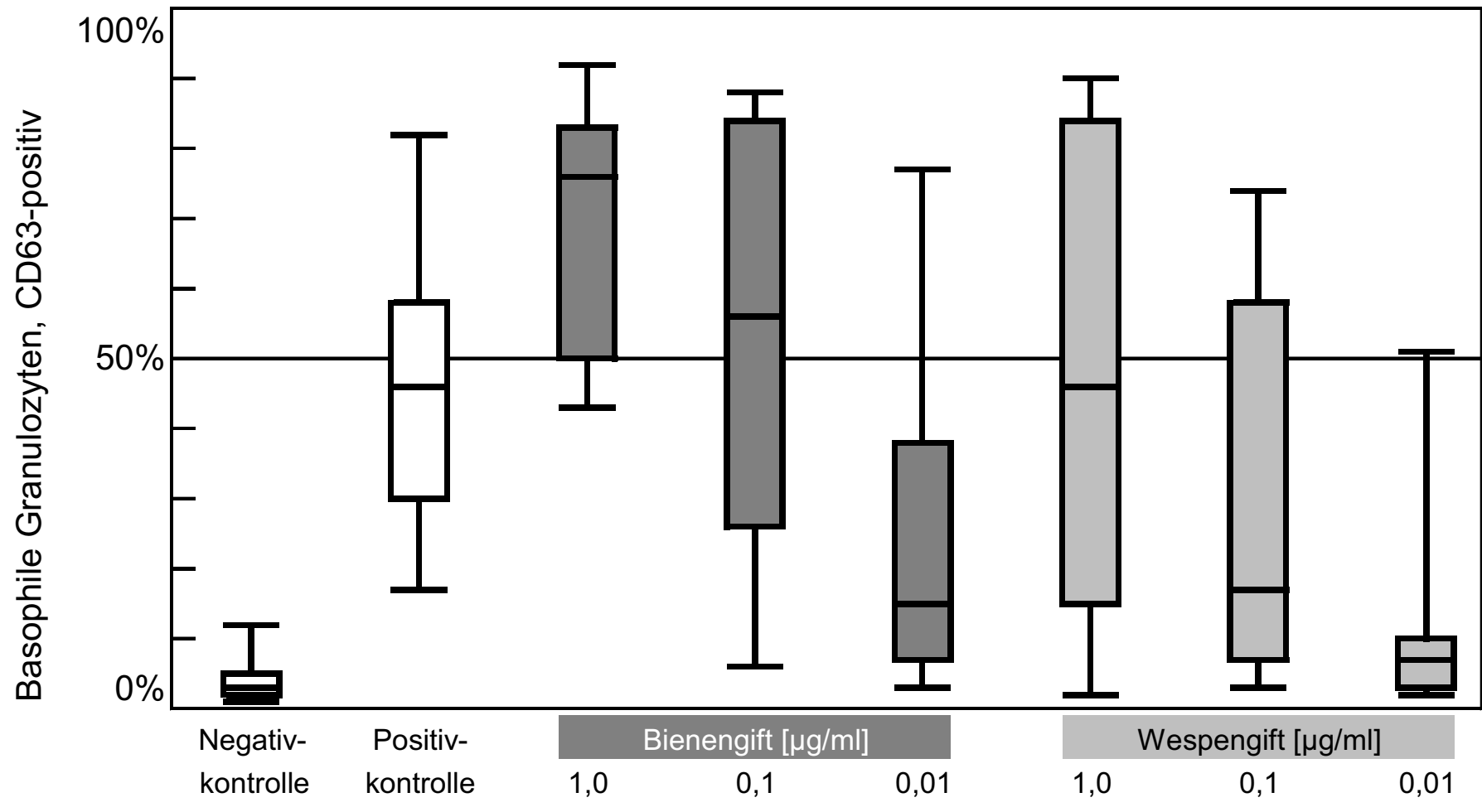


Abb. 3.1 CD63-Expression von basophilen Granulozyten nach Inkubation mit Puffer (= Negativkontrolle), fMLP (=Positivkontrolle) und 3 verschiedenen Bienen- und Wespengiftverdünnungen bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf Bienenstiche in der Anamnese (Median, 25%- und 75%-Perzentile; n=12)

3.2 Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie

3.2.1 Klinische Charakterisierung

Unter den Patienten befanden sich 5 Männer und 1 Frau zwischen 30 und 68 Jahren, die alle in der Anamnese eine systemische anaphylaktische Reaktion auf Bienen- und Wespengift zeigten (Tab. 3.1).

Darunter befanden sich 1 Patient mit einer Reaktion Grad I und 5 Patienten mit einer Reaktion Grad II. Keiner der Patienten zeigte eine Reaktion Grad III.

Bei allen 6 Patienten war der Hauttest sowohl mit Bienen- als auch mit Wespengift positiv. Darüber hinaus zeigten alle Patienten einen positiven RAST gegen Bienen- und Wespengift (Tab. 3.6).

3.2.2 Basophilenaktivierungstest

Die Ergebnisse im Einzelnen sind in Tab. 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6 Ergebnisse des Hauttests, des RAST und des Basophilenaktivierungstests bei Patienten mit anamnestisch belegter anaphylaktischer Reaktion auf Bienen- und Wespengift (s. auch Abb. 3.2)

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST-Klasse	Pos. Kontr. %	Neg. Kontr. %	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
30 ♀/♂ 37J	II	pos./pos.	2/3	67,6	4,9	86,6	52,0	4,4	84,1	88,5	45,9
33 ♂/60J	II	pos./pos.	5/4	40,5	13,4	77,9	69,97	29,19	78,19	83,21	72,80
34 ♀/68J	II	pos./pos.	6/3	27,0	1,8	72,9	85,9	86,8	60,8	5,8	4,1
47 ♂/36J	II	pos./pos.	4/6	30,6	2,9	41,0	4,6	3,1	62,4	49,1	22,1
51 ♂/30J	I	pos./pos.	4/2	78,2	8,6	83,2	65,6	25,4	83,7	59,8	26,3
52 ♂/41J	II	pos./pos.	4/4	32,5	2,6	84,9	80,3	36,7	84,6	53,4	11,4

Positive Ergebnisse sind fett gedruckt

3.2.2.1 Ergebnisse der Testung mit Bienengift

In Tab. 3.7 ist die Verteilung der Basophilenaktivierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Bienengiftverdünnung dargestellt.

Tab. 3.7 Basophilenaktivierung bei Bienen- und Wespengiftallergikern in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Bienengiftverdünnung

Basophilenaktivierung [%]	Bienengiftkonzentration 1,0 µg/ml		Bienengiftkonzentration 0,1 µg/ml		Bienengiftkonzentration 0,01 µg/ml	
	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]
0 – 5			1	16,7	2	33,3
5 – 10						
10 – 15						
15 – 20						
20 – 25					2	33,3
25 – 30						
30 – 35					1	16,7
35 – 40						
40 – 45	1	16,7				
45 – 50						
50 – 55			1	16,7		
55 – 60						
60 – 65						
65 – 70			2	33,3		
70 – 75	1	33,3				
75 – 80	1					
80 – 85	2	50,0	1	33,3		
85 – 90	1		1		1	16,7
90 – 95						
95 – 100						

Bei allen 6 Patienten erbrachte der BAT bei der höchsten eingesetzten Bienengiftkonzentration ein positives Ergebnis. Das entspricht einer Sensitivität von 100%.

Bei der Bienengiftverdünnung 1 (1,0 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 6 Patienten; das entspricht 100% der untersuchten Proben. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 41,0% und 86,6%. Als Median ergab sich ein Wert von 80,5%.

Bei der Bienengiftverdünnung 2 (0,1 µg/ml) fand sich bei 5 Patienten ein positives Ergebnis, was einem Prozentsatz von 83,3 der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten erstreckte sich von 4,6% bis 85,9%. Der Median lag bei 67,8%.

Bei der Bienengiftverdünnung 3 (0,01 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 4 Patienten, was 66,7% der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 3,1% und 86,8%. Als Median ergab sich ein Wert von 27,3%.

3.2.2.2 Ergebnisse der Testung mit Wespengift

Tab. 3.8 zeigt die Verteilung der Basophilenaktivierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Wespengiftverdünnung.

Tab. 3.8 Basophilenaktivierung bei Bienen- und Wespengiftallergikern in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftverdünnung

Basophilenaktivierung [%]	Wespengiftkonzentration 1,0 µg/ml		Wespengiftkonzentration 0,1 µg/ml		Wespengiftkonzentration 0,01 µg/ml	
	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]
0 – 5			1	16,7	1	16,7
5 – 10						
10 – 15					1	16,7
15 – 20						
20 – 25					1	33,3
25 – 30					1	
30 – 35						
35 – 40						
40 – 45						
45 – 50			1	16,7	1	16,7
50 – 55			1	33,3		
55 – 60			1			
60 – 65	2	33,3				
65 – 70						
70 – 75					1	16,7
75 – 80	1	16,7				
80 – 85	3	50,0	1	33,3		
85 – 90			1			
90 – 95						
95 – 100						

Bei allen 6 Patienten führte der Basophilenaktivierungstest bei der höchsten eingesetzten Wespengiftkonzentration zu einem positiven Ergebnis. Das entspricht einer Sensitivität von 100%.

Bei der Wespengiftverdünnung 1 (1,0 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 6 Patienten; das entspricht 100% der untersuchten Proben. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 60,8% und 84,6%. Als Median ergab sich ein Wert von 80,9%.

Bei der Wespengiftverdünnung 2 (0,1 µg/ml) fand sich bei 5 Patienten ein positives Ergebnis, was einem Prozentsatz von 83,3 der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten erstreckte sich von 5,8% bis 88,5%. Der Median lag bei 56,6%.

Bei der Wespengiftverdünnung 3 (0,01 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 4 Patienten, was 66,7% der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 4,1% und 72,8%. Als Median ergab sich ein Wert von 24,2%.

Abb. 3.2 zeigt die durchschnittliche Aktivierung der basophilen Granulozyten im BAT bei Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Giftkonzentration.

Tab. 3.9 bietet einen zusammenfassenden Vergleich der Ergebnisse von Hauttest, RAST und BAT bei dieser Patientengruppe.

Demnach liegt in diesem Patientenkollektiv die Sensitivität des BAT, des RAST und des Hauttests bei jeweils 100%.

Tab. 3.9 Ergebnisse von Hauttest, RAST und BAT bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf Bienen- und Wespenstiche in der Anamnese

Getestetes Allergen	Positiver Hauttest (n)	Giftspezifische IgE-Antikörper (RAST-Klasse: n)							Positiver Basophilenaktivierungstest bei Allergenkonzentrationen von		
		0	1	2	3	4	5	6	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml
Bienengift	6	0	0	1	0	3	1	1	6	5	4
Wespengift	6	0	0	1	2	2	0	1	6	5	4

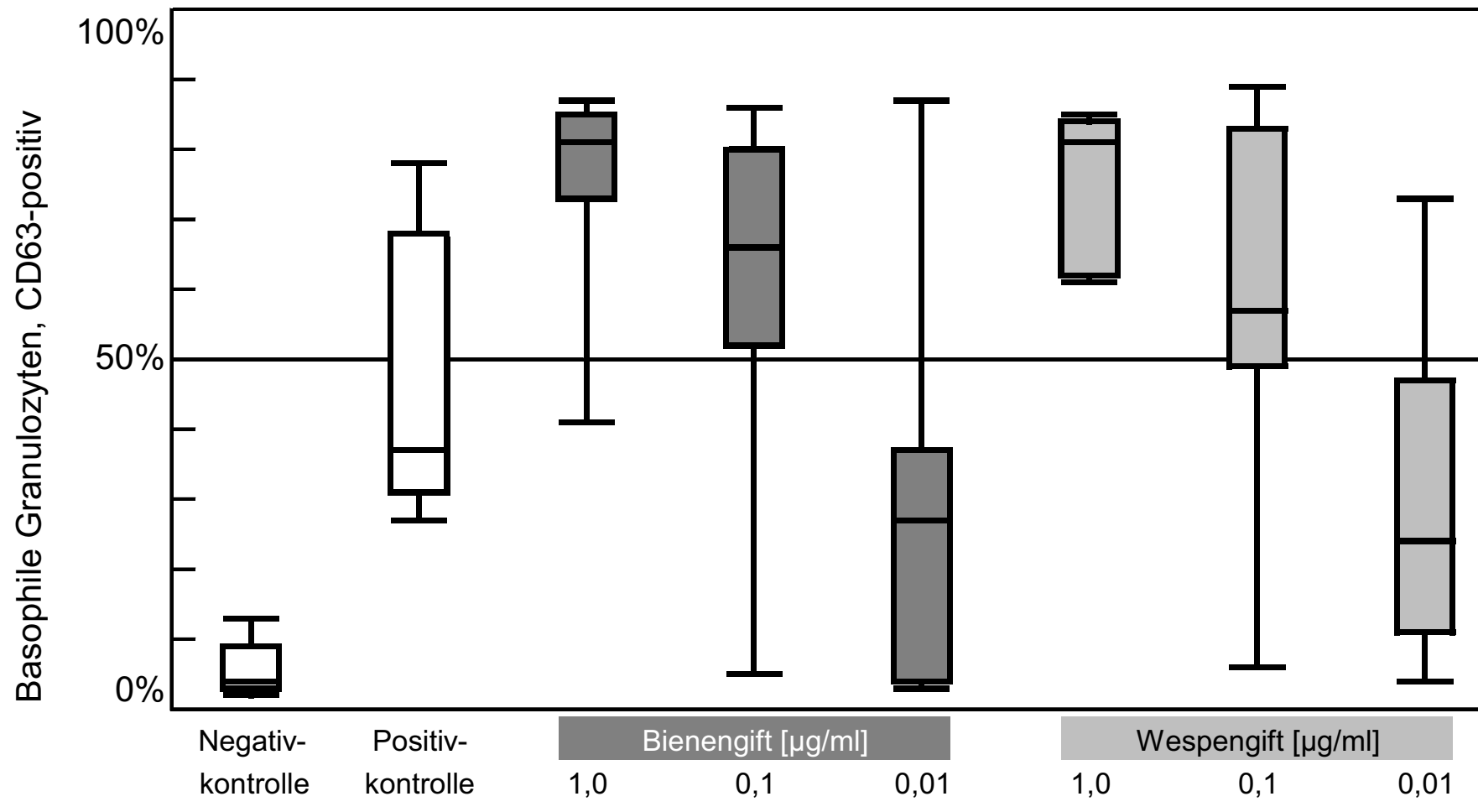


Abb. 3.2 CD63-Expression von basophilen Granulozyten nach Inkubation mit Puffer (= Negativkontrolle), fMLP (=Positivkontrolle) und 3 verschiedenen Bienen- und Wespengiftverdünnungen bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf Bienen- und Wespenstiche in der Anamnese (Median, 25%- und 75%-Perzentile; n=6)

3.3 Patienten mit Wespengiftallergie

3.3.1 Klinische Charakterisierung

Unter den Patienten befanden sich 18 Männer und 21 Frauen zwischen 13 und 79 Jahren. Sie zeigten in der Anamnese alle eine systemische Reaktion auf einen Wespenstich.

Darunter befanden sich 8 Patienten mit einer Reaktion Grad I, 23 Patienten mit einer Reaktion Grad II und 8 Patienten mit einer Reaktion Grad III (Tab. 3.1).

Im Hauttest zeigten 38 Patienten eine positive Reaktion auf Wespengift, bei 12 Patienten war der Hauttest für Bienengift positiv. Bei 38 Patienten waren spezifische IgE-Antikörper gegen Wespengift nachweisbar, bei 21 Personen gegen Bienengift. 37 Patienten zeigten sowohl einen positiven Hauttest auf Wespengift als auch wespengiftspezifische IgE-Antikörper, bei 15 Patienten waren sowohl Hauttest als auch RAST für Bienengift negativ (Tab. 3.10).

