

Aus der Klinik für Dermatologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor/Leiter: Univ.-Prof. Dr. Homey

# **Einfluss einer präanalytischen Selektion von basophilen Granulozyten auf die Sensitivität des Basophilenaktivierungstests**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Leonie Alina Tobies

(2022)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: PD Dr. med. Meller

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Wagenmann

**Für meine Mutter  
und Arthur**

## Zusammenfassung

Die Maximalvariante der allergischen Reaktion stellt die Anaphylaxie dar, welche in Grad 1-4 eingeteilt wird. Insektengifte zählen zu den häufigsten Auslösern einer Anaphylaxie, hierunter am häufigsten durch Bienen- und Wespengift ausgelöst. Die Wahrscheinlichkeit für eine systemische Reaktion nach einem Stich liegt bei 5-10%. Basophile Granulozyten spielen bei einer allergischen Reaktion eine wichtige Rolle. Sie zählen zum angeborenem Immunsystem und exprimieren den hochaffinen IgE Rezeptor FcεRI. Bei der Allergie vom Soforttyp richtet sich IgE gegen relevante Allergene, wie zum Beispiel gegen Hymenoptereingifte. Via Fc-Fragment bindet IgE an diesen hochaffinen Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. Nach Aktivierung werden Mediatoren freigesetzt.

Bei 40-60% der Hymenoptereingiftallergikern tritt ein doppelt positives Testergebnis im spezifischen IgE gegen native Gifte auf. Doch dies kann durch eine falsch positive Reaktion auf Grund einer Kreuzreaktivität verursacht sein. Die Kreuzreaktivität kann durch gemeinsame Proteinepitope homologer Allergene auftreten oder durch IgE-Antikörper, die gegen kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten, auch CCD genannt, gerichtet sind. Beides hat keine klinische Relevanz, erschwert allerdings die Diagnostik.

Die richtige Diagnostik stellt das Fundament für eine korrekte Therapie dar. In der Diagnostik ist der Hauttest immer noch als Goldstandard anzusehen. Weiterführend insbesondere im Hinblick auf die Kreuzreaktivität wird heute am häufigsten das spezifische IgE mit rekombinanten Allergenen in der komponentenbasierten Diagnostik angewendet. Der Basophilenaktivierungstest (BAT) stellt ein weiteres Diagnostikum dar, wenn zum Beispiel ein Hauttest nicht möglich ist, oder durch Anamnese, Hauttestung und serologische Diagnostik das Ergebnis noch nicht eindeutig ist. Der BAT hat den Vorteil, dass er weniger stressvoll für den Patienten ist. Nachteile sind eine geringere Sensitivität, Zeitaufwendigkeit, hohe Kosten und dass er somit nicht für die Routinediagnostik geeignet ist.

In unserer Studie sollte untersucht werden, ob die Sensitivität des BAT durch vorherige Separation der basophilen Granulozyten erhöht werden kann. Allerdings machen die basophilen Granulozyten weniger als 2% der Immunzellen aus, weshalb es eine größere Menge an Blut bedarf. Es wurden 28, zum Zeitpunkt der Blutabnahme unbehandelte Bienen- und/oder Wespengiftallergiker, davon 23 Wespen-, 1 Wespen- und Bienen- und 4 reine Bienengiftallergiker und weiterhin 10 gesunde Spender in der Kontrollgruppe untersucht. Die Proben wurden auf zwei Arten analysiert. Erstens mittels des im Labor etablierten BAT namens Flow2CAST (BAT<sup>PBMC</sup>) entsprechend den Herstellervorgaben und zweitens der gleiche BAT, aber erst nach vorheriger magnetischer Separation der basophilen Granulozyten (BAT<sup>BG</sup>).

In der Studie konnte gezeigt werden, dass diese vorherige Separation zu keiner stark erhöhten Sensitivität führt. Insbesondere die Kontrolle namens PC2 (fMLP) funktionierte nach Separation deutlich seltener im Vergleich zum Vollblut. Hier könnte man vermuten, dass die vielen Zentrifugenschritte zu Zellschädigungen führen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass zum jetzigen Zeitpunkt eine zusätzliche Separation der basophilen Granulozyten unter Berücksichtigung der Kosten und des Zeitaufwandes in der untersuchten Fragestellung keinen verbesserten diagnostischen Wert hat.

# Abstract

The maximum variant of the allergic reaction is anaphylaxis, which is divided into grades 1-4. Insect venoms are among the most common triggers of anaphylaxis, most often caused by bee and wasp venom. The probability of a systemic reaction after a sting is 5-10%. Basophilic granulocytes play an important role in an allergic reaction. They are part of the innate immune system and express the high-affinity IgE receptor FcεRI. In immediate type allergy, IgE is directed against relevant allergens, such as hymenopteran toxins. Via Fc-fragment, IgE binds to this high-affinity receptor on mast cells and basophilic granulocytes. After activation, mediators are released.

In 40-60% of hymenopteran venom allergic patients, a double positive test result in specific IgE against native venoms occurs. However, this can be caused by a false positive reaction due to cross-reactivity. Cross-reactivity can be caused by common protein epitopes of homologous allergens or by IgE antibodies directed against cross-reactive carbohydrate side chains, also called CCD. Neither of these has any clinical relevance, but makes the diagnosis more difficult.

The correct diagnosis is the basis for a correct therapy. In diagnostics, the skin test is still considered the gold standard. In addition, especially with regard to cross-reactivity, specific IgE with recombinant allergens is most frequently used today in component-based diagnostics. The BAT represents a further diagnostic tool if, for example, a skin test is not possible or the result is not yet clear from the patient's anamnesis, skin testing and serological diagnostics. The BAT has the advantage that it is less stressful for the patient. Disadvantages are lower sensitivity, time and cost, and that it is therefore not suitable for routine diagnostics.

Our study aimed to test whether the sensitivity of the BAT can be increased by prior separation of the basophilic granulocytes. However, the basophilic granulocytes make up less than 2% of the immune cells, which requires a larger amount of blood. 28 bee and/or wasp venom allergic patients, untreated at the time of blood collection, were tested, of which 23 were wasp, 1 wasp and bee, 4 were pure bee venom allergic patients and further 10 healthy donors in the control group. The samples were analysed in two ways. Firstly, using the laboratory established BAT called Flow2CAST (BAT<sup>PBMC</sup>) according to the manufacturer's instructions, and secondly, the same BAT, but only after prior magnetic separation of the basophilic granulocytes using the Diamond Basophil Isolation Kit, human (BAT<sup>BG</sup>).

The study was able to show that this prior separation does not lead to a significantly increased sensitivity. In particular, Positive Control 2 (fMLP) functioned significantly less frequently after separation compared with whole blood. Here, a possible assumption could be that the many centrifuge steps lead to cell damage.

In conclusion, it can be said that at this point in time an additional separation of the basophilic granulocytes has no improved diagnostic value considering the costs and time involved in the research question.