3.3.2 Basophilenaktivierungstest

Die Ergebnisse im Einzelnen sind in Tab. 3.10 zusammengefasst.

Tab. 3.10 Ergebnisse des Hauttests, des RAST und des Basophilenaktivierungstests bei Patienten mit anamnestisch belegter anaphylaktischer Reaktion auf Wespengift (s. auch Abb. 3.3)

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST-Klasse	Pos. Kontr. %	Neg. Kontr. %	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
1 ♀/66J	III	neg./pos.	0/2	30,1	2,7	4,6	3,0	4,7	81,0	72,7	7,4
2* ♂/51J	III	pos./pos.	3/2	47,9	7,8	69,0	16,9	6,1	69,6	63,3	6,2
3 ♂/13J	I	neg./pos.	0/3	32,9	5,1	12,2	4,5	5,2	84,3	26,6	5,7
4 ♀/65J	III	neg./pos.	1/3	28,3	5,0	68,8	24,8	6,6	88,4	63,6	5,4
5 ♀/59J	III	neg./pos.	0/1	83,7	9,0	47,7	11,7	10,7	86,9	83,9	35,8
7 ♂/70J	I	neg./pos.	3/2	29,1	13,1	71,3	10,8	19,8	80,6	67,5	22,1
8 ♀/60J	II	neg./pos.	1/3	17,7	16,53	21,9	15,2	6,18	49,5	46,4	14,33

42 3 Ergebnisse

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST- Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
♀/♂ Alter	Grad der system. Reaktion	Biene/ Wespe	Biene/ Wespe	%	%						
9 ♀/38J	II	neg./pos.	0/3	46,1	4,7	7,5	7,8	6,8	75,6	61,7	29,8
10 ♀/42J	II	neg./pos.	2/5	61,4	3,6	19,0	6,8	8,7	29,2	31,8	10,1
13 ♀/51J	II	neg./pos.	0/3	55,7	7,6	11,57	4,1	5,8	52,6	10,3	4,7
14* ♀/13J	II	pos./pos.	3/4	43,8	8,0	69,0	10,9	20,6	76,8	74,8	23,1
15 ♂/49J	II	neg./pos.	2/2	42,6	5,2	87,7	13,4	7,1	91,5	88,6	30,5
16* ♂/36J	II	pos./pos.	3/3	39,4	18,4	27,0	13,9	13,6	46,9	18,9	13,8
17 ♀/58J	II	neg./pos.	0/2	58,8	6,9	13,7	6,7	8,9	52,9	55,1	41,7
18 ♂/70J	II	neg./pos.	3/3	33,7	8,1	23,3	9,7	6,1	61,6	54,9	19,1
19 ♀/31J	II	pos./pos.	0/2	33,8	2,1	46,9	11,0	4,2	86,4	63,8	10,8
20 ♂/37J	I	neg./pos.	3/3	54,0	18,4	54,3	19,0	9,6	57,6	70,7	54,0
21 ♀/42J	II	neg./pos.	0/2	77,1	8,1	25,7	7,3	6,0	86,7	78,5	45,1
22 ♀/48J	II	neg./pos.	0/3	54,9	6,0	19,7	5,6	6,0	5,4	5,9	4,8
23 ♀/26J	II	neg./pos.	2/3	74,8	6,2	33,2	7,9	8,7	95,8	91,6	47,3
24* ♂/34J	I	pos./pos.	2/3	69,2	7,1	75,9	7,5	4,2	86,7	81,2	13,2
26 ♀/79J	I	neg./pos.	2/2	8,8	2,1	7,5	4,3	4,06	36,1	34,3	5,64
27** ♀/45J	II	neg./pos.	2/0	53,3	3,1	5,1	7,3	6,4	77,2	42,3	5,8
28 ♂/41J	II	neg./pos.	0/2	52,0	4,6	9,8	4,5	5,0	87,2	86,7	77,0
29 ♂/56J	III	neg./pos.	0/2	46,9	4,3	24,5	4,7	7,0	95,5	70,6	10,6
31 ♂/29J	II	neg./pos.	3/3	61,1	3,5	63,3	3,9	2,0	92,2	93,7	35,2
36* ♂/42J	II	pos./pos.	3/3	36,8	3,1	82,2	33,4	3,4	83,1	56,7	9,1
37 ♂/27J	I	neg./pos.	0/2	32,6	3,6	5,2	3,7	3,4	61,3	47,1	7,2
38 ♂/14J	II	neg./pos.	0/1	36,59	8,91	11,08	10,12	7,13	78,37	31,33	8,88
40* ♀/45J	III	pos./pos.	2/3	77,0	3,2	11,3	2,9	4,6	96,2	97,0	73,7
41 ♀/43J	I	neg./pos.	4/6	43,2	3,3	72,8	51,2	15,2	93,4	91,6	59,6
42 ♀/68J	II	neg./pos.	0/3	35,5	2,2	7,3	3,3	1,6	85,8	87,9	46,5

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST-Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
♀/♂ Alter	Grad der system. Reaktion	Biene/Wespe	Biene/Wespe	%	%	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
44 ♀/52J	II	neg./pos.	0/1	36,1	4,2	4,6	2,9	3,5	69,1	21,6	3,3
45* ♂/38J	II	pos./pos.	3/3	80,6	3,6	80,2	12,2	2,6	94,0	92,2	27,2
49* ♀/62J	II	pos./pos.	3/4	25,1	2,2	44,6	21,5	11,3	50,9	18,4	1,8
50 ♀/41J	II	neg./pos.	0/6	35,5	2,5	6,3	6,3	4,1	47,4	16,4	14,7
53* ♂/62J	I	pos./pos.	2/3	25,1	3,2	35,6	3,7	3,9	86,0	78,6	60,0
55 ♂/65J	III	pos./neg.	0/2	35,1	5,23	3,52	5,97	2,69	74,79	52,28	9,72
56 ♂/44J	III	pos./pos.	0/4	64,81	3,94	10,88	3,57	3,23	86,2	88,35	65,84

* = RAST und Hauttest für Bienengift positiv

**= RAST für Wespengift negativ (einziger Fall)

Positive Ergebnisse sind fett gedruckt

3.3.2.1 Ergebnisse der Testung mit Bienengift

In Tab. 3.11 ist die Verteilung der Basophilenaktivierung in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Bienengiftverdünnung dargestellt.

Bei der Bienengiftverdünnung 1 (1,0 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 23 Patienten; das entspricht 59,0% der untersuchten Proben. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 3,5% und 87,7%. Als Median ergab sich ein Wert von 23,3%.

Bei der Bienengiftverdünnung 2 (0,1 µg/ml) wurde bei 7 Patienten ein positives Ergebnis erhalten, was einem Prozentsatz von 17,9 der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten erstreckte sich von 2,9% bis 51,2%. Der Median lag bei 7,3%.

Bei der Bienengiftverdünnung 3 (0,01 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 3 Patienten, was 7,7% der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 1,6% und 20,6%. Als Median ergab sich ein Wert von 6,2%.

Tab. 3.11 Basophilenaktivierung bei Patienten mit Wespengiftallergie in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Bienengiftverdünnung

Basophilenaktivierung [%]	Bienengiftkonzentration 1,0 µg/ml		Bienengiftkonzentration 0,1 µg/ml		Bienengiftkonzentration 0,01 µg/ml	
	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]
0–5	3	25,6	13	61,5	16	84,6
5–10	7		11		17	
10–15	6	15,4	8	20,5	3	7,7
15–20	2	5,1	3	7,7	2	5,1
20–25	3	12,8	2	5,1	1	2,6
25–30	2					
30–35	1	5,1	1	2,6		
35–40	1					
40–45	1	7,7				
45–50	2					
50–55	1	2,6	1	2,6		
55–60						
60–65	1	10,3				
65–70	3					
70–75	2	7,7				
75–80	1					
80–85	2	7,7				
85–90	1					
90–95						
95–100						

3.3.2.2 Ergebnisse der Testung mit Wespengift

Tab. 3.12 zeigt die Verteilung der Basophilenaktivierung in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftverdünnung.

Bei 38 von 39 Patienten war das Ergebnis des Basophilenaktivierungstests bei der höchsten eingesetzten Wespengiftkonzentration positiv. Das entspricht einer Sensitivität von 97,4%.

Bei der Wespengiftverdünnung 1 (1,0 µg/ml) zeigte sich ein positives Ergebnis bei 38 Patienten; das entspricht 97,4% der untersuchten Proben. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 5,4% und 96,2%. Als Median ergab sich ein Wert von 80,6%.

Bei der Wespengiftverdünnung 2 (0,1 µg/ml) fand sich bei 37 Patienten ein positives Ergebnis, was einem Prozentsatz von 94,9 der untersuchten Proben

entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten erstreckte sich von 2,9% bis 97,0%. Der Median lag bei 63,6%.

Bei der Wespengiftverdünnung von 0,01 µg/ml zeigte sich ein positives Ergebnis bei 19 Patienten, was 48,7% der untersuchten Proben entspricht. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten lag zwischen 1,8% und 77,0%. Als Median ergab sich ein Wert von 14,7%.

Tab. 3.12 Basophilenaktivierung bei Wespengiftallergikern in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftverdünnung

Basophilenaktivierung [%]	Wespengiftkonzentration 1,0 µg/ml		Wespengiftkonzentration 0,1 µg/ml		Wespengiftkonzentration 0,01 µg/ml	
	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]	Patientenzahl Absolut	[%]
0–5					4	33,3
5–10	1	2,6	1	2,6	9	
10–15			1	2,6	7	17,9
15–20			3	7,7	1	2,6
20–25			1	5,1	2	10,3
25–30	1	2,6	1		2	
30–35			3	7,7	1	7,7
35–40	1	2,6			2	
40–45			1	7,7	1	10,3
45–50	3	7,7	2		3	
50–55	3	10,3	2	10,3	1	7,7
55–60	1		2		2	
60–65	2	10,3	4	12,8	1	5,1
65–70	2		1		1	
70–75	1	12,8	4	15,4	1	5,1
75–80	4		2		1	
80–85	4	33,3	2	15,4		
85–90	9		4			
90–95	4	17,9	4	12,8		
95–100	3		1			

Abb. 3.3 zeigt die durchschnittliche Aktivierung der basophilen Granulozyten im BAT bei Patienten mit anamnestisch belegter Allergie gegen Wespenstiche in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Giftkonzentration.

Tab. 3.13 bietet einen zusammenfassenden Vergleich der Ergebnisse von Hauttest, RAST und Basophilenaktivierungstest bei dieser Patientengruppe.

Demnach liegt die Sensitivität von BAT, RAST und Hauttest bei jeweils 97,4%.

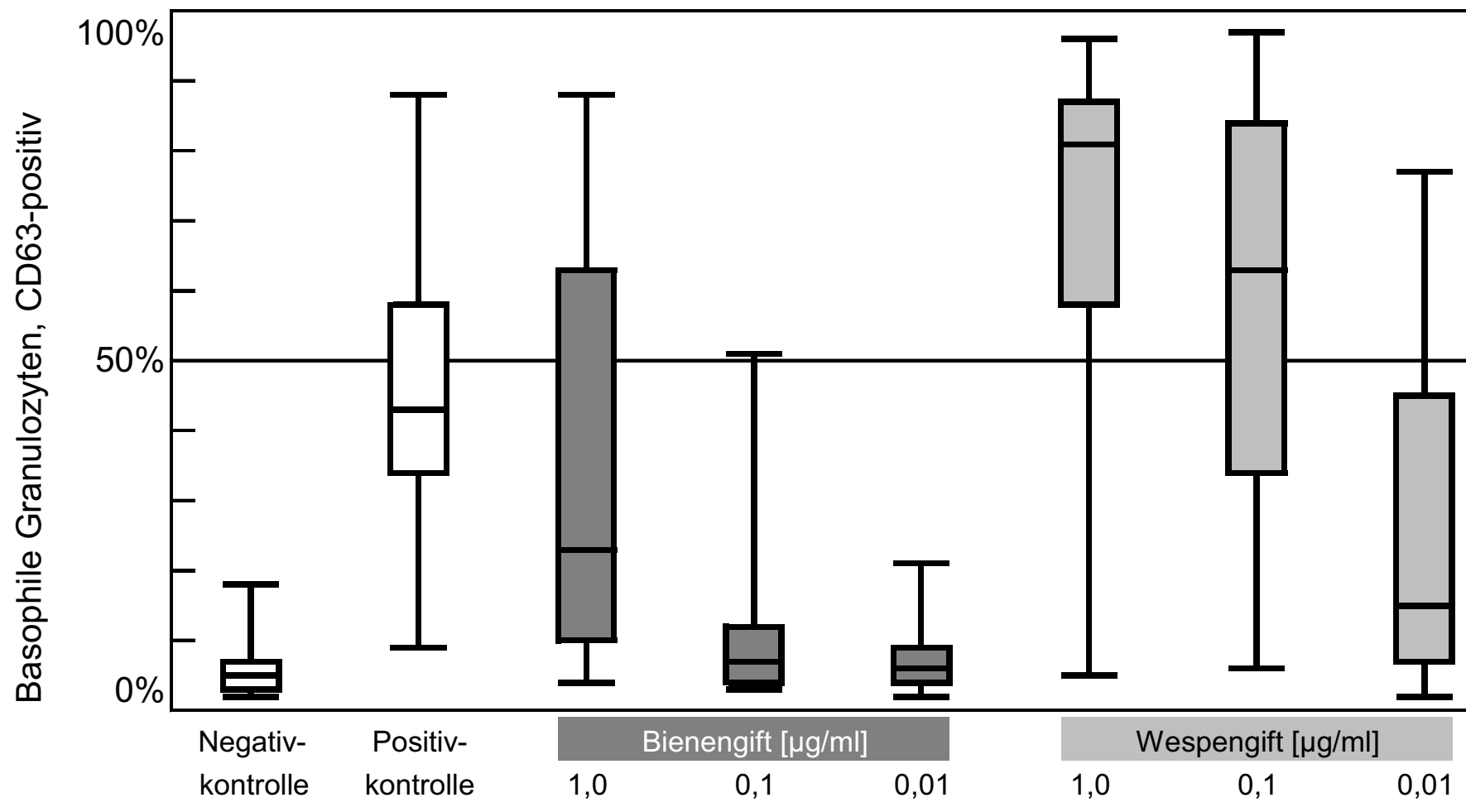


Abb. 3.3 CD63-Expression von basophilen Granulozyten nach Inkubation mit Puffer (= Negativkontrolle), fMLP (=Positivkontrolle) und 3 verschiedenen Bienen- und Wespengiftverdünnungen bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf Wespenstiche in der Anamnese (Median, 25%- und 75%-Perzentile; n=39)

Tab. 3.13 Ergebnisse von Hauttest, RAST und BAT bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf Wespenstiche in der Anamnese

Getestetes Allergen	Positiver Hauttest (n)	Giftspezifische IgE-Antikörper (RAST-Klasse: n)							Positiver Basophilenaktivierungstest bei Allergenkonzentrationen von		
		0	1	2	3	4	5	6	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01µg/ml
Bienengift	12	18	2	8	10	1	0	0	23	7	3
Wespengift	38	1	3	12	17	3	1	2	38	37	19

3.4 Kontrollpersonen ohne Bienen- oder Wespengiftallergie

Unter den 10 Kontrollpersonen befanden sich 5 Frauen und 5 Männer zwischen 32 und 67 Jahren, die in der Anamnese keine systemischen Reaktionen auf Bienen- oder Wespenstiche aufwiesen.

Der RAST für Bienen- und Wespengift war bei allen Kontrollpersonen negativ, ein Hauttest wurde nicht durchgeführt (Tab. 3.1). Die Ergebnisse des BAT sind in Tab. 3.14 zusammengefasst.