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Api	Allergenkomponente des Bienengifts (abgeleitet von <i>Apis mellifera</i> (Honigbiene))
BAT	Basophilenaktivierungstest
BAT <sup>BG</sup>	Basophilenaktivierungstest nach Herstellerangaben
BAT <sup>PBMC</sup>	Basophilenaktivierungstest nach Separation der Basophilen Granulozyten
Bzgl.	Bezüglich
Bzw.	beziehungsweise
BD	Becton-Dickinson Biosciences GmbH
Ca.	circa
CAP	Carrier-Polymer-System
CCD	Cross-reactive Carbohydrate Determinant
CD	Cluster of Differentiation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
FEIA	Fluoreszenzenzymimmunoassay
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FSC	Forward Scatter
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kU	Kilounits
kD	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
neg.	negativ
nm	Nanometer
Pat.	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PC <sup>anti-FcεRI</sup>	Positivkontrolle anti- FcεRI
PC <sup>fMLP</sup>	Positivkontrolle fMLP
PE	Phycocerythrin
Pos.	positive
R	rekombinant
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
Rpm	Rotationen pro Minute
s.	siehe
S.	Seite
slgE	spezifisches Immunglobulin E
SSC	Side Scatter

Tab.	Tabelle
TH2	T-Helferzelle
Ves	Allergenkomponente des Wespengifts (abgeleitet von <i>Vespula germanica</i> (Deutsche Wespe))

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Zielsetzung	1
1.2	Immunsystem	1
1.2.1	Typ I-Reaktion	2
1.2.2	Anaphylaxie	3
1.3	Die Insektengiftallergie	5
1.3.1	Doppelsensibilisierung	5
1.4	Standarddiagnostik der Hymenoptereingiftallergie	6
1.4.1	Anamnese	6
1.4.2	Hauttestung auf Hymenoptereingift	7
1.4.3	In-vitro-Allergie-Diagnostik	7
1.4.4	Tryptase	8
1.4.5	Komponentenbasierte Diagnostik bei Doppelsensibilisierungen	9
1.5	Der Basophilenaktivierungstest	10
1.6	Therapie	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1	Ethikvotum	13
2.2	Patienten	13
2.3	Verwendete Geräte und Materialien	14
2.4	Methoden	16
2.4.1	Anamnese	16
2.4.2	Hauttestung	16
2.4.3	Serologische Diagnostik	17
2.4.4	Diagnostik bei Doppelsensibilisierung	18
2.4.5	Zelluläre Diagnostik: Versuchsablauf der Studie	18
2.4.6	Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)	19
2.4.7	Magentische Zellseparation (MACS)	21
2.4.8	Protokoll Flow CAST	24
2.5	Statistische Auswertung	31

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
3.1	Klinische Charakterisierung	32
3.2	Auswertung Standarddiagnostik	34
3.2.1	Ergebnisse der Anamnese	34
3.2.2	Ergebnisse in der Hauttestung	35
3.2.3	Ergebnisse der Fluoreszenz-Enzym-Immunoassays	36
3.3	Ergebnisse der Basophilenaktivierungstests	39
3.3.1	Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und anhand des spezifischen IgE belegter Sensibilisierung gegen Wespengiftallergie	41
3.3.2	Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und belegter Sensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift anhand des spezifischen IgE	43
3.3.3	Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und belegter Sensibilisierung gegen Bienengiftallergie anhand des spezifischen IgE	45
3.3.4	Graphischer Vergleich der Basophilenaktivierung im BAT <sup>PBMC</sup> und BAT <sup>BG</sup>	46
3.3.5	Spender ohne Nachweis einer Bienen- oder Wespengiftallergie	47
3.3.6	Vergleich der Ergebnisse im BAT <sup>PBMC</sup> und BAT <sup>BG</sup> mit der Standarddiagnostik (sIgE und Hauttestung)	51
3.3.7	Ergebnisse der statistischen Auswertung	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>55</b>
4.1	Bedeutung und Interpretation der Standarddiagnostik	55
4.1.1	Bedeutung der Anamnese	55
4.1.2	Bedeutung der Hauttestungen	56
4.1.3	Bedeutung des spezifischen IgE	58
4.2	Bedeutung der Basophilenaktivierung	60
4.3	Interpretation der Ergebnisse im BAT <sup>PBMC</sup> und BAT <sup>BG</sup> in der vorliegenden Studie	62
4.3.1	Doppelsensibilisierungen	64
4.3.2	Sensitivität, Spezifität	64
<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>

<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>81</b>

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Zielsetzung

In Europa sind mehr als 60 Millionen Menschen von Allergien betroffen [1]. Wie bei jeder Erkrankung ist die richtige Diagnostik das Fundament, um die korrekte Therapie einzuleiten. Es sind zahlreiche Varianten von Allergietests auf dem Markt. Routinemäßig finden der Pricktest, der Intrakutantest und die serologische Diagnostik mit der Bestimmung von Gesamt-Immunglobulin E, nachfolgend Gesamt-IgE genannt, und spezifischen IgE Anwendung. In bestimmten Fällen ist aber zum Beispiel eine Hauttestung nicht möglich oder es ist eine weiterführende Diagnostik notwendig. Dann kann auf den Basophilenaktivierungstest (nachfolgend BAT), zurückgegriffen werden. In der vorliegenden Arbeit geht es speziell um den BAT bei Hymenopterenstichallergie mit dem Ziel die Sensitivität des Tests zu verbessern. Hierzu sollten vor der Allergen-Stimulation mittels einer zellspezifischen Selektion die basophilen Granulozyten angereichert werden und der Einfluss dieser präanalytischen Selektion auf das Testergebnis mit dem klassischen Testverfahren verglichen werden. Bei allen Probanden wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem BAT die Anamnese, die Hauttestung, sowie die serologische Diagnostik durchgeführt.

## 1.2 Immunsystem

Unser Immunsystem dient als biologisches Abwehrsystem gegen verschiedene Erreger und wird in das angeborene und das adaptive Immunsystem eingeteilt. [2] Während das angeborene Immunsystem die erste Abwehrlinie bildet, reagiert das adaptive Immunsystem selektiv und antigenspezifisch [2, 3]. Das angeborene Immunsystem wird auch als unspezifische und zelluläre Immunantwort bezeichnet. Hierzu zählen unter anderem die basophilen Granulozyten. Basophile Granulozyten sind 5-8µm groß und machen nur 1% der Leukozyten aus [4-6]. Sie entwickeln sich aus CD34+ pluripotenten Progenitorstammzellen und KIT-positiven myeloischen Stammzellen im Knochenmark, wo sie sich differenzieren [7]. Sie exprimieren den hochaffinen IgE Rezeptor FcεRI. Ihre metachromatischen, zytoplasmatischen Granula enthalten Histamin, welches per Degranulation freigesetzt wird. Weiterhin wird Ihnen die Produktion und Freisetzung von

Interleukin-4 und Interleukin-3 für die T-Helferzelle-2-Antwort zugeschrieben [8-10].

Ein Antigen ist ein Protein oder Peptid, dass Bestandteil zum Beispiel von Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen ist. Diese Antigene werden als immunreaktives Molekül von Antikörpern erkannt und gebunden [11]. Eine Allergie ist definiert als eine Überreaktion des Körpers, bzw. als eine mangelhafte Toleranzinduktion auf normalerweise harmlose Antigene [12]. Aufgrund unterschiedlicher Pathomechanismen unterscheidet man nach Coombs und Gell vier Typen von Allergien, welche in Tabelle 1 dargestellt sind.

<b>Überempfindlichkeitsreaktion</b>			
<b>Antikörpervermittelt</b>			<b>Zellulär vermittelt</b>
<b>Typ I</b>	<b>Typ II</b>	<b>Typ III</b>	<b>Typ IV</b>
Reaktion vom Soforttyp IgE-vermittelt	Humorale zytotoxische Immunreaktion	Immunkomplex Vermittelte Immunreaktion	Reaktion vom verzögerten Typ T-zell-vermittelt
- Rhinitis allergica - Asthma bronchiale - <b>Hymenopteren-giftallergie</b>	- Arzneimittel-induzierte Zytopenie	- Immunkomplex-Vaskulitis	- Kontaktallergien

**Tabelle 1: Einteilung der Immunreaktionen nach Coombs und Gell [12].**

Die Typ I-Reaktion (Sofort-Typ) ist die häufigste und tritt innerhalb Minuten als IgE-vermittelte Reaktion ein. Hierzu zählt u.a. die Hymenoptereingiftallergie, auf welche weiter unten noch genauer eingegangen werden soll.