Bei keiner Kontrollperson fand sich ein positives Testergebnis. Die Sensitivität beträgt demnach 0%. Die Spezifität von BAT und RAST liegt jeweils bei 100%. Der Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten für Bienengift lag zwischen 1,7% und 13,9%; als Median ergab sich ein Wert von 5,95%. Der Aktivierungsbereich für Wespengift lag zwischen 1,9% und 15,0%; als Median ergab sich ein Wert von 5,9%.

In Abb. 3.4 ist die durchschnittliche Aktivierung der basophilen Granulozyten im BAT bei Personen ohne anamnestisch belegte Allergie gegen Bienen- oder Wespenstiche in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Giftkonzentration dargestellt.

Tab. 3.14 Ergebnisse des Hauttests, des RAST und des Basophilenaktivierungstests bei Personen ohne anamnestiche anaphylaktische Reaktion auf Bienen- und Wespengift und negativem RAST (s. auch Abb. 3.4)

Pers. Nr.	RAST-Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
				1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
1 ♀/37J	0/0	16,7	1,7	1,7	2,3	1,7	1,9	2,7	3,6
2 ♂/62J	0/0	12,4	3,7	3,8	6,8	5,4	12,6	4,6	4,2
3 ♂/32J	0/0	22,0	13,8	9,9	13,9	13,4	14,2	14,0	14,5
4 ♀/33J	0/0	22,8	5,6	13,8	6,5	6,7	15,0	7,6	4,9
5 ♂/52J	0/0	42,1	6,5	8,0	6,9	7,1	13,9	11,5	5,0
6 ♀/52J	0/0	35,8	4,0	3,2	2,7	4,9	4,1	6,1	5,8
7 ♂/52J	0/0	39,4	4,6	7,6	3,0	4,6	5,5	6,0	5,6
8 ♀/60J	0/0	46,0	6,1	5,8	4,2	5,3	7,4	3,8	6,5
9 ♂/67J	0/0	29,6	7,3	6,7	8,3	6,7	7,5	5,3	3,5
10 ♀/37J	0/0	24,7	4,7	6,1	5,1	4,7	7,3	7,2	4,4

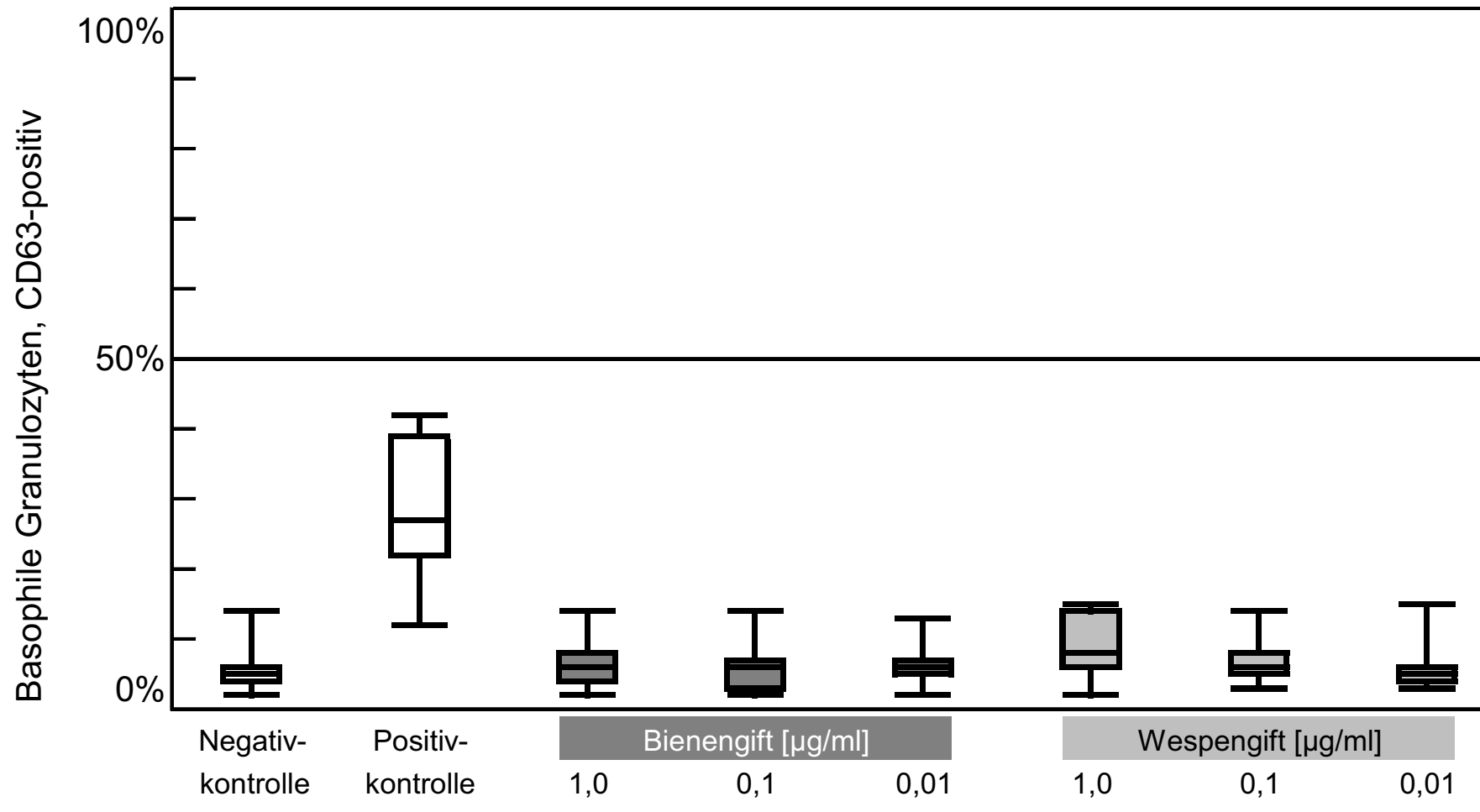


Abb. 3.4 CD63-Expression von basophilen Granulozyten nach Inkubation mit Puffer (= Negativkontr.), fMLP (= Positivkontr.) und je 3 Bienen- und Wespengiftverdünungen bei Kontrollpersonen ohne anaphylaktische Reaktion auf Bienen- oder Wespenstiche in der Anamnese und ohne spezifische IgE-Antikörper (Median, 25%- u. 75%-Perzentile; n=10)

3.5 Berechnung der 0,1/1-Ratio

Wir ermittelten für jeden Patienten die 0,1/1-Ratio in Prozent (vgl. 2.4) und setzten sie in Bezug zum Auftreten von Nebenwirkungen bei der anschließend durchgeführten Immuntherapie. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.15 zusammengefasst.

Tab. 3.15 Zusammenhang zwischen der 0,1/1-Ratio und dem Auftreten von systemischen Nebenwirkungen bei der Hyposensibilisierungstherapie

Pat. Nr.	Anamnese	Bienengift		Wespengift		0,1/1-Ratio (A/B)	Systemische Reaktion bei	
		1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %		VIT	Stichprovokation
1. ♀, 66 J	Wespe III	4,6	3,0	81,0 B	72,7 A	89,75	keine	keine
2. ♂, 51 J	Wespe III	69,0	16,9	69,6 B	63,3 A	90,95	keine	keine
3. ♂, 13 J	Wespe I	12,2	4,5	84,3 B	26,6 A	31,55	keine	keine
4. ♀, 65 J	Wespe III	68,8	24,8	88,4 B	63,6 A	71,95	keine	nicht durchgeführt (n. d.)
5. ♀, 59 J	Wespe III	47,7	11,7	86,9 B	83,9 A	96,54	keine	n. d.
6. ♀, 28 J	Biene III	47,7 B	36,6 A	14,9	13,1	76,73	Grad I	n. d.
7. ♂, 70 J	Wespe I	71,3	10,8	80,6 B	67,5 A	83,75	n. d.	n. d.
8. ♀, 60 J	Wespe II	21,9	15,2	49,5 B	46,4 A	93,74	keine	Grad I
9. ♀, 38 J	Wespe II	7,5	7,8	75,6 B	61,7 A	81,61	keine	keine
10. ♀, 42 J	Wespe II	19,0	6,8	29,2 B	31,8 A	108,90	keine	n. d.
11. ♂, 13 J	Biene II	85,6 B	74,1 A	90,4	65,9	86,56	Grad I	n. d.
12. ♀, 37 J	Biene III	78,6 B	76,3 A	14,8	4,3	97,07	nur lokal	n. d.
13. ♀, 51 J	Wespe II	11,5	4,1	52,6 B	10,3 A	19,58	keine	keine
14. ♀, 13 J	Wespe II	69,0	10,9	76,8 B	74,8 A	97,39	keine	n. d.
15. ♂, 49 J	Wespe II	87,7	13,4	91,5 B	88,6 A	96,83	keine	n. d.
16. ♂, 36 J	Wespe II	27,0	13,9	46,9 B	18,9 A	40,29	keine	n. d.
17. ♀, 58 J	Wespe II	13,7	6,7	52,9 B	55,1 A	104,16	keine	n. d.
18. ♂, 70 J	Wespe II	23,3	9,7	61,6 B	54,9 A	89,12	keine	n. d.

3.5 Berechnung der 0,1/1-Ratio 51

Pat. Nr.	Anamnese	Bienengift		Wespengift		0,1/1-Ratio (A/B)	Systemische Reaktion bei	
		Alter	Insekt/ Klin. Grad	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %		1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %
19. ♀, 31 J	Wespe II	46,9	11,0	86,4 B	63,8 A	73,84	keine	n. d.
20. ♂, 37 J	Wespe I	54,3	19,0	57,6 B	70,7 A	122,74	keine	n. d.
21. ♀, 42 J	Wespe II	25,7	7,3	86,7 B	78,5 A	90,54	Grad II	n. d.
22. ♀, 48 J	Wespe II	19,7	5,6	5,4 B	5,9 A	(109,26)	keine	n. d.
23. ♀, 26 J	Wespe II	33,2	7,9	95,8 B	91,6 A	95,62	n. d.	n. d.
24. ♂, 34 J	Wespe I	75,9	7,5	86,7 B	81,2 A	93,66	keine	n. d.
25. ♀, 36 J	Biene I	72,8 B	7,0 A	81,9	19,9	9,61	keine	n. d.
26. ♀, 79 J	Wespe I	7,5	4,3	36,1 B	34,3 A	95,01	n. d.	n. d.
27. ♀, 45 J	Wespe II	5,1	7,3	77,2 B	42,3 A	54,79	keine	keine
28. ♂, 41 J	Wespe II	9,8	4,5	87,2 B	86,7 A	99,43	keine	keine
29. ♂, 56 J	Wespe III	24,5	4,7	95,5 B	70,6 A	73,93	keine	n. d.
30. ♂, 37 J	Biene und Wespe II	86,6 B	52,0 A	84,1 B	88,5 A	B: 60,05 W:105,23	keine	n. d.
31. ♂, 29 J	Wespe II	63,3	3,9	92,2 B	93,7 A	101,63	Grad I	n. d.
32. ♂, 68 J	Biene II	79,8 B	84,9 A	85,9	53,8	106,39	Grad I	keine
33. ♂, 60 J	Biene und Wespe II	77,9 B	69,97 A	78,19 B	83,21 A	B: 89,92 W: 106,42	keine Angabe (k. A.)	k. A.
34. ♀, 68 J	Biene und Wespe II	72,9 B	85,9 A	60,8 B	5,8 A	B: 117,83 W: 9,54	Grad I (Biene)	n. d.
35. ♂, 63 J	Biene II	77,9 B	56,0 A	81,9	74,2	71,89	keine	n. d.
36. ♂, 42 J	Wespe II	82,2	33,4	83,1 B	56,7 A	68,23	keine	keine
37. ♂, 27 J	Wespe I	5,2	3,7	61,3 B	47,1 A	76,84	k. A.	k. A.
38. ♂, 14 J	Wespe II	11,08	10,12	78,37 B	31,33 A	39,98	keine	n. d.
39. ♀, 42 J	Biene II	45,5 B	31,4 A	9,2	7,6	69,01	Grad I	n. d.
40. ♀, 45 J	Wespe III	11,3	2,9	96,2 B	97,0 A	100,83	keine	n. d.
41. ♀, 43 J	Wespe I	72,8	51,2	93,4 B	91,6 A	98,07	keine	n. d.
42. ♀, 68 J	Wespe II	7,3	3,3	85,8 B	87,9 A	102,45	keine	n. d.
43. ♀, 57 J	Biene II	43,6 B	22,2 A	2,2	2,9	50,92	keine	n. d.
44. ♀, 52 J	Wespe II	4,6	2,9	69,1 B	21,6 A	31,26	keine	n.d.
45. ♂, 38 J	Wespe II	80,2	12,2	94,0 B	92,2 A	98,09	keine	n. d.

52 3 Ergebnisse

Pat. Nr.	Anamnese	Bienengift		Wespengift		0,1/1-Ratio (A/B)	Systemische Reaktion bei	
		1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %		VIT	Stichprovokation
♀/♂ Alter	Insekt/ Klin. Grad	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,1/1,0 µg/ml %	VIT	Stichprovokation
46. ♂, 10 J	Biene II	53,9 B	11,3 A	19,9	9,5	20,96	keine	n. d.
47. ♂, 36 J	Biene und Wespe II	41,0 B	4,6 A	62,4 B	49,1 A	B: 11,22 W: 78,69	keine	n. d.
48. ♀, 28 J	Biene II	90,6 B	88,3 A	20,0	3,8	97,46	Grad I	keine
49. ♀, 62 J	Wespe II	44,6	21,5	50,9 B	18,4 A	36,15	keine	keine
50. ♀, 41 J	Wespe II	6,3	6,3	47,4 B	16,4 A	34,59	keine	n. d.
51. ♂, 30 J	Biene und Wespe I	83,2 B	65,6 A	83,7 B	59,8 A	B: 78,85 W: 71,45	Grad I (Biene)	n. d.
52. ♂, 41 J	Biene und Wespe II	84,9 B	80,3 A	84,6 B	53,4 A	B: 94,58 W: 63,12	keine	n. d.
53. ♂, 62 J	Wespe I	35,6	3,7	86,0 B	78,6 A	91,39	keine	n. d.
54. ♂, 70 J	Biene III	51,5 B	57,0 A	71,9	33,4	110,68	keine	n. d.
55. ♂, 65 J	Wespe III	3,52	5,97	74,79 B	52,28 A	69,90	keine	n. d.
56. ♂, 44 J	Wespe III	10,88	3,57	86,2 B	88,35 A	102,49	keine	n. d.
57. ♂, 48 J	Biene I	92,4 B	85,2 A	87,7	61,3	92,21	keine	n. d.

52 Patienten unterzogen sich einer Hyposensibilisierungstherapie, davon traten bei 8 Patienten systemische Nebenwirkungen Grad I auf und bei 1 Patienten vom Grad II. 1 Patient zeigte keine Nebenwirkungen bei der Immuntherapie, aber Reaktionen Grad I bei der Stichprovokation.

Während bei der Studie von Kosnik et al. [69] alle Patienten mit einer 0,1/1-Ratio über 92% mit Nebenwirkungen bei der Immuntherapie reagierten, zeigten in der vorliegenden Arbeit 5 von 10 Patienten mit Nebenwirkungen eine 0,1/1-Ratio unter 92% und 5 über 92% (der Mittelwert liegt bei 81,8%). Darüber hinaus wurde für 19 von 42 Patienten ohne Nebenwirkungen ebenfalls eine 0,1/1-Ratio von über 92% ermittelt (höchster Wert: 110,7%), so dass aufgrund der vorliegenden Daten kein Zusammenhang zwischen der Höhe der 0,1/1-Ratio und dem Auftreten oder dem Schweregrad der Nebenwirkungen bei der Hyposensibilisierungstherapie zu erkennen war.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die allergeninduzierte Aktivierung basophiler Granulozyten durch Bienen- und Wespengift mittels flowzytometrischer Messung der Expressierung des Oberflächenmarkers CD63 untersucht (Basotest®), ein Verfahren, das 1991 erstmals publiziert wurde. Zum Einsatz kommen dabei auch zwei mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte monoklonale Antikörper, anti-IgE-PE und anti-gp53-FITC, wie in der Literatur beschrieben [67].

Bei CD63 handelt es sich um ein Glykoprotein von 53kDA, das in der Lysosomenmembran von basophilen Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen u. a. lokalisiert ist. Es besitzt eine Länge von 238 Aminosäuren, 4 transmembrane, hydrophobe Regionen und 3 Bindungsstellen für N-gebundene Glykosylierungen [81].

Nach Stimulierung der Zellen durch Allergen, fMLP oder anti-IgE gelangt CD63 durch Fusion der Lysosomenmembran mit der Plasmamembran in hoher Dichte auf die Zelloberfläche, was zur Freisetzung verschiedener präformierter oder neu gebildeter Mediatorssubstanzen führt. Die genaue biologische Funktion von CD63 ist bisher nicht bekannt; eventuell schützt die hoch glykosylierte Domäne im Inneren der Lysosomen die Granulamembran vor enzymatischer Verdauung [67].

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass es sich beim Basophilenaktivierungstest mit der Expression von CD63 als Oberflächenmarker um einen sensitiven und spezifischen In-vitro-Test bei der Diagnose einer Allergie gegen Bienen- oder Wespengift handelt:

Im Basophilenaktivierungstest erhielt man für das jeweilige allergieauslösende Insekt in 97,4% bis 100% der Fälle ein positives Testergebnis, im RAST in 91,7% bis 100% der Fälle. Im Hauttest zeigte sich in 97,4% bis 100% der Fälle eine positive Reaktion in Bezug auf das allergieauslösende Insekt. Die durchgeführten Kontrollen bei Personen ohne allergische Reaktionen auf Hymenoptergift in der Anamnese waren negativ. Daraus ergibt sich für den Basophilenaktivierungstest je nach Patientengruppe eine Sensitivität zwischen 97,4% und 100% (Bienengift: 100%, Bienen- und Wespengift: 100%, Wespengift: 97,4%) für das jeweilige anamnestisch angegebenen Hymenoptergift und eine Spezifität von 100%. Die Sensitivität des RAST lag zwischen 91,7% und 100% (Bienengift: 91,7%, Bienen- und Wespengift: 100%, Wespengift: 97,4%), die Spezifität lag hier wie beim BAT ebenfalls bei 100%, während in einer andere Studie niedrigere Werte für den RAST (66,7%) ermittelt wurden [138]. Für den Hauttest ergab sich eine Sensitivität zwischen 97,4% und 100% (Bienengift: 100%, Bienen- und Wespengift: 100%,

Wespengift: 97,4%). Die Spezifität wurde nicht bestimmt, da bei den Kontrollpersonen kein Hauttest durchgeführt wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Sensitivität des Basophilenaktivierungstests korrelieren gut mit den Daten, die bereits in anderen Studien erhoben worden sind.

Erdmann et al. [39] untersuchten 50 Patienten mit einer systemischen Reaktion auf einen Wespenstich in der Anamnese sowie 20 Kontrollpersonen und verglichen die Ergebnisse des BAT mit denen von Intrakutantest und RAST. Dabei erhielten sie im BAT, den sie mit jeweils zwei Bienen- und Wespengiftverdünnungen durchführten (1 µg/ml; 0,1 µg/ml), bei 46 der 50 Patienten mit Wespengiftallergie ein positives Ergebnis (>15% Aktivierung) für die Testung mit Wespengift, was einer Sensitivität von 92% entspricht. Die Messung der allergenspezifischen IgE gegen Wespengift hingegen ergab lediglich bei 38 der 50 Patienten ein positives Ergebnis, so daß die Sensitivität des RAST bei 76% lag. Der Intrakutantest mit Wespengift war bei allen Patienten positiv und die Sensitivität betrug somit 100%.

4 der 20 Kontrollpersonen zeigten einen positiven BAT bei der Testung mit Wespengift, was einer Spezifität von 80% entspricht. Im RAST waren 3 der 20 Personen sensibilisiert gegen Wespengift, die Spezifität betrug somit 85%.

Vergleichbare Daten für Patienten mit Bienengiftallergie oder Bienen- und Wespengiftallergie, die mit demselben Testsystem ermittelt wurden, stehen leider nicht zur Verfügung.

Diese Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen einer Kohortenstudie der allgemeinen Bevölkerung überein. Bei dieser Untersuchung wurden bei 27,1% der getesteten Sera spezifische IgE-Antikörper gegen Hymenoptergift gefunden, wobei allerdings nur 7,1% dieser Probanden über systemische anaphylaktische Reaktionen in der Anamnese berichteten [125]. In der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Probanden als Kontrollpersonen ausgewählt, bei denen keine spezifischen IgE-Antikörper gegen Hymenoptergift im RAST nachweisbar waren und die keine allergischen Reaktionen gegen Hymenopterenstiche in der Anamnese aufwiesen. Bei diesen Personen war der Basophilenaktivierungstest gegen Bienen- und Wespengift jeweils negativ.

In einer weiteren Studie von Sainté-Laudy et al. [118] wurden nicht nur Patienten mit systemischen Reaktionen auf Hymenopterenstiche getestet, sondern auch Patienten mit lokalen Reaktionen einbezogen.

Sainté-Laudy et al. führten den Basophilenaktivierungstest bei 45 Patienten durch, von denen 11 über eine lokale Reaktion nach dem Stichereignis berichteten, 25 über systemische Reaktionen und 9 über einen anaphylaktischen Schock. Sie ermittelten für den BAT sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von jeweils 100%, wobei allerdings, anders als in der vorliegenden Arbeit, bereits eine Basophilenaktivierung >5% als positives Ergebnis gewertet wurde. Alle 10 Kontrollpersonen wurden negativ getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen vor Allergenzugabe mit einem Stimulationspuffer präinkubiert, der Interleukin-3 enthielt.

Interleukin-3 gehört zur Gruppe der Cytokine, die eine bedeutende Rolle bei Entzündungsprozessen und Überempfindlichkeitsreaktionen spielen. IL-3 ist ein Wachstumsfaktor der Hämatopoese, der die Sensitivität der basophilen Granulozyten erhöht, indem er den Degranulationsprozess der Zellen (und damit die CD63-Expression auf der Zelloberfläche) sowie die Freisetzung von präformierten (Histamin) und neu synthetisierten Mediatoren (Sulfolipidmediatoren) fördert. Zusätzlich beeinflusst eine Präinkubation der Zellen mit IL-3 die Mediatorzusammensetzung und erhöht die freigesetzte Mediatormenge. Es wird vermutet, dass IL-3 die Signalübertragung in den basophilen Granulozyten durch die Bildung eines bisher nicht bekannten second messengers beeinflusst, der relativ schnell gebildet wird und lange Zeit stabil bleibt [70].

Sturm et al. [138] führten den BAT bei 57 Patienten ohne vorherige Inkubation der Zellen mit IL-3 durch (23 Bienengiftallergiker, 34 Wespengiftallergiker, 30 Kontrollpersonen) und erhielten bei 91,3% der Proben positive Ergebnisse für Bienengift und bei 85,3% der Proben für Wespengift, so dass sich für den BAT eine Sensitivität von 91,3% für Bienengift und 85,3% für Wespengift ergab, für den RAST von 95,7% für Bienengift und 88,2% für Wespengift und für den Intrakutantest von 95,7% für Bienengift sowie 91,2% für Wespengift. Die Spezifität betrug für den BAT 90% (Bienengift) bzw. 83,3% (Wespengift) und für den RAST 70% (Bienengift) bzw. 63,3% (Wespengift). Sie konnten bei ihren Versuchen ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Grad der Basophilenaktivierung und der Schwere der klinischen Symptome in der Anamnese feststellen. In Tab. 4.1 sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die Ergebnisse von Erdmann et al. [39] und Sainté-Laudy et al. denen von Sturm et al. [138] gegenübergestellt.

Die Ergebnisse dieser Studien sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass positive Reaktionen im BAT die Sensibilisierung gegen das entsprechende Hymenoptergift wiedergeben (bestätigt und ergänzt durch die Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper und den Hauttest), wobei allerdings kein Zusammenhang mit dem Schweregrad der systemischen anaphylaktischen Reaktion in der Anamnese besteht.

Ebenso kann man, anders als bei der Studie von Kosnik et al. [69], aus den vorliegenden Daten nicht auf einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Basophilenaktivierung im BAT und dem Risiko für das Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen bei der Durchführung einer Hyposensibilisierungstherapie schließen.

Tab. 4.1 Sensitivität und Spezifität des Basophilenaktivierungstests mit und ohne Präinkubation der Zellen mit Interleukin-3

	BAT mit IL-3- Präinkubation			BAT ohne IL-3-Präinkubation [138]	
	Biene	Biene/Wespe	Wespe	Biene	Wespe
Sensitivität					
Eigene Daten	100%	100%	97,4%	91,3%	85,3%
[39]*	-	-	92%		
[118]**	100%				
Spezifität					
Eigene Daten	100%	100%	100%	90,0%	83,3%
[39]*	-	-	80%		
[118]**	100%				

* Es wurden nur Patienten mit systemischen Reaktionen auf Wespenstiche untersucht

** Es wurden für Patienten mit systemischen Reaktionen auf Bienen-, Wespen- und Hornissenstiche eine gemeinsame Sensitivität und Spezifität ermittelt

Kosnik et al. untersuchten 34 Patienten mit systemischen anaphylaktischen Reaktionen in der Anamnese. Bei 12 der Patienten traten bei Durchführung der Immuntherapie erneut systemische Reaktionen auf, bei 22 Patienten nicht. Kosnik et al. ermittelten zunächst den Quotienten aus dem Grad der Basophilenaktivierung nach Stimulation mit Allergenen der Konzentrationen 0,1 und 1,0 µg/ml (0,1/1-Ratio in Prozent) für jeden Patienten und setzten diese 0,1/1-Ratio in Bezug zu den aufgetretenen systemischen Reaktionen während der Immuntherapie. Dabei erhielten sie in der Gruppe der Patienten mit Nebenwirkungen bei der VIT bei 8 von 12 Patienten ein 0,1/1-Verhältnis von mehr als 92%, während dieses Verhältnis bei den 22 Patienten ohne Nebenwirkungen in der Therapie unter 92% lag. Daraus folgerten sie, dass eine erhöhte Aktivierung der basophilen Granulozyten im BAT einen Hinweis auf ein erhöhtes Risiko für systemische Nebenwirkungen bei der Immuntherapie liefert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Theorie nicht (vgl. Tab. 3.15). Von den 52 Patienten, die sich einer Hyposensibilisierungstherapie unterzogen, reagierten 10 Patienten mit systemischen Nebenwirkungen, wobei die 0,1/1-Ratios dieser 10 Patienten sich nicht von denen der Patienten unterschieden, die keine Nebenwirkungen zeigten. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der 0,1/1-Ratio im BAT und systemischen Nebenwirkungen bei der Immuntherapie ist auf Grund der hier gewonnenen Daten demnach nicht festzustellen. Einen Vergleich der Ergebnisse mit denen von Kosnik et al. liefern die Abb. 4.1a und b.

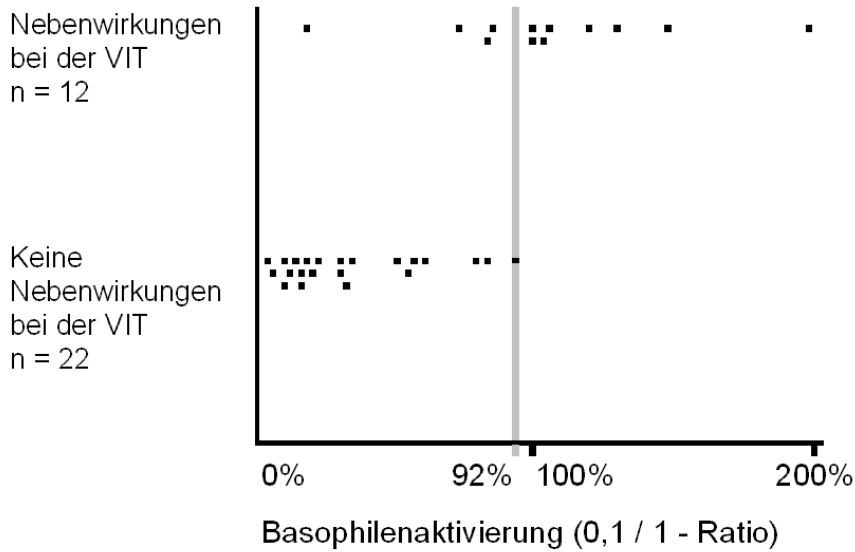


Abb. 4.1a

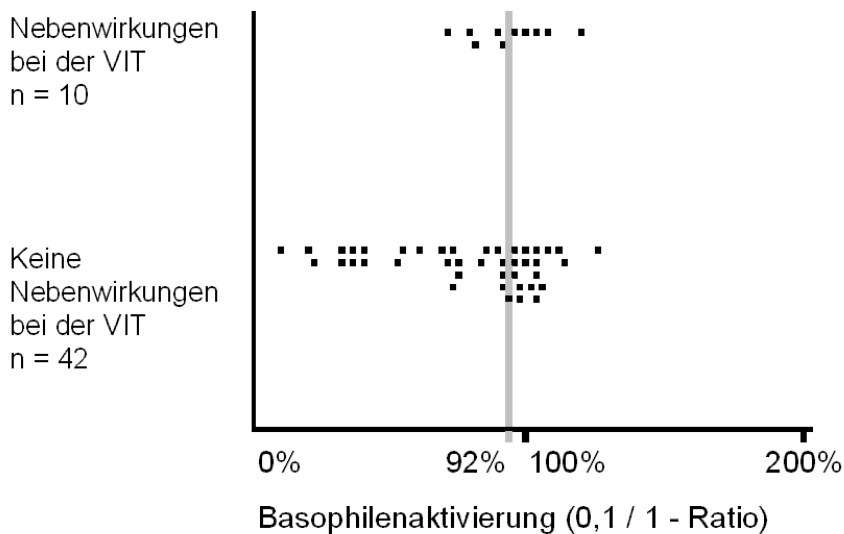


Abb. 4.1b

Abb. 4.1 Aktivierungsgrad der basophilen Granulozyten, ermittelt im BAT mit den Giftverdünnungen 0,1 und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0,1/1-Ratio) bei Patienten mit und ohne Nebenwirkungen während der Immuntherapie (VIT)

- Ergebnisse von Kosnik et al. [69]; die vertikale Linie markiert den höchsten Wert der 0,1/1-Ratio bei Patienten ohne Nebenwirkungen bei der Immuntherapie
- Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Dieses Ergebnis wird ergänzt durch die Tatsache, dass der Basophilenaktivierungstest keine Alternative zur Stichprovokation darstellt, um den Erfolg einer durchgeführten Immuntherapie zu kontrollieren: Die CD63-Expression aktivierter basophiler Granulozyten stieg unmittelbar nach Beendigung der Immuntherapie im Vergleich zum Wert vor Therapiebeginn etwas an und nahm eine Woche nach Beendigung der Therapie nicht wesentlich ab [134]. Auch nach 6monatiger spezifischer Immuntherapie sank die CD63-Expression nicht nennenswert ab [39, 43], so dass eine Aussage über den Schutz vor schwerwiegenden systemischen Reaktion bei einem erneuten Stichereignis nicht getroffen werden kann.