Bei der Typ II-Reaktion (Zytotoxischer Typ) werden zytotoxische Killerzellen aktiviert und körpereigenen Zellen durch Lyse zerstört.

Bei der Typ III-Reaktion (Immunkomplex Typ) bilden Antigen und Antikörper Immunkomplexe.

Die Typ IV-Reaktion (Spättyp) tritt erst verzögert nach Stunden bis Tagen auf und hier setzen antigenspezifische T-Zellen Lymphokine frei [12].

### **1.2.1 Typ I-Reaktion**

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei einer Allergie vom Soforttyp um eine Überempfindlichkeit, die durch Allergene hervorgerufen wird [13]. Bei der IgE-Soforttypreaktion kommt es nach Kontakt zum Allergen zu einem schnellen Auftreten der Reaktion innerhalb weniger Minuten. Eine Allgemeinreaktion setzt

meist innerhalb von 30 Minuten ein [14, 15] [16]. Dies hängt mit der Bildung spezifischer IgE gegen das relevante Allergen zusammen [1]. Via Fc-Fragment bindet IgE an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, welcher nach Allergenkontakt aktiviert wird, wodurch es zur Freisetzung von Mediatoren kommt [12, 16].

Nach Erstkontakt mit dem Allergen, wie in diesem Fall dem Hymenopterengift, kommt es zunächst zur Sensibilisierung [13]. Es werden die spezifische IgE-Antikörper gebildet [16, 17]. Erst nach mindestens einem weiteren Stich durch Hymenopteren kommt es zu der typischen allergischen Soforttypreaktion, wobei die spezifischen IgE-Antikörper sich gegen Inhaltsstoffe des Gifts richten. Es kommt zur Quervernetzung des rezeptorgebundenen IgE und damit zur Aktivierung der Zellen und Freisetzung der Mediatoren. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei Patienten, die erneut gestochen werden eine systemische Reaktion auftritt liegt bei 5-10% [18].

### **1.2.2 Anaphylaxie**

Die Maximalvariante der allergischen Soforttypreaktion bezeichnet man als Anaphylaxie, welche als eine akute systemische Reaktion definiert ist [19]. Dabei können je nach Schweregrad unterschiedliche Symptome auftreten, welche in Tabelle 2 aufgeführt sind und je nach Stadium lebensbedrohlich sein können. Insektengifte zählen neben Arzneimitteln und Nahrungsmitteln zu den häufigsten Auslösern einer Anaphylaxie [20]. Bei der Insektengiftanaphylaxie sind Bienen und Wespen die häufigsten Auslöser [21, 22].

Die Inzidenz für eine Anaphylaxie, unabhängig vom Auslöser, wird zwischen 21-58,9 Anaphylaxiefälle pro 100.000 Einwohner angegeben [19, 23]. Liebermann *et al.* sprechen von einer Inzidenz für eine Anaphylaxie nach einem Hymenopterenstich von 3% bei Erwachsenen und 1% bei Kindern [18]. Weitere Quellen geben an, dass es bei bis zu einem Viertel der Allgemeinbevölkerung zu einer gesteigerten örtlichen Reaktion nach einem Stich kommt. Das Risiko ist abhängig von der Exposition und kann bei besonderen Berufsgruppen erhöht sein (z.B. Landwirte, Gärtner, Imker) [14, 24]. Ein wichtiger Risikofaktor ist die Aktivität im Freien und die damit verbundenen Nähe zu Wespen oder Bienen [25].

Weiterhin unterscheidet sich das Risiko je nach Lebensalter und Gesundheitszustand. Zone, Klima, Temperatur und Insektenverhalten können das Risiko eines

möglichen Sticks erhöhen [25]. In Tabelle 3 sind die Risikofaktoren zusammengefasst.

Grad	Haut- & subjektive Allgemeinsymptome	Abdomen	Respirations- trakt	Herz-Kreislauf- System
I	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	-	-	-
II	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	Nausea, Krämpfe, Erbrechen	Rhinorrhoe, Heiserkeit, Dyspnoe	Tachykardie (Anstieg > 20/min), Hypotension (Abfall > 20 mmHg systolisch), Arrhythmie
III	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	Erbrechen, Defäkation	Larynxödem, Bronchospasmus, Zyanose	Schock
IV	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	Erbrechen, Defäkation	Atemstillstand	Kreislaufstillstand

**Tabelle 2: Übersicht über die Anaphylaxiegrade nach Ring und Messner [15].**

Bei einer sehr großen Anzahl von Stichen (über 50) kann es zu systemisch toxischen Reaktionen kommen [26].

Risiko häufiger Exposition	Erhöhtes Risiko schwerer Anaphylaxie
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Imker</li> <li>- Familienangehörige und Nachbarschaft von Imkern</li> <li>- Obst- oder Bäckereiverkäufer, oder ähnliche Berufe</li> <li>- Waldarbeiter, Gärtner, Landwirt,               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bauarbeiter, LKW-Fahrer, Feuerwehrmann,</li> <li>- Aktivitäten im Freien</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schwere Stichanaphylaxie in der Anamnese</li> <li>- Erhöhte basale Serumtryptasekonzentration &gt;11,4 µg/l               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mastozytose</li> </ul> </li> <li>- Kardiovaskuläre Erkrankung               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Asthma bronchiale</li> </ul> </li> <li>- Bestimmte Pharmaka wie β-Blocker               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ACE-Hemmer</li> </ul> </li> <li>- Körperliche oder psychische Belastungssituationen</li> </ul>

**Tabelle 3: Risikofaktoren für eine Anaphylaxie.** (modifiziert nach [27])

### **1.3 Die Insektengiftallergie**

Viele Insekten, wie insbesondere Honigbienen und Wespen lösen lokalisierte Reaktionen aus. Die lokalen Reaktionen werden beschrieben als circa 10 cm große, erythematöse Schwellungen, welche von der Stichstelle ausgehen und innerhalb von Stunden auftreten [28]. Systemische Reaktionen (Anaphylaxie) können innerhalb von Minuten bis Stunden auftreten [19].

Nach aktuellem Kenntnisstand sind zwölf Bienen- und sechs Wespengiftallergene bekannt, wovon einige, sogenannte Markerallergene spezifisch für das jeweilige Tier sind, und damit als Nachweis einer alleinigen Sensibilisierung dienen können [29].

Allergenkomponenten, auf welche mehr als 50% der Patienten eine Sensibilisierung zeigen, werden als Majorallergene bezeichnet. Sie sind abzugrenzen von den Minorallergenen, gegen welche weniger als 10% der Patienten eine Sensibilisierung aufweisen. Komponenten dazwischen werden als Intermediärallergene bezeichnet [30]. Bienen- und Wespengift sind biologisch verwandte Gifte, deren Zusammensetzung unterschiedlich ist und dennoch durch ähnliche Epitope eine Kreuzreaktivität bilden können [14, 16, 31-33].

Bei einem Bienenstich werden etwa 5-140µg und bei einem Wespenstich etwa 3-10µg Gift freigesetzt [4][14, 28]. Bienen- und Wespengifte bestehen zum größten Teil aus Peptiden (50-60%), aus Eiweißen (15-30%) und aus niedermolekularen Substanzen (20-25%). Hauptsächlich verantwortlich für die allergische Sensibilisierung sind die höhermolekularen Proteine, wie Phospholipasen, Hyaluronidasen und Phosphatasen. Peptide und biogene Amine sind für die lokale toxische Reaktion und Schmerzwirkung verantwortlich [34].