Bereits vor Einführung des Basophilenaktivierungstest wurden nach Stimulierung mit Antigen verschiedene andere In-vitro-Testverfahren durchgeführt, wie z. B. der Histamin-Freisetzungstest (BHR = Basophil Histamine Release; HRT = Histamine Release Test) oder der Leukotrien-Freisetzungstest (CAST = Cellular Antigen Stimulation Test; LRT = Leukotriene Release Test) aus Vollblut oder peripheren Blut-Leukozyten [53, 76, 80, 92, 101, 136].

Der Histamin-Freisetzungstest, der bereits in den 70er Jahren von der Gruppe um Lichtenstein et al. [136] verwendet wurde, bedient sich der Tatsache, dass Histamin als präformierte Mediators substanz in IgE-Rezeptor tragenden Zellen, wie z. B. basophilen Granulozyten, vorhanden ist und nach Allergenstimulation freigesetzt wird. Der Test kann mit Vollblut oder mit gewaschenen peripheren Leukozyten durchgeführt werden. Dazu wird das Blut mit verschiedenen Allergenkonzentrationen versetzt, inkubiert und das freigesetzte Histamin im Überstand mittels RIA oder ELISA gemessen. Anschließend werden die ermittelten Werte zur spontanen Histaminfreisetzung (Leerprobe; durch Pufferzusatz) und zum Gesamthistamingehalt (100%-Kontrolle; z. B. durch Erhitzen der Zellen auf 100°C) als Prozentsatz des Gesamthistamingehalts in Beziehung gesetzt, wobei ein Wert über 10% als positiv angesehen wird. Als Positivkontrolle dienen Proben, die mit anti-IgE versetzt wurden [33, 35, 76, 101]. Ein Problem dieses In-vitro-Tests liegt allerdings in der Tatsache, dass seine Durchführung sehr zeitaufwändig und mit hohem labortechnischem Aufwand und Kosten verbunden ist.

Maly et al. [76] führten den Histamin-Freisetzungstest unter Verwendung von Vollblut an 23 Patienten mit Hymenopteregiftallergie und 10 Kontrollpersonen durch, Przybilla et al. [101] an 181 Patienten und 18 Kontrollpersonen unter Verwendung von peripheren Blut-Leukozyten. Sie ermittelten dabei für den Histamin-Freisetzungstest eine Sensitivität bezüglich der Insektengiftallergie für Bienengift zwischen 63% und 82% und für Wespengift zwischen 50% und 68%.

Der Leukotrien-Freisetzungstest oder Cellular Antigen Stimulation Test (CAST) wurde 1993 von de Weck et al. in die Allergie-Diagnostik eingeführt. Dabei werden Blutleukozyten nach „Priming“ mit einem Interleukin-3 enthaltendem

Stimulationspuffer mit verschiedenen Allergenverdünnungen versetzt und inkubiert. Anschließend wird die Menge der nach Allergenstimulation neu gebildeten Sulfido-Leukotriene (LTC₄, LTD₄ und LTE₄) in einem kommerziell verfügbaren Test, dem CAST-ELISA, gemessen. Als Positivkontrolle dienen Proben, die mit anti-IgE versetzt wurden, als Negativkontrolle Proben mit Pufferlösung [33, 35, 76, 82].

Eberlein-König et al. [33] sowie Maly et al. [76] ermittelten unter Anwendung des CAST für Bienengift eine Sensitivität zwischen 73% und 100% und für Wespengift zwischen 68% und 83%.

Ebenso wie der Basophilen-Aktivierungstest sind auch BHR und CAST nicht geeignet, um den Erfolg einer Immuntherapie zu kontrollieren oder mögliche systemische Reaktionen bei einem erneuten Stichereignis vorherzusagen [14, 33, 34, 141].

Vergleicht man nun Histamin- und Leukotrien-Freisetzungstest mit dem Basophilenaktivierungstest, so ergibt die Studie von Lambert et al. [71] eine Konkordanz von 85,7% zwischen dem BAT mit CD63 als Marker und der Histamin-Freisetzung. Die Studie von Eberlein-König et al. [35] ermittelt eine Konkordanz von 64,3% zwischen BAT und Histamin-Freisetzung und von 78,6% zwischen BAT und CAST. Der BAT zeigt außerdem im Vergleich zur Histamin-Freisetzung bessere Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Spezifität und verglichen mit dem Leukotrien-Freisetzungstest zumindest bessere Ergebnisse in Bezug auf die Spezifität [35, 37, 39, 76, 101, 118, 138]. Vermutlich liegt in dieser Tatsache der Hauptvorteil des Basophilenaktivierungstests als zusätzliches Testverfahren bei der Diagnosestellung einer IgE-vermittelten Allergie gegen Insektengift. Einen Vergleich der In-vitro-Testverfahren bezüglich Sensitivität und Spezifität bietet die Tab. 4.2.

Der BAT ist besonders in jenen Fällen einer Hymenopterenengiftallergie hilfreich, in denen Anamnese, Hauttest und Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper zu keinem eindeutigen Ergebnis führen und eine klare Entscheidung für das relevante Hymenopterenengift, mit dem eine Hyposensibilisierung durchgeführt werden soll, nicht getroffen werden kann.

In einigen Fällen konnte nur mit Hilfe des Basophilenaktivierungstests eine Sensibilisierung gegen Hymenopterenengift nachgewiesen werden und so die Entscheidung für das geeignete Insektengift zur Hyposensibilisierungstherapie getroffen werden [14, 36, 43].

Tab. 4.2 Vergleich von Sensitivität und Spezifität verschiedener In-vitro-Testverfahren (Basophilenaktivierungstest, Histamin-Freisetzungstest, Leukotrien-Freisetzungstest) bei der Diagnose der Hymenoptereingiftallergie

	BAT mit IL-3-Präinkubation			BHR (HRT) [76, 101, 118]		CAST (LRT) [33, 76, 118] mit IL-3- Präinkubation	
	Biene	Biene/Wespe	Wespe	Biene	Wespe	Biene	Wespe
Sensitivität				62,5 bis 82%	50 bis 68%	73 bis 100%	68 bis 83%
Eigene Daten [39]*	100%	100%	97,4%				
[118]**	-	-	92%				
	100%						
Spezifität				44% bis 94%	60% bis 83%	77% [76]	100% [76]
Eigene Daten [39]*	100%	100%	100%				
[118]**	-	-	80%				
	100%						

* Es wurden nur Patienten mit systemischen Reaktionen auf Wespenstiche untersucht

** Es wurde für Patienten mit systemischen Reaktionen auf Bienen-, Wespen- und Hornissenstiche eine gemeinsame Sensitivität und Spezifität ermittelt

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenso wie bereits andere Studien, dass die Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift, die bei etwa 30% der Patienten mit Hymenoptereingiftallergie durch den Nachweis spezifischer IgE-Antikörper belegt wurde, ein Problem darstellt [88, 137]. In der Gruppe der Patienten mit Bienengiftallergie zeigten 8 von 12 Patienten im BAT auch eine positive Reaktion auf Wespengift und besaßen bis auf einen Fall auch spezifische IgE-Ak gegen Wespengift. Bei den Patienten mit Wespengiftallergie zeigten 18 von 39 Patienten auch einen positiven BAT gegen Bienengift bei ebenfalls positivem RAST. 5 Patienten zeigten spezifische Antikörper gegen Bienengift, aber einen negativen BAT.

Hier scheint der BAT alleine kein geeignetes Verfahren zu sein, um Patienten mit Kreuzreaktivität zu identifizieren. Dazu sind zusätzliche, weiterführende Informationen, wie z. B. der RAST-Inhibitionstest oder der Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen Bromelain, notwendig.

Die drei gewählten Allergenverdünnungsstufen (1,0 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 mg/ml) erwiesen sich im BAT bei Hymenoptereingiftallergie als optimale Testkonzentrationen. Eine höhere Allergenkonzentration führte bei Allergiepazienten in der Regel auch zu einer höheren Aktivierung der basophilen

Granulozyten, ohne dass falsch positive Ergebnisse, die oft aufgrund unspezifischer Effekte bei zu hohen Konzentrationen auftreten können [138], z. B. bei Kontrollpersonen, zu beobachten waren.

Neben der Hymenopterenengiftallergie gibt es noch verschiedene andere Allergien, bei deren Diagnostik der Basophilenaktivierungstest eingesetzt werden kann, z. B. bei Allergien gegen Latex, Pollen, Hausstaubmilben, Medikamente und Nahrungsmittel.

So führten Ebo et al. [38] den BAT an 3 unterschiedlichen Probandengruppen durch: an 29 Patienten mit Latex-Allergie (positive Anamnese, RAST und Prick-Test), an 24 Patienten ohne Latex- aber mit anderen Allergien und an 12 Kontrollpersonen ohne Allergien.

Sie ermittelten dabei im Falle der Latex-Allergie für den BAT eine Sensitivität von 93,1% und eine Spezifität von 91,7%. Sanz et al. [121] erhielten in ihrer Studie an 43 Patienten und 30 Kontrollpersonen eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 100%. Sie zeigten, dass im Falle der Latex-Allergie der BAT helfen kann, einen Hauttest mit Allergenextrakt zu vermeiden, bei dem das Risiko für systemische Nebenwirkungen bei bis zu 16% liegt [38]. Darüber hinaus kann er bei der Identifizierung falsch positiver Ergebnisse von Nutzen sein, bei denen häufig erhöhte spezifische IgE-Antikörper im Blut festgestellt werden, ohne dass klinische Symptome auftreten.

In anderen Studien wurden Patienten mit Pollenallergie untersucht: Hauswirth et al. [51] führten den BAT an 20 Patienten mit Birken- und Gräserpollenallergie sowie an 10 Kontrollpersonen durch, Saporta et al. [124] an 13 Patienten mit Gräserpollenallergie. Dabei wurden alle Patienten im BAT mit dem relevanten Allergen positiv getestet. Beim Vergleich der Ergebnisse vor und während der Pollensaison zeigte sich aber, dass ein signifikanter Unterschied im Prozentsatz an aktivierten basophilen Granulozyten bestand: Die Werte nahmen bei Testung während der Saison signifikant ab. Der BAT kann demnach als diagnostischer Test vor und während der Pollensaison herangezogen werden, allerdings unter Berücksichtigung des Testzeitpunktes.

Auf dem Gebiet der Arzneimittelallergien führten Sanz et al. [120] den BAT mit CD63 an 58 Patienten mit einer Allergie gegen β -Lactam-Antibiotika und 30 Kontrollen durch. Mit einer Sensitivität von 50% und einer Spezifität von 93,3% lieferte der BAT zwar bessere Ergebnisse als der RAST, war aber als alleiniges Testverfahren auf Grund der Sensitivität nur bedingt zur diagnostischen Anwendung geeignet. Mit einer Kombination aus BAT und RAST ließen sich aber 65,5% der betroffenen Patienten identifizieren.

Im Falle der NSAR (nicht-steroidale Antirheumatika), die in 20 bis 25% aller Fälle von Arzneimittelallergien die Ursache darstellen, könnte der BAT als zusätzliches Verfahren helfen, den bisher zur Diagnostik verwendeten oralen Provokationstest zu vermeiden, der mit häufigen systemischen Nebenwirkungen

belastet ist. Bei Testung auf Aspirin in Kombination mit Diclofenac lag die Sensitivität bei 58,3% und die Spezifität bei 93,3% [44].

Auch bei Patienten mit Allergie gegen Muskelrelaxantien, die für etwa die Hälfte aller lebensbedrohlichen Nebenwirkungen bei anästhetischen Eingriffen verantwortlich sind, war der BAT ein hilfreicher zusätzlicher In-vitro-Test bei der Diagnostik [83].

In einer weiteren Studie untersuchten Moneret-Vautrin et al. [82] 27 Patienten mit Nahrungsmittelallergien und 24 Kontrollpersonen mit Hilfe von BAT und CAST und verglichen die Ergebnisse. Dabei erhielten sie für beide In-vitro-Testverfahren eine gute Sensitivität und Spezifität. Der Histamin-Freisetzungstest war auf Grund der hohen spontanen Freisetzungsrates (bis zu 50%) als Testverfahren bei der Nahrungsmittelallergie nicht so gut geeignet.

In letzter Zeit beschäftigten sich verschiedene Veröffentlichungen mit einem weiteren Oberflächenmarker, CD 203c, der ebenso wie CD63 zur Bestimmung des Aktivierungsgrades basophiler Granulozyten herangezogen und damit zur Allergiediagnostik verwendet werden kann.

CD 203c ist ein Typ II-Transmembranprotein und entspricht dem Ectoenzym E-NPP3 (Ectonukleotidpyrophosphatasephosphodiesterase-3). Es wird nur auf Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimiert, wobei es nach Zellaktivierung schnell auf der Zelloberfläche erscheint, so dass intrazelluläre Speicher vermutet werden. Seine biologische Aufgabe ist nicht bekannt [51]. Anwendung fand der BAT mit CD203c als Marker der Zellaktivierung bisher u. a. bei der Diagnostik der Latex- und Pollenallergie mit guter Korrelation zu den Ergebnissen mit CD63 und teilweise sogar höherer Sensitivität [15, 51] sowie bei der Insektengiftallergie [10, 95].

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Basophilenaktivierungstest mit CD63 als Oberflächenmarker aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität ein nützliches zusätzliches In-vitro-Testverfahren bei der Diagnose der Insektengiftallergie darstellt und Anamnese und Hauttest besonders in jenen Fällen ergänzen kann, in denen diese widersprüchliche Testergebnisse liefern oder das allergieauslösende Insekt nicht eindeutig angegeben werden kann. Der Basophilenaktivierungstest stößt allerdings bei bestimmten Fragestellungen an Grenzen: Man kann z. B. keine Aussage bezüglich des Erfolges einer Immuntherapie oder bezüglich der Reaktion bei einem erneuten Stichereignis treffen, so dass er die Stichprovokation nicht ersetzen kann. Der BAT weist aber durchaus deutliche Vorzüge im Vergleich zu anderen Zell-Testverfahren, die auf der In-vitro-Reaktion basophiler Granulozyten basieren, auf [31, 36].

5 Zusammenfassung

0,8 bis 5% der Bevölkerung sind von lebensbedrohlichen systemischen anaphylaktischen Reaktionen auf Bienen- oder Wespenstiche betroffen [102]. Eine spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) dieser IgE-vermittelten Allergie ist dabei von hoher Wirksamkeit. So konnte man feststellen, dass nach abgeschlossener Immuntherapie bei 80 bis 100% der behandelten Patienten bei erneutem Stichereignis keine systemischen anaphylaktischen Reaktionen auftraten. Somit wurde ein nahezu vollständiger Schutz erreicht.

Zur Diagnosestellung und zur Indikation der Hyposensibilisierung werden Anamnese, Hauttest und der Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen Hymenoptergift herangezogen. In unklaren Fällen, in denen das allergieauslösende Insekt nicht eindeutig ermittelt werden kann, ist die Durchführung zusätzlicher zellulärer Testverfahren sinnvoll, wie z. B. dem Histamin-Freisetzungstest, dem CAST (Cellular Antigen Stimulation Test) und dem Basophilenaktivierungstest. Dabei kann beim Basophilenaktivierungstest die Exprimierung des Oberflächenmarkers CD63 als Kriterium für die Basophilenaktivierung herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde an 57 Patienten mit Hymenoptergiftallergie, getrennt für Bienen- und Wespengift, die Exprimierung von CD63 auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten als Marker für deren Aktivierung untersucht.

Darunter befanden sich 12 Patienten mit systemischen Reaktionen auf Bienengift in der Anamnese, 6 Patienten mit systemischen Reaktionen auf Bienen- und Wespengift und 39 Patienten mit systemischen Reaktionen auf Wespengift in der Anamnese. Zusätzlich wurden 10 Kontrollpersonen getestet, die keine positive Anamnese auf Bienen- oder Wespenstiche in der Anamnese aufwiesen und bei denen im RAST keine spezifischen IgE-Antikörper nachweisbar waren.

Vor der Durchführung des Basophilenaktivierungstests wurde bei allen Patienten ein intrakutaner Hauttest mit ansteigenden Hymenoptergiftkonzentrationen durchgeführt. Giftspezifische IgE-Antikörper im Serum wurden mit Hilfe des RAST (Pharmacia CAP RAST FEIA) bestimmt.

Das Ausmaß der Aktivierung basophiler Granulozyten durch verschiedene Konzentrationen von Bienen- und Wespengift wurde mit Hilfe des Basophilenaktivierungstests bestimmt.

Dazu wurde heparinisiertes Vollblut der Patienten mit Stimulationspuffer und Allergenlösung versetzt (Bienen- oder Wespengift in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml). Als Negativkontrolle diente Pufferlösung, als Positivkontrolle N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP). Der Prozess

der Degranulation wurde durch Inkubation der Proben in Eis gestoppt. Anschließend wurden die Proben mit Antikörperreagenz (anti-IgE-PE konjugiert mit Phycoerythrin sowie anti-gp53-FITC mit Fluorescein konjugiert) versetzt. Nach dem Lysieren der Erythrozyten wurden die Zellen gewaschen und in Pufferlösung suspendiert. Die quantitative Analyse der aktivierten Granulozyten erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach Abschluss des Basophilenaktivierungstests am Durchflusszytometer.

Dazu wurde durch das Setzen eines Auswertefensters (gate) auf basophile Granulozyten mit starker IgE-Expression (Anwesenheit Phycoerythrin-konjugierter anti-IgE-AK) die Zellpopulation eingegrenzt und innerhalb dieser Zellpopulation die Expression des Oberflächenmarkers gp53(CD63) analysiert. Pro Messung wurden 1000 Zellen akquiriert und das Ergebnis als Prozentsatz an aktivierten, CD63-exprimierenden basophilen Granulozyten angegeben. Eine Zellaktivierung über 15% wurde dabei als positive Reaktion gewertet.

Die Ergebnisse des Basophilenaktivierungstests wurden durch Ermittlung des Medians und der Standardabweichung des Prozentsatzes an aktivierten basophilen Granulozyten dargestellt.

Bei allen 12 Patienten mit Bienengiftallergie war der Basophilenaktivierungstest mit Bienengift bei der höchsten Bienengiftkonzentration positiv, bei 8 Patienten war er bei der höchsten Wespengiftkonzentration positiv.

Einen positiven Hauttest gegen Bienengift zeigten 12 Patienten, gegen Wespengift 6 Patienten. Bienengiftspezifische IgE-Antikörper waren bei 11 Patienten nachweisbar, IgE-Antikörper gegen Wespengift bei 8 Patienten.

Bei allen 6 Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie in der Anamnese war der Basophilenaktivierungstest mit der höchsten Bienen- und Wespengiftkonzentration positiv. Ebenso war der Hauttest bei allen Patienten sowohl mit Bienen- als auch mit Wespengift positiv. Alle 6 Patienten zeigten darüber hinaus einen positiven RAST gegen Bienen- und Wespengift.

Bei 38 von 39 Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf Wespengift in der Anamnese war der Basophilenaktivierungstest mit Wespengift bei der höchsten eingesetzten Konzentration positiv, bei 23 Patienten war er bei der höchsten Bienengiftkonzentration positiv. Im Hauttest zeigten 12 Patienten eine positive Reaktion auf Bienengift und 38 eine positive Reaktion auf Wespengift. Bei 38 Personen waren spezifische IgE-Antikörper gegen Wespengift nachweisbar, bei 21 Personen gegen Bienengift.

Bei allen 10 Kontrollpersonen fiel der BAT negativ aus. Alle hatten bezüglich Bienen- und Wespengift eine negative Anamnese und zeigten keine spezifischen IgE-Antikörper.

Für das jeweilige anamnestisch angegebene Hymenoptergift ergab sich für den BAT eine Sensitivität zwischen 97,4% und 100% und eine Spezifität von 100%. Die Sensitivität des RAST lag zwischen 91,7% und 100%, die Spezifität wie beim BAT bei 100%. Für den Hauttest ergab sich eine Sensitivität zwischen 97,4% und 100%.

Wurde der Basophilenaktivierungstest mit einer geringeren Bienen- oder Wespengiftkonzentration durchgeführt, führte dies auch zu einer selteneren positiven Antwort.

Bei einem Vergleich der 0,1/1-Ratios ist kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Basophilenaktivierung im BAT und dem Risiko für gravierende Nebenwirkungen im Rahmen einer Hyposensibilisierungstherapie festzustellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es sich beim Basophilenaktivierungstest um einen sensitiven und spezifischen zellulären In-vitro-Test bei der Diagnose von Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie handelt. Er ergänzt die herkömmliche Diagnostik aus Anamnese, Intrakutantest und Bestimmung der allergenspezifischen IgE-Antikörper (RAST), besonders in Problemfällen, in denen die Entscheidung für das relevante Insektengift zur Hyposensibilisierungsbehandlung aufgrund widersprüchlicher Testergebnisse nicht eindeutig getroffen werden kann. Anhand positiver Ergebnisse im BAT lässt sich eine Sensibilisierung gegen das getestete Allergen und auch eine Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Insektengiftklassen nachweisen, man kann jedoch zwischen dem Grad der Zellaktivierung und der Schwere der anaphylaktischen Reaktion keinen Zusammenhang erkennen.

6 Literatur

- [1] Albrecht, I., Eichler, G., Müller, U., Hoigne, R.
On the significance of severe local reactions to hymenoptera stings.
Clin. Allergy 10 (1980) 675-682

- [2] American Academy of Allergy and Immunology.
Beta-adrenergic blockers, immunotherapy, and skin testing. Position
statement.
J. Allergy Clin. Immunol. 84 (1989) 129-130

- [3] Annala, I.T., Karjalainen, E.S., Annala, P.A., Kuusisto, P.A.
Bee and wasp sting reactions in current beekeepers.
Ann. Allergy Asthma Immunol. 77 (1996) 423-427

- [4] Arbeitsanweisung Basotest®, Version 06/97.
Orpegen Pharma, Heidelberg, 1997

- [5] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft.
Anaphylaktoide Reaktionen bei Patienten mit ACE-Hemmer-Behandlung
bei gleichzeitiger Desensibilisierungsbehandlung oder nach Insekten-
stichen. Arzneimittel-Schnellinformation des Bundesinstitutes für Arznei-
mittel und Medizinprodukte.
Dtsch. Ärztebl. 91(1994) B-1762

- [6] Bäuerle, G., Schwarz, W.
Hymenopterengift-Allergie. Stellenwert des allergen-spezifischen IgG bei
der Therapie.
Dtsch. Med. Wschr. 108 (1983) 1351-1355

- [7] Benton, A.W., Morse, R.A., Stewart, J.D.
Venom collection from honey bees.
Science 142 (1963) 228-230

- [8] Bernard, A.A., Kersley, J.B.
Sensitivity to insect stings in patients taking anti-inflammatory drugs.
Br. Med. J. 292 (1986) 378-379

- [9] Bernstein, D.I., Mittman, R.J., Kagen, S.L., Korbee, L., Enrione, M., Bernstein, I.L.
Clinical and immunologic studies of rapid venom immunotherapy in hymenoptera-sensitive patients.
J. Allergy Clin. Immunol. 84 (1989) 951-959
- [10] Binder, M., Fierlbeck, G., King, T., Valent, P., Bühring, H.J.
Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients.
Int. Arch. Allergy Immunol. 129 (2002) 160-168
- [11] Birnbaum, J., Charpin, D., Vervloet, D.
Rapid hymenoptera venom immunotherapy: comparative safety of three protocols.
Clin. Exp. Allergy 23 (1993) 226-230
- [12] Birnbaum, J., Vervloet, D., Charpin, D.
Atopy and systemic reactions to hymenoptera stings.
Allergy Proc. 15 (1994) 49-52
- [13] Bork, K., König, W.
Neue In-vitro-Methodik in der Allergologie: Histamin-Release-Test.
Dtsch. Med. Wochenschr. 106 (1981) 1060-1064
- [14] Borelli, S., Anliker, M.D., Bucher, C., Wüthrich, B.
CAST-ELISA in der Verlaufskontrolle der spezifischen Immuntherapie mit Hymenopterengiften: Endauswertung einer prospektiven Studie über 3 Jahre.
Allergo J. S1 (2003) 186-190
- [15] Boumiza, R., Monneret, G., Forissier, M.F., Savoye, J., Gutowski, M.C., Powell, W.S., Biennu, J.
Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63.
Clin. Exp. Allergy 33 (2003) 259-265
- [16] Bousquet, J., Fontez, A., Aznar, R., Robinet-Levy, M., Michel, F.B.
Combination of passive and active immunization in honeybee venom immunotherapy.
J. Allergy Clin. Immunol. 79 (1989) 947-954

- [17] Bousquet, J., Knani, J., Velasquez, G., Ménardo, J.L., Guilloux, L., Michel, F.B.
Evolution of sensitivity to hymenoptera venom in 200 allergic patients followed for up to 3 years.
J. Allergy Clin. Immunol. 84 (1989) 944-950
- [18] Bousquet, J., Lockey, R.F., Malling, H.J. (Eds).
Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. WHO position paper.
Allergy 53 (1998) 1-42
- [19] Bousquet, J., Ménardo, J.L., Velasquez, G., Michel, F.B.
Systemic reactions during maintenance immunotherapy with honey bee venom.
Ann. Allergy 61 (1988) 63-68
- [20] Bousquet, J., Müller, U.R., Dreborg, S., Jarisch, R., Malling, H.J., Mosbeck, H., Urbanek, R., Youlten, L.
Immunotherapy with hymenoptera venoms: position paper of the working group on immunotherapy of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology.
Allergy 42 (1987) 401-413
- [21] Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H.
„Dermatologie und Venerologie“
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996
- [22] Brehler, R.
Ultra-Rush-Hyposensibilisierung.
Allergologie 22 (1999) 570-571
- [23] Bresser, H., Sandner, C., Rakoski, J.
Insektenstichnotfälle in München 1992.
Allergo J. 4 (1995) 373-376
- [24] Brohmer, P.
„Fauna von Deutschland“
Quelle und Meyer Verlag, Heidelberg, 1977, 304-410
- [25] Charpin, D., Birnbaum, J., Lanteaume, A., Vervloet, D.
Prevalence of allergy to hymenoptera stings in different samples of the general population.
J. Allergy Clin. Immunol. 90 (1992) 331-334

- [26] Charpin, D., Birnbaum, J., Vervloet, D.
Epidemiology of hymenoptera allergy.
Clin. Exp. Allergy 24 (1994) 1010-1015
- [27] Chipps, B.E., Valentine, M.D., Kagey-Sobotka, A., Schuberth, K.C.,
Lichtenstein, L.M.
Diagnosis and treatment of anaphylactic reactions to hymenoptera stings in
children.
J. Pediatr. 97 (1980) 177-184
- [28] Clayton, W.F., Georgitis, J.W., Reisman, R.E.
Insect sting anaphylaxis in patients without detectable serum venom-
specific IgE.
Clin. Allergy 15 (1985) 329-333
- [29] Conroy, M.C., Adkinson, N.F., Lichtenstein, L.M.
Measurement of IgE on human basophils: relation to serum IgE and anti-
IgE-induced histamine release.
J. Immunol. 118 (1977) 1317-1321
- [30] Conroy, M.C.
Releasability – a new dimension in basophil and mast cell reactivity.
In: “New trends in allergy”, Ring, J., Burg, G. (Hrsg.), Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York, 1981, 40-45
- [31] Crockard, A.D., Ennis, M.
Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow?
Clin. Exp. Allergy 31 (2001) 975-977
- [32] Dreborg, S., Frew, A. (Hrsg.)
Allergen standardization and skin tests. Position papers.
Allergy 48 (1993) 48-82
- [33] Eberlein-König, B., Kolsouzidou, S., Przybilla, B.
Changes of histamine and leukotriene release during specific vespid venom
hyposensitization.
Allergo J. 6 (1997) S42-S43
- [34] Eberlein-König, B., Ullmann, S., Thomas, P., Przybilla, B.
Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom
allergic patients treated successfully or unsuccessfully with
hyposensitization.
Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 704-712

- [35] 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. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 14(1) (2004) 10-16
- [36] Eberlein-König, B., Ring, J.
Diagnosis of IgE-mediated hymenoptera venom anaphylaxis in patients with negative skin test and negative RAST using cellular in vitro tests.
J. Allergy Clin. Immunol. 113 (2004) 1223
- [37] Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.
In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow.
Clin. Exp. Allergy 34 (2004) 332-339
- [38] Ebo, D.G., Lechkar, B., Schuerwegh, A.J., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.
Validation of a two-colour flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy.
Allergy 57 (2002) 706-712
- [39] Erdmann, S.M., Sachs, B., Kwiecien, R., Moll-Slodowy, S., Sauer, I., Merk, H.F.
The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy.
Allergy 59 (2004) 1102-1109
- [40] Erdmann, S.M., Sachs, B., Merk, H.F.
CD63-Expression als Messprinzip der Basophilen-Aktivierung in der Diagnostik der Bienen- und Wespengiftallergie.
Allergo J. 10 (2001) 31
- [41] Ewan, P.W.
Insect-sting allergy.
In: "Allergy and allergic disease", Kay, A.B. (Ed.), Blackwell Science, Oxford, 1997, 1693-1706
- [42] Fischer, P., Külzer, R.
Zur Prävalenz der Insektengift-Allergie in Deutschland.
Allergo J. 2 (1993) 53-56

- [43] Freitag, M., Höxtermann, S., Freitag, A.P., Straube, M., von Kobyletzki, G., Altmeyer, P., Szliska, C.
Flowzytometrische Messung der Aktivierung basophiler Granulozyten zur Diagnose der Wespengiftallergie.
Allergologie 24 (2001) 2-8
- [44] Gamboa, P., Sanz, M.L., Caballero, M.R., Urrutia, I., Antépara, I., Esparza, R., de Weck, A.L.
The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome.
Clin. Exp. Allergy 34.9 (2004) 1448-1457
- [45] Glowania, H.J.
Ergebnisse des RAST und des Hauttestes in der Diagnose von Bienen- und Wespengiftallergien.
Berichtsband RAST 2 (1981) 173-178
- [46] Gniazdowska, B.
Mediatorfreisetzung bei systemischen anaphylaktischen Nebenwirkungen der Hymenopterengifthyposensibilisierung.
Dissertation LMU München, 2000
- [47] Goldberg, A., Confino-Cohen, R.
Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis.
J. Allergy Clin. Immunol. 100 (1997) 182-184
- [48] Golden, D.B., Marsh, D.G., Kagey-Sobotka, A., Freidhoff, L., Szklo, M., Valentine, M.D., Lichtenstein, L.M.
Epidemiology of insect venom sensitivity.
JAMA 262 (1989) 240-244
- [49] Habermann, E.
Bee and wasp venoms.
Science 177 (1972) 314-322
- [50] Harms, V.
„Biomathematik, Statistik und Dokumentation“
Harms Verlag, Kiel, 1989