#### **1.3.1 Doppelsensibilisierung**

Bei 40-60% der Patienten ergibt sich ein doppelt positives Testergebnis im spezifischen IgE auf natives Bienen- und Wespengift [32]. Dabei können falsch-positive Reaktionen durch eine Kreuzreaktivität auftreten [35]. Die Kreuzreaktivität kann einerseits durch gemeinsame Proteinepitope homologer Allergene hervorgerufen werden und andererseits durch IgE-Antikörper, die gegen kreuzreaktive Glykosylierungen (CCD) der Allergene gerichtet sind [36]. CCD sind sogenannte

Panallergene, die nur in Pflanzen und Insekten vorkommen und sehr selten zu allergischen Reaktionen führen. Damit sind sie in der Regel nicht von klinischer Relevanz [25].

Das Proteinepitop wird durch einen alpha-1,3-verknüpften Fructoserest der Protein-core-Glykosylierung von Insekten gebildet, welcher beim Menschen nicht vorkommt und damit immunogen wirkt. Er kann zur Bildung spezifischer IgE-Antikörper, aber nicht zu lebensbedrohlichen Symptomen führen [36].

Aufgrund der CCD muss man zwischen der oben erwähnten Kreuzreaktivität und einer tatsächlich klinisch relevanten Allergie differenzieren [16, 33]. Hier kann die komponentenbasierte Diagnostik helfen, auf welche weiter unten genauer eingegangen wird [37].

## 1.4 Standarddiagnostik der Hymenopterengiftallergie

Die Allergiediagnostik in der Studie umfasste grundsätzlich fünf Schritte: Anamnese, Hauttestungen, *in-vitro* Allergiediagnostik, den im Labor etablierten Basophilaktivierungstest (BAT) namens Flow2CAST, nachfolgend BAT<sup>PBMC</sup> bezeichnet, erstens durchgeführt entsprechend den Herstellervorgaben und zweitens der gleiche BAT, aber erst nach vorheriger magnetischer Separation der basophilen Granulozyten (unter Verwendung des *Diamond Basophil Isolation Kit, human*), nachfolgend BAT<sup>BG</sup> bezeichnet.

### 1.4.1 Anamnese

Bei der Anamnese sollten der Zeitpunkt und die Anzahl der Stichereignisse, weiterhin die Art und Schwere und der Zeitraum bis zum Auftreten der Symptome erfasst werden. Das auslösende Insekt, die Umstände, die zum Stich geführt haben und das individuelle Risikoprofil sollten erfragt werden [28].

	Wespe	Biene
<b>Umgebung</b>	Nahrungsmittel	Blumen, Bienenstock
<b>Jahreszeit</b>	Sommer bis Spätherbst aktiv	Frühling bis Sommer aktiv
<b>Verhalten</b>	Eher aggressiv	Eher friedlich
<b>Stachel</b>	Insekt behält Stachel	Stachel verbleibt in Haut

Tabelle 4: Hinweise auf das reaktionsauslösende Insekt [27].

Tabelle 4 zeigt leitende Hinweise für die Unterscheidung zwischen Wespe und Biene. Während die Wespe sich eher in der Umgebung von Nahrungsmitteln, im Sommer bis Spätherbst aufhält und eher ein aggressives Verhalten zeigt, findet man die Biene eher in der Nähe von Blumen und Bienenstöcken im Frühling bis Sommer und mit einer eher friedlicheren Art. Nur weibliche Hymenopteren können stechen [28]. Die Biene ist das einzige Insekt der Hymenopteren, welches ihren Stachel in der Haut hinterlässt [38].

### **1.4.2 Hauttestung auf Hymenopterengift**

Der Pricktest ist der häufigste Hauttest zur Abklärung von Soforttyp-Reaktionen und wird gerne als Goldstandard bezeichnet [39-41]. Um falsche Ergebnisse zu vermeiden, sollte der Hauttest aufgrund einer Refraktärphase erst zwei Wochen nach dem Stich erfolgen [27].

Bei der Hauttestung soll das Allergen an die in der Dermis liegenden Mastzellen, welche IgE-Antikörper tragen, herankommen. Nach Mastzellaktivierung kommt es dann zur Freisetzung von Mediatoren. Hierfür ist es notwendig, dass eine Überbrückung von mindestens zwei auf Mastzellen oder basophilen Granulozyten gebundenen spezifischen IgE-Antikörpern stattfindet. Die Mediatoren lösen die Testreaktion aus und es kommt zum Lewis-Trias aus örtlicher Rötung durch Vasodilatation, dermale Ödem durch erhöhte Kapillarpermeabilität und Auslösung eines Umgebungserythems [40]. Das Maximum der Hautreaktion tritt nach 15 Minuten ein [42].

Der Intrakutantest ist sensitiver als der Pricktest. Er wird durchgeführt, falls der Pricktest trotz positiver Anamnese negativ ausfällt. Es muss eine Refraktärzeit von mindestens einer Woche nach anaphylaktischer Reaktion eingehalten werden [40]. Ist der Hauttest insgesamt trotz Anamnese negativ, sollte er einige Wochen später wiederholt werden [25].

### **1.4.3 In-vitro-Allergie-Diagnostik**

#### **1.4.3.1 Immunoglobulin E**

Das Immunoglobulin E (IgE) wurde 1966 entdeckt und ist seitdem in der allergologischen Diagnostik nicht wegzudenken [43] [44, 45]. Es ist beteiligt bei der Abwehr gegen Parasiten und der allergischen Reaktion. IgE bildet mit dem Antigen

einen Komplex, welcher Querverbindungen zu Rezeptoren auf der Oberfläche der Mastzellen bilden und dann zur der erwähnten Reaktionskaskade führt [2].

Die *in-vitro* Tests dienen dem Nachweis zirkulierender IgE-Antikörper. Die am häufigsten angewandte Methode ist die Bestimmung des Gesamt-IgE im Serum und allergenspezifischen IgE. Die Ergebnisse werden in CAP-Klassen (0-6) und kU/l angegeben.

Nach einem Stich kommt es zunächst zu einem Verbrauch von spezifischen IgE-Antikörpern und erst später zu einem Anstieg. Deshalb sollte, falls nur eine Bestimmung stattfindet, diese erst 2 Wochen nach der Stichreaktion erfolgen [5]. Ist das Ergebnis unerwartet negativ, kann es ein paar Wochen später nach dem Stich positiv ausfallen. Man spricht von einer Boosterwirkung des Stichereignisses [14]. Die Testung von Medikamenten und Insektengiften sollte aber auch nicht später als 6 Monate nach dem Allergenkontakt stattfinden, denn die Konzentration des spezifischen IgE nimmt nach dem Stich im Laufe der Zeit ab [9]. Jedoch ist ein positiver Nachweis von spezifischen IgE noch kein Beweis einer Allergie. Bei bis zu 25% der Erwachsenen und 50% aller Kinder können Antikörper gegen Bienen- oder Wespengift nachgewiesen werden [24]. Der *in-vitro*-Test stellt eine Sensibilisierung fest, die nicht zwingend zu allergischen Symptomen führt. Die Ausprägung einer klinisch relevanten Allergie kann er nicht belegen [1]. Falsch negative Ergebnisse können zum Beispiel durch ein sehr niedriges Gesamt-IgE auftreten, wie es bei der Mastozytose vorkommt. Weiterhin kann das Ergebnis negativ sein, wenn der Test in den ersten Tagen nach dem Stichereignis durchgeführt wird und die oben erwähnten zwei Wochen Abstand nicht eingehalten werden [37].

Das Gesamt-IgE wird bestimmt, um die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer atopischen Disposition abzuschätzen. Des Weiteren, um angeborene Immundefekte, aber auch Parasitosen nachzuweisen [37].

#### **1.4.4 Tryptase**

Die Tryptase ist eine mastzellspezifische Serinendoprotease und damit ein wichtiger klinischer Parameter für die Mastzellaktivierung [12]. Mastzellen sind wichtige Effektorzellen in der Anaphylaxie. Erhöhte Werte die dauerhaft über 11,4 µg/l sind, können auf eine Mastozytose hinweisen [46] [47]. Bei Mastozytosen oder

erhöhtem Serumtryptasespiegel ist das Risiko für schwere, lebensbedrohliche Stichreaktionen erhöht [46-48] [49]. Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen während einer allergiespezifischen Immuntherapie oder auch für ein Nichtansprechen dieser Therapie [50].

#### **1.4.5 Komponentenbasierte Diagnostik bei Doppelsensibilisierungen**

Zwischen 45% und 50% der Patienten zeigen eine Doppelsensibilisierung im Hauttest und im spezifischen IgE [2] [14] [16, 29]. Bei bis zu 25% der Bevölkerung lässt sich aber eine stumme und klinisch irrelevante Sensibilisierung nachweisen [14].

Durch eine hohe Peptid-Sequenz-Homologie der Allergene kann es zu der Kreuzreaktivität kommen. Kreuzreagierende Allergene im Bienengift und Wespengift sind Hyaluronidasen (Api m 2 und Ves v 2), Dipeptidylpeptidasen IV (Api m 5 and Ves v 3) und Vitellogenine (Api m 12 und Ves v 6) [29]. Die Abkürzungen setzen sich wie folgt zusammen: Die ersten drei Buchstaben der Gattung, der erste Buchstabe der Spezies und die Reihenfolge der Allergenbeschreibung [35, 37]. Beispiel: Api steht für die Gattung „Apis“ m für die Spezies „mellifera“.

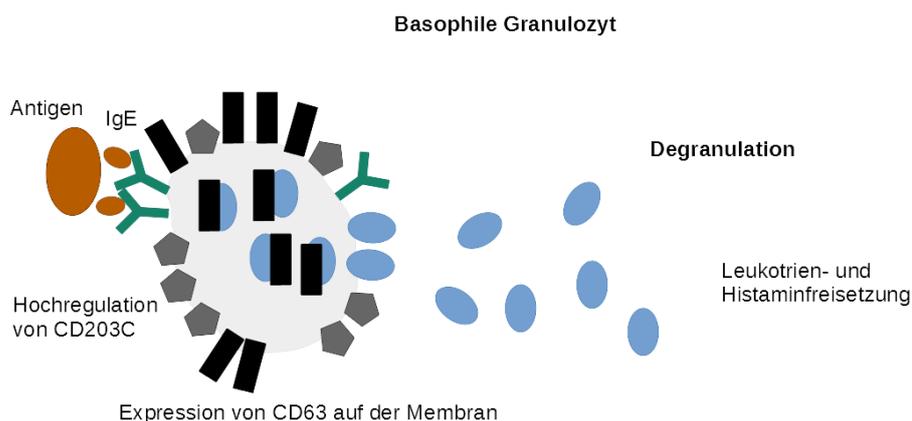
Um eine echte Doppelsensibilisierung zu detektieren werden rekombinante Allergene, die primäre Sensibilisierungen anzeigen, eingesetzt. Rekombinant hergestellte Proteine sind zudem nicht glykosyliert, was den Vorteil bringt keine falsch positiven Befunde durch Bindung von IgE-Molekülen an Glykosidstrukturen hervorzurufen [46]. Kommerziell erhältliche und für die Diagnostik validierte Allergenkomponenten liegen mit rVes 1 und rVes 5 für das Wespengift und rApi m 1, rApi m 2 und rApi m 10 für das Bienengift vor. Mit den heute verfügbaren Tests lassen sich so Sensitivitäten von 85-90% erreichen [3]. Es sind heute 12 Honigbienen und 5 Wespengiftallergene charakterisiert. In der Allergologie der Uniklinik Düsseldorf werden die in Tabelle 5 dargestellten rekombinanten Allergene routinemäßig eingesetzt. Die Tabelle 5 zeigt molekularbiologisch hergestellte Insektengift-Einzelallergene die frei von CCD-Epitopen sind [33]. Die zur serologischen Diagnostik genutzten Phospholipasen weisen keine Sequenzidentität und somit auch keine Kreuzreaktivität auf [51].

Spezies	Allergen	Eigenname	MG kD
Apis mellifera (Honigbiene)	Api m 1	Phospholipase A2	16-20
	Api m 3	Saure Phosphatase	49
	Api m 10	CRP/Icarapin	55
Vespula vulgaris (Ge- meine Wespe)	Ves v 1	Phospholipase A1	35
	Ves v 5	Antigen 5	25

**Tabelle 5: Rekombinante Hymenoptereingiftallergene bei der Biene und Wespe.** (modifiziert nach [25, 31, 51] [52])

## 1.5 Der Basophilenaktivierungstest

Bei dem BAT wird *in-vitro* der Kontakt zwischen Allergen und Zellen nachgeahmt [4, 5]. Beim sensibilisierten Patienten wird bei Inkubation des Blutes mit dem auslösenden Antigen das membrangebundene IgE quervernetzt, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird und die basophilen Granulozyten aktiviert werden. Sind die basophilen Granulozyten aktiviert, exprimieren sie bestimmte Oberflächenmarker wie zum Beispiel CD63 und CD203c auf der Zelloberfläche [53] [54]. An die Aktivierungsmarker werden beim BAT fluoreszierende Antikörper gebunden, sodass dann mittels Durchflusszytometrie die Fluoreszenz gemessen und die Steigung der CD63-positiven basophilen Granulozyten in der Durchflusszytometrie quantifiziert werden kann.



**Abb. 1: Prinzip Aktivierungsmarker.** Das membrangebundene IgE wird nach Antigenkontakt vernetzt und es kommt zur Freisetzung der Mediatoren. Die spezifischen Aktivierungsmarker CD63 und CD203c werden hochreguliert. (modifiziert nach [5])

In der vorliegenden Studie wurde der Marker CD63 eingesetzt, der allerdings kein basophilenspezifischer Marker ist, sondern auch auf anderen Blutzellen exprimiert wird [55]. CD63 ist allerdings der am besten untersuchte Marker, der direkt mit der Basophilendegranulation verbunden ist [9] [53] [56]. CD63 wird auch Gp53 oder *lysosome-associated membrane protein* (LAMP)-3 genannt, gehört zur Transmembran-4 super Familie und wird nach 10 Minuten hochreguliert [57].

Das CD203c (Basophil-Specific Ectoenzyme E-NPP3) gehört zur Gruppe der Ektonukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (E-NPPs) und ist ein Typ II-Transmembranprotein. Es ist ständig auf der Zelloberfläche vorhanden und wird 5 Minuten nach Aktivierung auf der Zelloberfläche stark hochreguliert [57] [58]. CD203c kann zur Identifizierung und als Aktivierungsmarker herangezogen werden und reproduzierbare Testergebnisse liefern [9].

Eberlein *et al.* sprechen davon, dass der BAT sowohl mit CD63, als auch mit CD203c als ein sehr sensibler *in-vitro* Test für die Diagnose von Wespengiftallergie angewendet werden kann [59].

Da CD63 kein basophilenspezifischer Marker ist, muss ein weiterer Marker hinzugefügt werden [5]. Zur weiteren Identifizierung der basophilen Granulozyten wurde der Chemokinrezeptor CCR3 herangezogen. CCR3 (CD193) ist in verschiedenen allergischen Prozessen involviert. Er wird konstitutiv von Basophilen in einer viel höheren Rate im Vergleich zu anderen Leukozytenpopulationen exprimiert [60].

Das Durchflusszytometer wird verwendet um bestimmte Zellpopulationen, selbst in kleinster Zahl zu identifizieren. Eine Negativkontrolle dient dazu eventuelle Hintergrundaktivitäten anzuzeigen. Diese Hintergrundaktivität beträgt etwa 10%, weshalb der Grenzwert zur Identifizierung einer Sensibilisierung durch Hymenopteren gifte auf 10% festgelegt wurde [29].

Im *Flow2Cast Kit* sind zwei Positivkontrollen enthalten. Die erste Positivkontrolle (anti-FcεRI mAk) ahmt die allergische Reaktionskaskade nach, bei der die spezifischen IgE Moleküle rezeptorgebunden kreuzvernetzt werden. Die zweite Positivkontrolle (fMLP) ist ein Tripeptid, bei welchem die basophilen Granulozyten in einem nicht immunologischen Weg aktiviert werden. Circa 20% der Bevölkerung sind *Nonresponder* und reagieren auf eine Positivkontrolle nicht [61].

Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn die Basophilenanzahl unter 150 liegt, oder auch ein langes Intervall zwischen Stich- und Testzeitpunkt lag [2] [29].

In unserer Studie wurden die Ergebnisse des im Labor etablierten BAT namens Flow2CAST, nachfolgend BAT<sup>PBMC</sup> bezeichnet mit dem gleichen BAT, aber erst nach vorheriger magnetischer Separation der basophilen Granulozyten, nachfolgend BAT<sup>BG</sup> bezeichnet, unter Verwendung des *Diamond Basophil Isolation Kit, human* verglichen.

## 1.6 Therapie

Eine langfristige Versorgung besteht aus der Anleitung des Patienten zur Allergenvermeidung und der Selbstbehandlung durch ein Notfallset bei erneutem Stich [28]. Die zur Zeit einzig kurative Behandlungsmöglichkeit bei Bienen- und Wespengiftallergie besteht in der allergenspezifischen Immuntherapie. Die spezifische Immuntherapie, auch Hyposensibilisierung genannt, ist insbesondere bei Patienten mit systemischer Soforttypreaktion (Anaphylaxie II°) indiziert. Hierbei wird das allergieauslösende Gift nach einer Aufdosierungsphase regelmäßig über mehrere Jahre, mindestens allerdings 3 Jahre subkutan injiziert [28]. Das Ziel ist eine immunologische Toleranz zu induzieren. 75-98% der Patienten kann diese Therapie vor einer erneuten, schweren Reaktion schützen [16] [18].

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethikvotum**

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 5826R genehmigt. Alle verwendeten Blutproben stammten von Patientinnen und Patienten der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Düsseldorf. 10 weitere Proben stammten von gesunden, freiwilligen Spendern.

### **2.2 Patienten**

Insgesamt wurde die Untersuchung 59 mal durchgeführt. 11 mal mit gesunden Spendern für die Kontrollgruppe, hiervon war ein Test nicht auswertbar.

Des Weiteren wurden „zu Trainingszwecken“ die Tests an 5 Patienten mit einer Medikamentenallergie durchgeführt, die anamnestisch bestand und bei denen Medikamenten-spezifisches IgE (sIgE) nachgewiesen werden konnte.

Weitere 5 Patienten wurden getestet, die anamnestisch und serologisch nachweislich eine Pollenallergie aufwiesen. Bei diesen 5 Patienten wurde allerdings kein Hauttest durchgeführt. Diese 10 Patienten dienten zum Erproben eines geeigneten Testdurchlaufs und wurden letztendlich nicht zu der Studie hinzugezogen. Die Ergebnisse aller Patienten sind im Anhang aufgeführt.

Weitere 8 Tests, die an Patienten mit Bienen- und Wespengift durchgeführt wurden, konnten infolge nicht vorhandener Vergleichswerte, aufgrund des Fehlens der Hauttestungen oder nicht auswertbarer Ergebnisse nicht für die Studie verwendet werden. Zwei Patienten (Patient Nr. 27 und Patient Nr. 9 s. Anhang) wiesen eine positive Negativkontrolle auf und wurden nicht zur Studie hinzugezogen. Sie versicherten keine Medikamente eingenommen zu haben.

Somit verblieben letztendlich 28 auswertbare Tests aus denen sich das Patientenkollektiv zusammensetzte. Das Patientenkollektiv umfasste noch unbehandelte Wespen- und Bienengiftallergiker mit systemischer Stichreaktion in der Vergangenheit und Nachweis des spezifischen IgE gegen Wespengift (*Vespula vulgaris*) oder Bienengift (*Apis mellifera*) in kU/l bzw. CAP-Klassen, sowie Messung

des Gesamt-IgE im Serum in kU/l. Kein Patient erhielt zum Untersuchungszeitpunkt eine Therapie mit systemischen H1-Antihistaminika, Mastzellstabilisatoren, Glukokortikosteroiden oder anderen Immunsuppressiva.

Übersicht über das Patientenkollektiv:

- 23 Patienten mit systemischer Reaktion auf Wespengift  
Grad I: n=7, Grad II: n=11, Grad III: n=4
- 1 Patient mit systemischer Reaktion auf Wespen- und Bienengift  
Grad 0 (unter Therapie mit Antihistaminika)
- 4 Patienten mit systemischer Reaktion auf Bienengift  
Grad I: n=2, Grad II: n=2 Grad III: n=2
- 10 Patienten in der Kontrollgruppe mit negativer Anamnese bezüglich einer Hymenopterenengiftallergie und negativen RAST für Bienen- und Wespengift. Eine Hauttestung wurde nicht durchgeführt.

### 2.3 Verwendete Geräte und Materialien

Verbrauchsmaterial	Firma	Ort
Vacutainer® Röhrchen	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Einmalhalter	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Vacutainer® Push Button Blutentnahmeset	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	TipOne	Kremsmünster, Österreich
Handschuhe	Nitra-TEX Ansell	Brüssel, Belgien
Einmalspitzen	TipOne	Kremsmünster, Österreich
Serumpipette steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
BD Falcon™ Tubes	BD Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
Ficoll-Plaque PLUS	GE Healthcare GmbH	Solingen, Deutschland
PBS Dulbecco	Thermo Fisher Scientific Inc	Waltham, MA USA
Stripette 25 ml, 10 ml	Costar	New York
Nylonsiebe EASYstrainer 40micrometer	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Trypan Blue Stain (0,4%) gibco	Life Technologies Corporation	USA
Neubauer Zählkammer C-Chip	NanoEnTek Inc.	USA
<b>Flow2-CAST Testkit</b>		
Stimulations-Puffer	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz

Stimulations-Kontrolle PC1 anti-FcεRI	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Stimulationskontrolle PC2 fMLP	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Färbereagenz (anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE mAK)	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Lyse-Reagenz	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
Wasch-Puffer	Bühlmann Laboratories AG	Schönenbuch, Schweiz
<b>FACS-Reagenzien</b>		
FACS-Flow	BD Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
FACS-Rinse	BD Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
FACS-Clean	BD Biosciences GmbH	Heidelberg, Deutschland
<b>Diamond Basophil Isolation Kit human</b>	<b>Miltenyi Biotec</b>	<b>Bergisch Gladbach, Deutschland</b>
Anti-Biotin Micro Beads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
FcεRI Blocking Reagent	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Antibody Cocktail	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD123 MicroBeads	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
<b>Geräte</b>		
Wasserbad	JULABO GmbH	Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich AG	Bäch, Schweiz
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Durchlichtmikroskop Olympus CK40	Olympus GmbH	Hamburg, Deutschland
Heareus Lamin Air, HB2472	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG	Schwabach, Deutschland
ImmunoCAP®	Thermo Fisher Diagnostics GmbH	Freiburg, Deutschland
autoMACS® Pro Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Software CellQuest Pro	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Drucker	Xerox	Oregon, USA
Computer	Apple	Cork, Irland

**Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien.**

## **2.4 Methoden**

Um eine Eignung der Patienten für die Studie festzustellen, wurden die Anamnese, die Hauttestungen und die Serumdiagnostik herangezogen.

### **2.4.1 Anamnese**

Neben der allgemeinen Anamnese wurden individuelle Risikofaktoren dokumentiert. Erfragt wurden der Zeitpunkt, das mutmaßlich stechende Insekt, die Symptomatik und die bisherige Behandlung. Der Fokus lag auf Erfragung der Art und Schwere vorangegangener Stichreaktionen. Eine Übersicht über die Anaphylaxiegrade I-IV gibt Tabelle 2.

### **2.4.2 Hauttestung**

Die Hauttestung erfolgte in der Abteilung für Allergologie und Immundermatologie der Klinik für Dermatologie der Uniklinik Düsseldorf. Hierfür wurde den Patienten das entsprechende Allergen in steigenden Konzentrationen sowohl gepriekt als auch intrakutan injiziert.

#### **2.4.2.1 Pricktest**

Der Pricktest wird an der Volarseite des Unterarms durchgeführt. Ein Tropfen der Testlösung wird auf die Haut aufgetragen und oberflächlich angestochen. Die Ablesung erfolgt nach 15-20 Minuten. Der Pricktest gilt als positiv bei einem Quaddeldurchmesser von  $\geq 3\text{mm}$  [40]. Der Pricktest wurde in den Konzentration  $1\ \mu\text{g/ml}$ ,  $10\ \mu\text{g/ml}$ ,  $100\ \mu\text{g/ml}$  und  $300\ \mu\text{g/ml}$  durchgeführt.

Als Positivkontrolle, um die Reaktionsfähigkeit beurteilen zu können, wurde parallel eine Histamindihydrochloridlösung, und als Negativkontrolle eine physiologische Kochsalzlösung aufgetragen [40].

#### **2.4.2.2 Intrakutantest**

Beim Intrakutantest wurde die allergenhaltige Lösung intrakutan injiziert. Zur Auswertung der Hauttestung wurden Quaddeln  $\geq 5\text{mm}$  als positive Reaktion gewertet. [5, 40] Hier wurden die Konzentrationen  $0,001\ \mu\text{g/ml}$ ,  $0,01\ \mu\text{g/ml}$ ,  $0,1\ \mu\text{g/ml}$ , und  $1,0\ \mu\text{g/ml}$  getestet.

### 2.4.3 Serologische Diagnostik

Für die Probengewinnung wurde venöses Blut mit Serum entnommen, zentrifugiert und auf spezifische IgE-Antikörper gegen Bienen- und Wespengift hin untersucht und diese qualitativ bestimmt.

Die Bestimmung der serologischen Laborparameter erfolgte mittels eines automatisierten Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay (FEIA). Es wurde das Gesamt-IgE (Werte in kU/L), das spezifische IgE gegen die rekombinanten Allergene rApi m 1 (Phospholipase A2), rApi m 3 (saure Phosphatase), rApi m 10 (CRP/Icarapin), rVes v 1 (Phospholipase A1) und rVes v 5 (Antigen 5) und die Serumtryptase mit dem FEIA „ImmunoCAP®“ (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden) *in-vitro* bestimmt.

Das Allergen wird kovalent an eine feste Phase, ein Cellulosederivat, gebunden und reagiert im ersten Schritt mit dem spezifischen IgE in der Patientenserumprobe. Als nächstes wird das spezifische IgE herausgewaschen und IgE bildet Komplexe mit Enzym-markierten Antikörpern. Es folgt ein weiterer Waschgang, bei welchem ungebundenes Enzym-markiertes Anti-IgE entfernt wird. Gebundene Komplexe werden mit einem Entwicklerreagenz inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt und die Fluoreszenz des Eluats wird gemessen. Die Höhe der Fluoreszenz korreliert mit der Höhe des spezifischen IgE der Probe [62].

Klasse	Immuno-CAP (kU/l)
0	<0,35
1	0,35-07
2	0,7-3,5
3	3,5-17,5
4	17,5-50,0

Immuno-CAP (kU/l)	Allergie
<20 kU/l	unwahrscheinlich
20-100 kU/l	möglich
>100 kU/l	wahrscheinlich

Tabelle 7: Einteilung der FEIA-Klassen anhand des spezifischen IgE (kU/l) (linke Seite) sowie Einteilung der Wahrscheinlichkeit einer Allergie anhand des Gesamt-IgE (rechte Seite).

## 2.4.4 Diagnostik bei Doppelsensibilisierung

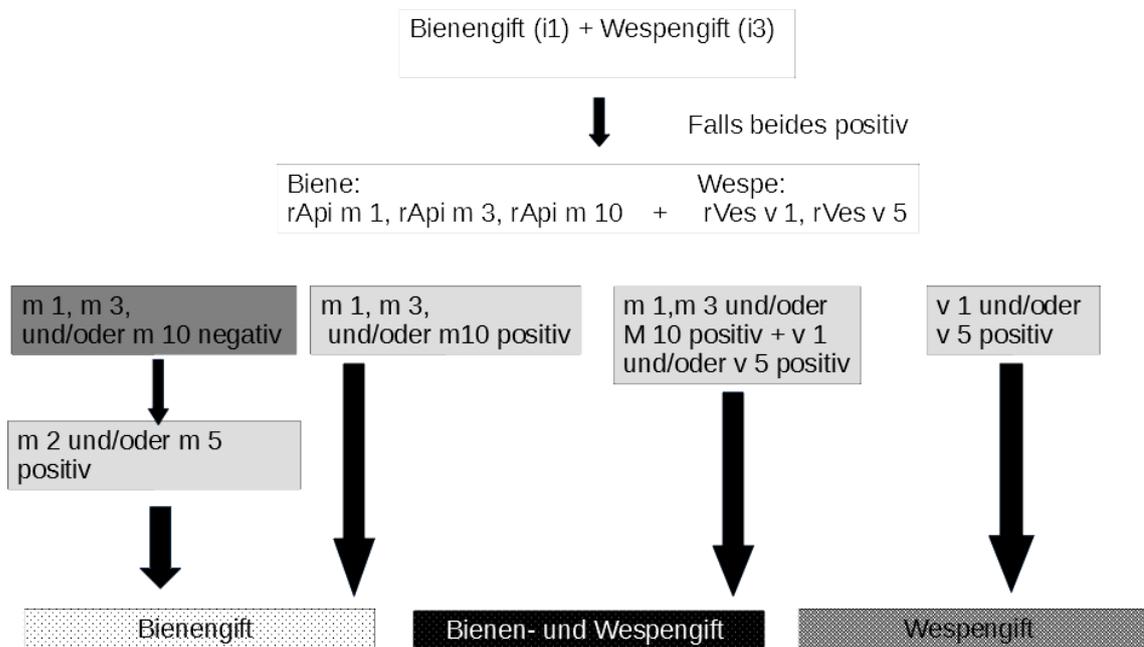


Abb. 2: Entscheidungshilfe bei der Allergiediagnostik [62].

Zeigt die Serumdiagnostik eine Reaktion auf Bienen- und Wespengift an, kann die komponentenbasierte Diagnostik helfen eine Doppelsensibilisierung von Kreuzallergien zu differenzieren. Fallen die Analysen beider Gesamtextrakte positiv aus und zusätzlich die Markerallergene m 1, m 3 und/oder m 10 bei der Biene und v 1 und/oder v 5 bei der Wespe positiv aus, liegt mit großer Sicherheit eine Bienen- und Wespengiftallergie vor.

## 2.4.5 Zelluläre Diagnostik: Versuchsablauf der Studie

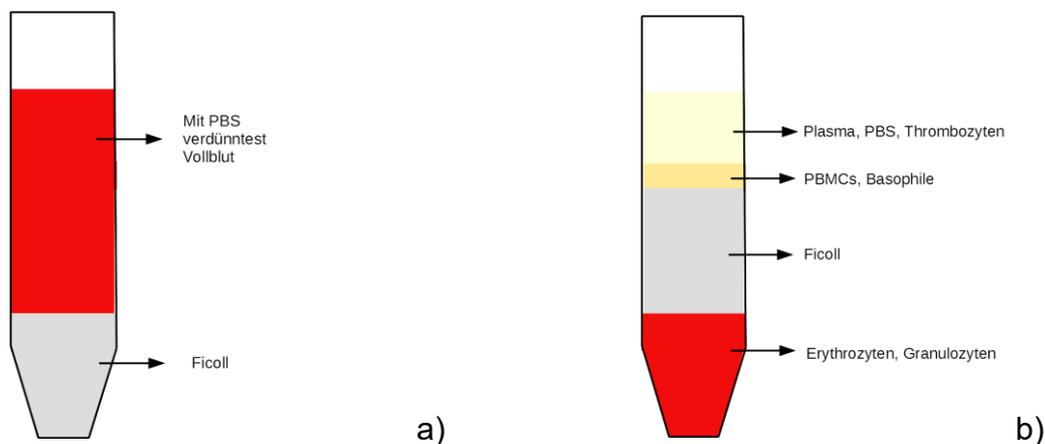
Für den BAT wurde den Patienten zunächst ausreichend venöses Blut in EDTA-Röhrchen entnommen. Bei Anwendung des Flow2CAST nach Herstellerangaben (im Folgenden als BAT<sup>PBMC</sup> bezeichnet) wurde die durchflusszytometrische Erfassung von 300 – 1000 basophilen Granulozyten empfohlen. Im Rahmen des Projektes sollte die Zahl der stimulierten und durchflusszytometrisch erfassten basophilen Granulozyten deutlich erhöht werden. Ausgehend von einer niedrigen Basophilenkonzentration von 0,2% [6] und einer angestrebten maximalen Ausbeute von 100.000 basophilen Granulozyten sollte die Separation mit einer Leu-

kozytenpopulation von  $5 \times 10^8$  starten. Hierzu sind 50-60 ml Vollblut des Probanden notwendig. Die Blutproben sind 24h nutzbar, auch wenn die Reaktivität im Verlauf abnimmt [9].

Ca. 5-10 ml wurden verwendet, um den  $BAT^{PBMC}$  nach dem etablierten Protokoll Flow2CAST nach Herstellerangaben durchzuführen. Weitere ca. 40-50ml dienten der zusätzlichen Separation der basophilen Granulozyten unter zu Hilfeahme des *Diamond Basophil Isolation Kit*. Diese Variante des BAT wird im Folgenden als „ $BAT^{BG}$ “ bezeichnet. Hierzu wurde zunächst nach dem Protokoll „Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)“ (siehe auch 2.4.6.2.) die PBMC Zellen isoliert. Danach wurde mit den PBMC das Protokoll „Magnetische Zellseparation“ (siehe auch 2.4.7) zur Isolierung der basophilen Granulozyten durchgeführt und erst im Anschluss das Protokoll Flow2CAST mit den separierten basophilen Granulozyten durchgeführt.

## 2.4.6 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

### 2.4.6.1 Prinzip der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation



**Abb. 3: Verteilungsmuster a) vor und b) nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation [44].**

Abbildung 3 zeigt das Verteilungsmuster einmal vor der Dichtegradientenzentrifugation, wo das mit PBS verdünnte Vollblut auf dem Ficoll geschichtet ist und einmal nach der Dichtegradientenzentrifugation, wo sich die Schichten von unten

nach oben ergeben: Erythrozyten/Granulozyten, Ficoll, PBMC/basophilen Granulozyten sowie Plasma/PBS/Thrombozyten.

Das Zellseparationsmedium Ficoll ist ein synthetisches Polysaccharid. Es hat eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten und eine geringere Dichte als Erythrozyten und einige Granulozyten, wie die basophilen Granulozyten [63].

Zellen/ Blutbestandteile	Mittlere Dichte (g/cm <sup>3</sup> )
Plasma	1,026
Thrombozyten	1,058
Monozyten	1,065
Lymphozyten	1,070
<b>Basophile</b>	<b>1,079</b>
Neutrophile	1,082
Eosinophile	1,092
Erythrozyten	1,1
<b>Ficoll</b>	<b>1,077 g/ml</b>

**Tabelle 8: Übersicht über mittlere Dichten von humanen Blutzellen, weiteren Blutbestandteilen und Ficoll (modifiziert nach [63]).**

#### **2.4.6.2 Protokoll Isolierung PBMC aus peripherem Blut**

Zur Gewinnung von PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden 60 ml Blut entnommen. Zunächst wurde das Blut aus den EDTA Röhrchen in zwei 50 ml Falcon Röhrchen aufgeteilt und im Verhältnis 1 zu 2 mit PBS verdünnt. Die Zellen können aufgrund ihrer Dichte mithilfe eines Ficoll-Gradienten aufgetrennt werden. Die Ficoll-Trennlösungen nutzen das Zuckerpolymer Ficoll und seine hydrophilen Eigenschaften. Bei der Dichtegradientenzentrifugation erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der Partikel eine Trennung [64]. Dazu wurden in vier 50 ml Falcon Röhrchen jeweils 12,5 ml Ficoll pipettiert, auf welche dann das Blut geschichtet wurde. Nachdem die Zellen 25 Minuten bei 900g ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden, lassen sich die PBMC mittels Pipette absaugen. Während der Zentrifugation aggregie-

ren die Erythrozyten und sedimentieren mit Granulozyten aufgrund einer geringeren Dichte im Vergleich zu Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten und bilden eine Schicht zwischen der untersten Schicht und dem Plasma. Das Pellet wurde mit circa 45µl PBS resuspendiert, bis das Röhrchen voll war und erneut bei 1250 rpm 10 Minuten zentrifugiert. 10 ml Lysepuffer wurden hinzugefügt und die Zellen 10 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1250 rpm bei 4 Grad.

#### **2.4.6.3 Zellzahlbestimmung**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels mikroskopischen Auszählens mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Diese besteht aus vier Großquadranten, mit jeweils einem Volumen von 0,1µl.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl, der zuvor in 10 ml resuspendierten PBS der Zellen mit 90 µl Tryptan-Blau gemischt, um eine 1 zu 10 Verdünnung herzustellen. Das Tryptan-Blau dient zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. 10 µl der Zellen wurden auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Um die Zellzahl zu bestimmen wurde der Mittelwert berechnet und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor,  $10^4$  und dem Volumen im Röhrchen multipliziert.

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \times \text{Volumen}$$

Nach der Bestimmung der Zellzahl folgte eine erneute Zentrifugation mit gleicher Einstellung wie zuvor. Die Zellsuspension wurde mit 500 µl *Running* Puffer resuspendiert und damit für den AutoMacs vorbereitet [65].

#### **2.4.7 Magentische Zellseparation (MACS)**

Die magnetische Zellseparation ist eine Methode, die in den letzten Jahren einer ständigen Weiterentwicklung unterlag. Hierbei kann eine Positiv-Selektion, bei der die relevanten Zellen magnetisch markiert, oder eine Negativ-Selektion, bei der die irrelevanten Zellen markiert werden, gewählt werden [63].