- [51] Hauswirth, A.W., Natter, S., Ghannadan, M., Majlesi, Y., Schernthaner, G., Sperr, W.R., Bühring, H., Valenta, R., Valent, P.
Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals.
J. Allergy Clin. Immunol. 110 (2002) 102-109
- [52] Hepner, M.J., Ownby, D.R., Anderson, J.A., Rowe, M.S., Sears-Ewald, D., Brown, E.B.
Risk of systemic reactions in patients taking beta-blocker drugs receiving allergen immunotherapy injections.
J. Allergy Clin. Immunol. 86 (1990) 407-411
- [53] Höxtermann, S., Auer, T., Altmeyer, P.
Zelluläre In-vitro-Diagnostik mittels CAST-ELISA.
Allergologie 18 (1995) 287-291
- [54] Hogan, A.D., Schwartz, L.B.
Markers of mast cell degranulation.
Methods 13 (1997) 43-52
- [55] Hopkin, J.M.
Genetics of atopy.
Pediatr. Allergy Immunol. 6 (1995) 139-144
- [56] Hoveler, H., Pullman, H., Gottmann-Luckerath, I.
Latente Sensibilisierung auf Bienen- und Wespengift.
Z. Hautkr. 58 (1983) 161-166, 169-170
- [57] Huang, S.K., Marsh, D.G.
Genetics of allergy.
Ann. Allergy 70 (1993) 347-358
- [58] Incorvaia, C., Mauro, M., Pastorello, E.A.
Hymenoptera stings in conscripts.
Allergy 52 (1997) 680-681
- [59] Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbrook, M.M.
Physiochemical properties of reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity.
J. Immunol. 97 (1966) 75-85

- [60] Janeway Jr., C.A., Travers, P.
“Immunobiology: The immune system in health and disease”
Garland Publ. Inc., New York, London, and Current Biology, Ltd., London,
San Francisco, Philadelphia, 1996, second edition
- [61] Jeßberger, B., Habig, J., Karl, S.
Hymenopteren giftallergie: Hyposensibilisierungstherapie trotz vorhandener
Kontraindikationen.
Allergologie 17 (1994) 255-260
- [62] Jugert, F.K., Roos, T., Merk, H.F.
Nachweis von spezifischem IgE, IgG und IgG-Subklassen bei
Wespengiftallergikern vor und während Hyposensibilisierung mittels
Immunoblot.
Allergo J. 2 (1993) 103-107
- [63] Kinet, J.P.
The high-affinity IgE receptor (Fcε RI): from physiology to pathology.
Annu. Rev. Immunol. 17 (1999) 931-972
- [64] King, T.P., Lu, G., Gonzalez, M., Qian, N., Soldanova, L.
Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence
similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp
homologues and possible implications for clinical allergy.
J. Allergy Clin. Immunol. 98 (1996) 588-600
- [65] King, T.P., Sobotka, A.K., Kochoumian, L., Lichtenstein, L.M.
Allergens of honey bee venom.
Arch. Biochem. Biophys. 172 (1976) 661-671
- [66] Klein, J.
“Immunology”
Blackwell Scientific Publ. Ltd, Oxford, 1990
- [67] Knol, E.F., Mul, F.P.J., Jansen, H., Calafat, J., Roos, D.
Monitoring human basophil activation via CD 63 monoclonal antibody 435.
J. Allergy Clin. Immunol. 88 (1991) 328-338
- [68] Kolecki, P.
Delayed toxic reaction following massive bee envenomation.
Ann. Emerg. Med. 33 (1999) 114-116

- [69] Kosnik, M., Silar, M., Bajrovic, N., Music, E., Korosec, P.
High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy.
Allergy 60 (2005) 1401-1406
- [70] Kurimoto, Y., De Weck, A.L., Dahinden, C.A.
The effect of interleukin-3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation.
Eur. J. Immunol. 21 (1991) 361-368
- [71] Lambert, C., Guilloux, L., Dzviga, C., Gourgaud-Massia, C., Genin, C.
Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to hymenoptera venom.
Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 52B (2003) 13-19
- [72] Lane, S.J., Lee, T.H.
Anaphylaxis.
In: "Allergy and allergic diseases", Kay, A.B. (Ed.), Blackwell Science, Oxford, 1997, 1550-1572
- [73] Lantner, R., Reisman, R.E.
Clinical and immunological features and subsequent course of patients with severe insect-sting anaphylaxis.
J. Allergy Clin. Immunol. 84 (1989) 900-906
- [74] Light, W.C., Reisman, R.E., Shimizu, A.
Clinical application of measurements of serum levels of bee venom-specific IgE and IgG.
Allergy Clin. Immunol. 59 (1977) 247-253
- [75] Lintner, T.J., Guralnick, W.M.W., Löwenstein, H.
Allergens from stinging insects.
In: "Allergy and allergic diseases", Kay A.B. (Ed.), Blackwell Science, Oxford, 1997, 927-941
- [76] Maly, F.E., Mart-Wyss, S., Blumer S., Cuhat-Stark, I., Wüthrich, B.
Mononuclear blood cell sulfidoleukotriene generation in the presence of interleukin-3 and whole blood histamine release in honey bee and yellow jacket venom allergy.
J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 7 (1997) 217-224
- [77] Marone, G., Poto, S., Giugliano, R., Bonini, S.
Studies on human basophil releasability.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 77 (1985) 103-106

- [78] Maucher, O.M., Grau, M., Hartmann, M., Schöpf, E.
Klinische Erfahrungen bei der Testung und Hyposensibilisierung mit gereinigtem Bienen- und Wespengift.
Allergologie 4 (1981) 67-73
- [79] Mauriello, P.M., Barde, S.H., Georgitis, J.W., Reisman, R.E.
Natural history of large local reactions from stinging insects.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (1984) 494-498.
- [80] Mayer, S., Bauer, C.P., Schindler, D., Emmrich, P.
Histaminrelease im Vollblut bei Kindern mit Insektengiftallergie.
Allergologie 13 (1990) 21-23
- [81] Metzelaar, M., Wijngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., Clevers, H.C.
CD63 antigen: a novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells.
J. Biol. Chem. 266 (1991) 3239-3245
- [82] Moneret-Vautrin, D.A., Sainte-Laudy, J., Kanny, G., Fremont, S.
Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy.
Ann. Allergy Asthma Immunol. 82 (1999) 33-40
- [83] Monneret, G., Benoit, Y., Gutowski, M.C., Bienvenu, J.
Detection of basophil activation by flow cytometry in patients with allergy to muscle-relaxant drugs.
Anesthesiology 92 (2000) 275-277
- [84] Müller, U.R.
“Insect sting allergy: clinical picture, diagnosis and treatment”
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1990
- [85] Müller, U., Mosbech, H.
Position paper: Immunotherapy with hymenoptera venoms.
Allergy 48 (1993) 37-46
- [86] Müller, U., Mosbech, H., Blaauw, P.
Emergency treatment of allergic reactions to hymenoptera stings.
Clin. Exp. Allergy 21 (1991) 281-288

- [87] Müller, U., Mosbech, H., Aberer, W.
Adrenaline for emergency kits.
Allergy 50 (1995) 783-787
- [88] Müller, U., Roth, A., Yman, L., Patrizzi, R.
Use of RAST technique in wasp sting hypersensitivity. Cross-reactions between various insect antigens are specially considered.
Allergy 33 (1978) 197-202
- [89] Mumcuoglu, Y., Ruffli, Th.
Dermatologische Entomologie. 12. Apidae – Bienen. 13. Vespidae – Wespen.
Schweiz. Rundsch. Med. 69 (1980) 1317, 1574
- [90] Nolte, H., DuBuske, L.M.
Clinical utility of basophil histamine release assays.
Materials of the Lunch Seminar No. 1653 during the 52nd Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, New Orleans, USA, 15.–20.03.1996
- [91] Normalbereiche klinisch-chemischer Befunde in den Städtischen Krankenhäusern Münchens.
Tabelle, Stand 2000
- [92] Nüsslein, H.G., Hemmerlein, B., Baenkler, H.W.
Die Bedeutung der Histaminfreisetzung aus dem Vollblut durch Bienen und Wespengift bei Insektenstich-Allergien.
Allergologie 13 (1990) 24-27
- [93] O'Connor, R., Peck, M.L.
Venoms of apidae.
In: „Handbook Exp. Pharm.“, Vol. 48, Springer Verlag, Berlin, 1978, 613
- [94] Oude-Elberink, J.N., de Monchy, J.G., Kors, J.W., van Doormaal, J.J., Dubois, A.E.
Fatal anaphylaxis after a yellow jacket sting, despite venom immunotherapy, in two patients with mastocytosis.
J. Allergy Clin. Immunol. 99 (1997) 153-154
- [95] Platz, I.J., Binder, M., Marxer, A., Lischka, G., Valent, P., Bühring, H.J.
Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals.
Int. Arch. Allergy Immunol. 126 (2001) 335-342

- [96] Przybilla, B.
Bienen- und Wespengiftallergie.
Hautarzt 44 (1993) 611-623
- [97] Przybilla, B.
Wertigkeit diagnostischer Parameter bei der Indikationsstellung zur Hymenoptereingift-Hyposensibilisierung.
Allergo J. 2 (1993) 81-83
- [98] Przybilla, B., Ring, J.
Hymenoptera venom allergy.
In: "New trends in allergy", Ring, J., Przybilla, B. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 335-349
- [99] Przybilla, B., Ring, J.
Diagnostik und Therapie der Allergie vom Sofort-Typ gegenüber Bienen- und Wespengift.
Allergologie 8 (1985) 31-39
- [100] Przybilla, B., Ring, J., Griebhammer, B.
Atopy and hymenoptera venom allergy.
J. Allergy Clin. Immunol. 79 (1987) 233
- [101] Przybilla, B., Ring, J., Wielgosch, J.
Der Basophilen-Histamin-Freisetzungstest als diagnostische Methode bei Hymenoptereingift-Allergie.
Hautarzt 39 (1988) 662-670
- [102] Przybilla, B., Rueff, F., Fuchs, T., Pfeiffer, C., Rakoski, J., Stolz, W., Vieluf, D.
Insektengiftallergie. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI).
Allergo J. 13F (2004) 186-190
- [103] Rakoski, J., von Mayenburg, J.
Das Ultra-Rush-Verfahren – eine neue Methode zur Überprüfung der Aktualität von Insektengiftallergien.
Allergologie 9 (1986) 73-74
- [104] Reisman, R.E.
Unusual reactions to insect stings.
Allergy Proc. 12 (1991) 395-399

- [105] Reisman, R.E., Livingston, A.
Late-onset allergic reactions, including serum sickness, after insect stings.
J. Allergy Clin. Immunol. 84 (1989) 331-337
- [106] Reisman, R.E., Müller, U.R., Wypych, J.I., Lazell, M.I.
Studies of coexisting honeybee and vespid-venom sensitivity.
J. Allergy Clin. Immunol. 73 (1984) 246-252
- [107] Reisman, R.E., Wypych, J.I., Lazell, M.I.
Further studies of patients with honeybee- and yellow-jacket-venom-specific IgE.
Int. Arch. Allergy Immunol. 82 (1987) 190-194
- [108] Ring, J.
"Angewandte Allergologie"
MMV Medizin Verlag, München, 1995
- [109] Ring, J.
Reaktionsbereitschaft (Releasability): Veränderte Reaktionsmuster in der Freisetzung vasoaktiver Mediatoren. Untersuchungen am Beispiel der Histaminfreisetzung aus menschlichen basophilen Leukozyten.
Allergologie 7 (1984) 41-48
- [110] Ring, J., Gottsmann, M., Przybilla, B., Eisenmenger, W.
Tod nach 1000 Bienenstichen.
Münch. Med. Wochenschr. 128 (1986) 339
- [111] Ring, J., Lonsdorf, G., Schury, W., Burg, G.
Bienen- und Wespengift-Allergie.
Münch. Med. Wochenschr. 124 (1982) 587-590
- [112] Ring, J., Messmer, K.
Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes.
Lancet I (1977) 466-469
- [113] Ring, J., Przybilla, B., Müller, U.
Insektengift-Allergie.
Allergologie 22 (1999) 39-82
- [114] Roitt, I.M., Male, D.K., Brostoff, J.
„Immunology“
Mosby Publishers, London, 1996

- [115] Rueff, F., Reißig, J., Przybilla, B.
Nebenwirkungen der Schnellhyposensibilisierung mit Hymenoptereingift.
Allergo J. 6 (1997) 659-664
- [116] Rueff, F., Przybilla, B., Fuchs, T., Gall, H., Rakoski, J., Stolz, W., Vieluf, D.
Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie.
Allergo J. 9 (2000) 458-472
- [117] Rzany, B., Przybilla, B., Jarisch, R., Aberer, W., Dietschi, R., Wüthrich, B., Buhler, B., Frosch, P., Rakoski, J., Kiehn, H.
Clinical characteristics of immunotherapy with hymenoptera venoms. A retrospective study.
Allergy 46 (1991) 251-254
- [118] Sainté-Laudy, J., Sabbah, A., Drouet, M., Lauret, M.G., Loiry, M.
Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin test, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release.
Clin. Exp. Allergy 30 (2000) 1166-1171
- [119] Sanchez, F., Blanca, M., Miranda, A., Carmona, M.J., Garcia, J., Fernandez, J., Torres, M.J., Sondon, M.C., Juarez, C.
Comparison of *Vespula germanica* venoms obtained from different sources.
Int. Arch. Allergy Immunol. 104 (1994) 385-389
- [120] Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Antépara, I., Uasuf, C., Vila, L., Garcia-Avilés, C., Chazot, M., De Weck, A.L.
Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics.
Clin. Exp. Allergy 32.2 (2002) 277-286
- [121] Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Garcia-Avilés, C., Vila, L., Diéguez, I., Antépara, I., de Weck, A.L.
Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy.
Int. Arch. Allergy Immunol. 130.1 (2003) 33-39
- [122] Sanz, M.L., Maselli, J.P., Gamboa, P.M., Oehling, A., Dieguez, I., de Weck, A.L.
Flow cytometric basophil activation test: a review.
J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 12 (2002) 143-154

- [123] Sanz, M.L., Prieto, I., Garcia, B.E., Oehling, A.
Diagnostic reliability considerations of specific IgE determination.
J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 6 (1996) 152-161
- [124] Saporta, M., Kamei, S., Persi, L., Bousquet, J., Arnoux, B.
Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to
grass pollens.
Allergy 56 (2001) 442-445
- [125] Schäfer, T., Przybilla, B.
IgE antibodies to hymenoptera venoms in the serum are common in the
general population and are related to indications of atopy.
Allergy 51 (1996) 372-377
- [126] Schäfer, T., Ring, J., Przybilla, B.
In-vitro-Histaminfreisetzung und Basophilendegranulation bei Insekten-
gift-Allergie.
Allergologie 13 (1990) 13-20
- [127] Schleimer, R.P., Fox, C.C., Naclerio, R.M., Plaut, M., Creticos, P.S.,
Togias, S.G., Warner, J.A., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L.M.
Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic
diseases.
J. Allergy Clin. Immunol. 76 (1985) 369-374
- [128] Schubert, K.C., Golden, D.B.K., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M.,
Lichtenstein, L.M.
Evaluation and treatment of insect sting allergy.
In: "New trends in allergy", Ring, J., Burg, G. (Eds.), Springer Verlag,
Berlin, 1981, 260
- [129] Schumacher, M.J., Tveten, M.S., Egen, N.B.
Rate and quantity of delivery of venom from honeybee stings.
J. Allergy Clin. Immunol. 93 (1994) 831-835
- [130] Schwartz, R.J., Golden, D.B.K., Lockey, R.F.
Venom immunotherapy in the hymenoptera-allergic pregnant patient.
J. Allergy Clin. Immunol. 85 (1990) 709-712
- [131] Schwartz, H.J., Sutheimer, C., Gauerke, M.B.
Venom-specific IgE antibodies in postmortem sera from victims of
sudden, unexpected death.
J. Allergy Clin. Immunol. 73 (1984) 189-193

- [132] Schwartz, H.J., Sutheimer, C., Gauerke, M.B., Yunginger, J.W.
Hymenoptera venom-specific IgE antibodies in post-mortem sera from
victims of sudden, unexpected death.
Clin. Allergy 18 (1988) 461-468
- [133] Schwartz, H.J., Yunginger, J.W., Schwartz, L.B.
Is unrecognized anaphylaxis a cause of sudden unexpected death?
Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 866-870
- [134] Siegmund, R., Vogelsang, H., Machnik, A., Hermann, D.
Surface membrane antigen alteration on blood basophils in patients with
Hymenoptera venom allergy under immunotherapy.
J. Allergy Clin. Immunol. 106(6) (2000) 1190-1195
- [135] Smith, P.L., Kagey-Sobotka, A., Bleecker, E.R., Traystman, R., Kaplan,
A.P., Gralnick, H., Valentine, M.D., Permutt, S., Lichtenstein, L.M.
Physiologic manifestations of human anaphylaxis.
J. Clin. Invest. 66 (1980) 1072-1080
- [136] Sobotka, A.K., Valentine, M.D., Benton, A.W., Lichtenstein, L.M.
Allergy to insect stings. I. Diagnosis of IgE-mediated hymenoptera
sensitivity by venom-induced release.
J. Allergy Clin. Immunol. 53 (1974) 170-184
- [137] Straumann, F., Bucher, C., Wüthrich, B.
Double sensitization to honeybee and wasp venom: Immunotherapy with
one or with both venoms?
Int. Arch. Allergy Immunol. 123 (2001) 268-274
- [138] Sturm, G.J., Böhm, E., Trummer, M., Weiglhofer, I., Heinemann, A.,
Aberer, W.
The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a
prospective study.
Allergy 59 (2004) 1110-1117
- [139] The European Academy of Allergology and Clinical Immunology.
Allergen standardization and skin test.
Allergy 48 (1994) 49-82
- [140] Toogood, J.H.
Risk of anaphylaxis in patients receiving beta-blocker drugs.
J. Allergy Clin. Immunol. 81 (1988) 1-5

- [141] van der Linden, P.W.G., Hack, C.E., Struyvenberg, A., van der Zwan, J.K.
Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis.
J. Allergy Clin. Immunol. 94 (1994) 151-159
- [142] Wahn, U., Thiemeier, M., Gens, C., Forck, G., Kemeny, M.
The allergenic activity of purified bee venom proteins and peptides.
J. Allergy Clin. Immunol. 73 (1984) 189
- [143] Wright, D.N., Lockey, R.F.
Local reactions to stinging insects.
Allergy Proc. 11 (1990) 23-28
- [144] Wüthrich, B., Dietschi, R., Berlinger, F., Marti-Wyss, S., Cuhat, J.
Der Basophilen-Degranulationstest in der Diagnostik der Hymenopterengift-Allergie.
Schweiz. Med. Wochenschr. 117 (1987) 1333-1341
- [145] Wypych, J.I., Abeyounis, C.J., Reisman, R.E.
Analysis of differing patterns of cross-reactivity of honey-bee and yellow jacket venom-specific IgE: use of purified venom fractions.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89 (1989) 60-66
- [146] Yu, Y., de Weck, A.L., Stadler, B.M., Müller, U.
Anti-IgE autoantibodies and bee-sting allergy.
Allergy 50 (1995) 119-125
- [147] Zeleznick, L.D., Hunt, K.J., Sobotka, A.K., Valentine, M.D., Tippett, L.O., Lichtenstein, L.M.
Diagnosis of hymenoptera hypersensitivity by skin testing with hymenoptera venoms.
J. Allergy Clin. Immunol. 59 (1977) 2-9

7 Anhang

Patientenliste und Kontrollpersonen

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST-Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
♀/♂ Alter	Insekt/ Klin. Grad	Biene/ Wespe	Biene/ Wespe	%	%						
1. ♀, 66 J	Wespe III	neg./pos.	0/2	30,1	2,7	4,6	3,0	4,7	81,0	72,7	7,4
2. ♂, 51 J	Wespe III	pos./pos.	3/2	47,9	7,8	69,0	16,9	6,1	69,6	63,3	6,2
3. ♂, 13 J	Wespe I	neg./pos.	0/3	32,9	5,1	12,2	4,5	5,2	84,3	26,6	5,7
4. ♀, 65 J	Wespe III	neg./pos.	1/3	28,3	5,0	68,8	24,8	6,6	88,4	63,6	5,4
5. ♀, 59 J	Wespe III	neg./pos.	0/1	83,7	9,0	47,7	11,7	10,7	86,9	83,9	35,8
6. ♀, 28 J	Biene III	pos./neg.	4/0	43,1	11,8	47,7	36,6	23,2	14,9	13,1	12,5
7. ♂, 70 J	Wespe I	neg./pos.	3/2	29,1	13,1	71,3	10,8	19,8	80,6	67,5	22,1
8. ♀, 60 J	Wespe II	neg./pos.	1/3	17,7	16,53	21,9	15,2	6,18	49,5	46,4	14,33
9. ♀, 38 J	Wespe II	neg./pos.	0/3	46,1	4,7	7,5	7,8	6,8	75,6	61,7	29,8
10. ♀, 42 J	Wespe II	neg./pos.	2/5	61,4	3,6	19,0	6,8	8,7	29,2	31,8	10,1
11. ♂, 13 J	Biene II	pos./pos.	4/3	25,8	2,4	85,6	74,1	8,5	90,4	65,9	3,8
12. ♀, 37 J	Biene III	pos./neg.	4/2	53,8	7,6	78,6	76,3	76,9	14,8	4,3	7,9
13. ♀, 51 J	Wespe II	neg./pos.	0/3	55,7	7,6	11,5	4,1	5,8	52,6	10,3	4,7
14. ♀, 13 J	Wespe II	pos./pos.	3/4	43,8	8,0	69,0	10,9	20,6	76,8	74,8	23,1

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST- Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
♀/♂ Alter	Insekt/ Klin. Grad	Biene/ Wespe	Biene/ Wespe	%	%						
15. ♂, 49 J	Wespe II	neg./pos.	2/2	42,6	5,2	87,7	13,4	7,1	91,5	88,6	30,5
16. ♂, 36 J	Wespe II	pos./pos.	3/3	39,4	18,4	27,0	13,9	13,6	46,9	18,9	13,8
17. ♀, 58 J	Wespe II	neg./pos.	0/2	58,8	6,9	13,7	6,7	8,9	52,9	55,1	41,7
18. ♂, 70 J	Wespe II	neg./pos.	3/3	33,7	8,1	23,3	9,7	6,1	61,6	54,9	19,1
19. ♀, 31 J	Wespe II	pos./pos.	0/2	33,8	2,1	46,9	11,0	4,2	86,4	63,8	10,8
20. ♂, 37 J	Wespe I	neg./pos.	3/3	54,0	18,4	54,3	19,0	9,6	57,6	70,7	54,0
21. ♀, 42 J	Wespe II	neg./pos.	0/2	77,1	8,1	25,7	7,3	6,0	86,7	78,5	45,1
22. ♀, 48 J	Wespe II	neg./pos.	0/3	54,9	6,0	19,7	5,6	6,0	5,4	5,9	4,8
23. ♀, 26 J	Wespe II	neg./pos.	2/3	74,8	6,2	33,2	7,9	8,7	95,8	91,6	47,3
24. ♂, 34 J	Wespe I	pos./pos.	2/3	69,2	7,1	75,9	7,5	4,2	86,7	81,2	13,2
25. ♀, 36 J	Biene I	pos./pos.	2/0	49,1	2,6	72,8	7,0	2,7	81,9	19,9	3,0
26. ♀, 79 J	Wespe I	neg./pos.	2/2	8,8	2,1	7,5	4,3	4,06	36,1	34,3	5,64
27. ♀, 45 J	Wespe II	neg./pos.	2/0	53,3	3,1	5,1	7,3	6,4	77,2	42,3	5,8
28. ♂, 41 J	Wespe II	neg./pos.	0/2	52,0	4,6	9,8	4,5	5,0	87,2	86,7	77,0

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST-Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
♀/♂ Alter	Insekt/ Klin. Grad	Biene/ Wespe	Biene/ Wespe	%	%						
29. ♂, 56 J	Wespe III	neg./pos.	0/2	46,9	4,3	24,5	4,7	7,0	95,5	70,6	10,6
30. ♂, 37 J	Biene und Wespe II	pos./pos.	2/3	67,6	4,9	86,6	52,0	4,4	84,1	88,5	45,9
31. ♂, 29 J	Wespe II	neg./pos.	3/3	61,1	3,5	63,3	3,9	2,0	92,2	93,7	35,2
32. ♂, 68 J	Biene II	pos./pos.	4/3	62,9	3,3	79,8	84,9	71,2	85,9	53,8	7,9
33. ♂, 60 J	Biene und Wespe II	pos./pos.	5/4	40,5	13,4	77,9	69,97	29,19	78,19	83,21	72,8
34. ♀, 68 J	Biene und Wespe II	pos./pos.	6/3	27,0	1,8	72,9	85,9	86,8	60,8	5,8	4,1
35. ♂, 63 J	Biene II	pos./pos.	4/2	56,1	1,4	77,9	56,0	18,7	81,9	74,2	50,8
36. ♂, 42 J	Wespe II	pos./pos.	3/3	36,8	3,1	82,2	33,4	3,4	83,1	56,7	9,1
37. ♂, 27 J	Wespe I	neg./pos.	0/2	32,6	3,6	5,2	3,7	3,4	61,3	47,1	7,2
38. ♂, 14 J	Wespe II	neg./pos.	0/1	36,59	8,91	11,08	10,12	7,13	78,37	31,33	8,88
39. ♀, 42 J	Biene II	pos./neg.	2/0	59,2	2,5	45,5	31,4	19,3	9,2	7,6	7,1
40. ♀, 45 J	Wespe III	pos./pos.	2/3	77,0	3,2	11,3	2,9	4,6	96,2	97,0	73,7
41. ♀, 43 J	Wespe I	neg./pos.	4/6	43,2	3,3	72,8	51,2	15,2	93,4	91,6	59,6
42. ♀, 68 J	Wespe II	neg./pos.	0/3	35,5	2,2	7,3	3,3	1,6	85,8	87,9	46,5

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST- Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
♀/♂ Alter	Insekt/ Klin. Grad	Biene/ Wespe	Biene/ Wespe	%	%						
43. ♀, 57 J	Biene II	pos./neg.	0/0	17,7	2,9	43,6	22,2	4,8	2,2	2,9	2,1
44. ♀, 52 J	Wespe II	neg./pos.	0/1	36,1	4,2	4,6	2,9	3,5	69,1	21,6	3,3
45. ♂, 38 J	Wespe II	pos./pos.	3/3	80,6	3,6	80,2	12,2	2,6	94,0	92,2	27,2
46. ♂, 10 J	Biene II	pos./neg.	3/2	36,8	7,2	53,9	11,3	4,8	19,9	9,5	5,9
47. ♂, 36 J	Biene und Wespe II	pos./pos.	4/6	30,6	2,9	41,0	4,6	3,1	62,4	49,1	22,1
48. ♀, 28 J	Biene II	pos./neg.	5/2	35,2	3,1	90,6	88,3	52,2	20,0	3,8	2,1
49. ♀, 62 J	Wespe II	pos./pos.	3/4	25,1	2,2	44,6	21,5	11,3	50,9	18,4	1,8
50. ♀, 41 J	Wespe II	neg./pos.	0/6	35,5	2,5	6,3	6,3	4,1	47,4	16,4	14,7
51. ♂, 30 J	Biene und Wespe I	pos./pos.	4/2	78,2	8,6	83,2	65,6	25,4	83,7	59,8	26,3
52. ♂, 41 J	Biene und Wespe II	pos./pos.	4/4	32,5	2,6	84,9	80,3	36,7	84,6	53,4	11,4
53. ♂, 62 J	Wespe I	pos./pos.	2/3	25,1	3,2	35,6	3,7	3,9	86,0	78,6	60,0
54. ♂, 70 J	Biene III	pos./pos.	5/3	21,8	2,3	51,5	57,0	8,3	71,9	33,4	13,1
55. ♂, 65 J	Wespe III	pos./neg.	0/2	35,1	5,23	3,52	5,97	2,69	74,79	52,28	9,72
56. ♂, 44 J	Wespe III	pos./pos.	0/4	64,81	3,94	10,88	3,57	3,23	86,2	88,35	65,84

Pat. Nr.	Anamnese	Hauttest	RAST- Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
						1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
♀/♂ Alter	Insekt/ Klin. Grad	Biene/ Wespe	Biene/ Wespe	%	%						
57. ♂, 48 J	Biene I	pos./pos.	3/2	81,6	1,6	92,4	85,2	10,7	87,7	61,3	5,5

Positive Ergebnisse sind fett gedruckt

Kontrollpersonen

Pers. Nr.	RAST- Klasse	Pos. Kontr.	Neg. Kontr.	Bienengift			Wespengift		
				1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %	1,0 µg/ml %	0,1 µg/ml %	0,01 µg/ml %
1. ♀,37J	0/0	16,7	1,7	1,7	2,3	1,7	1,9	2,7	3,6
2. ♂,62J	0/0	12,4	3,7	3,8	6,8	5,4	12,6	4,6	4,2
3. ♂,32J	0/0	22,0	13,8	9,9	13,9	13,4	14,2	14,0	14,5
4. ♀,33J	0/0	22,8	5,6	13,8	6,5	6,7	15,0	7,6	4,9
5. ♂,52J	0/0	42,1	6,5	8,0	6,9	7,1	13,9	11,5	5,0
6. ♀,52J	0/0	35,8	4,0	3,2	2,7	4,9	4,1	6,1	5,8
7. ♂,52J	0/0	39,4	4,6	7,6	3,0	4,6	5,5	6,0	5,6
8. ♀,60J	0/0	46,0	6,1	5,8	4,2	5,3	7,4	3,8	6,5
9. ♂,67J	0/0	29,6	7,3	6,7	8,3	6,7	7,5	5,3	3,5
10. ♀,37J	0/0	24,7	4,7	6,1	5,1	4,7	7,3	7,2	4,4

Positive Ergebnisse sind fett gedruckt

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring, Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein des Klinikums Rechts der Isar, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können.

Frau Prof. Dr. med. Bernadette Eberlein danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und ihre Geduld bei deren Durchführung. Ihre Ratschläge und Hinweise waren für mich sehr hilfreich und haben mir wertvolle Denkanstöße gegeben.

Ferner möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. med. J. Rakoski bedanken, in dessen Allergieabteilung ich die Blutentnahmen zur Durchführung des Basophilenaktivierungstests vornehmen durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Herta Sezer, die mich bei der technischen Durchführung des Basophilenaktivierungstests mit ihrer Erfahrung stets hilfsbereit und kompetent unterstützt hat.

Ferner möchte ich mich bei Jörg Wendt und Franz Lachmann bedanken, die mir bei verschiedensten Computerproblemen behilflich waren und ihre Zeit geopfert haben.

Nicht zuletzt danke ich aber meiner Familie, die es mir mit ihrer Geduld und ihrem Improvisationstalent ermöglicht hat, diese Dissertationsarbeit fertig zu stellen und dabei großzügig über das eine oder andere Sandkorn im Getriebe des Tagesablaufes hinweggesehen hat.

Lebenslauf

Christine Schmidt-Leidescher, geb. Schmidt

1956	geboren in Bayreuth, Vater: Otto Schmidt, Mutter: Friedel Schmidt
1962-1966	Grundschule an der Schwanthalerstraße, München
1966-1975	Neusprachliches Theresiengymnasium, München
1975	Abitur
1975-1983	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1978	Vordiplom
1981	Diplom mit Hauptfach Genetik, Nebenfächer: Biochemie und Mikrobiologie
1981-1983	Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie in München
1983-1991	Lektoratstätigkeit und Buchherstellung im Carl Hanser Verlag, München
1991	Geburt der Tochter Susanne
1996-1998	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München, vorklinischer Abschnitt
1998	Physikum an der LMU, München
1998-2004	Studium der Medizin an der Technischen Universität München, klinischer Abschnitt
2004	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation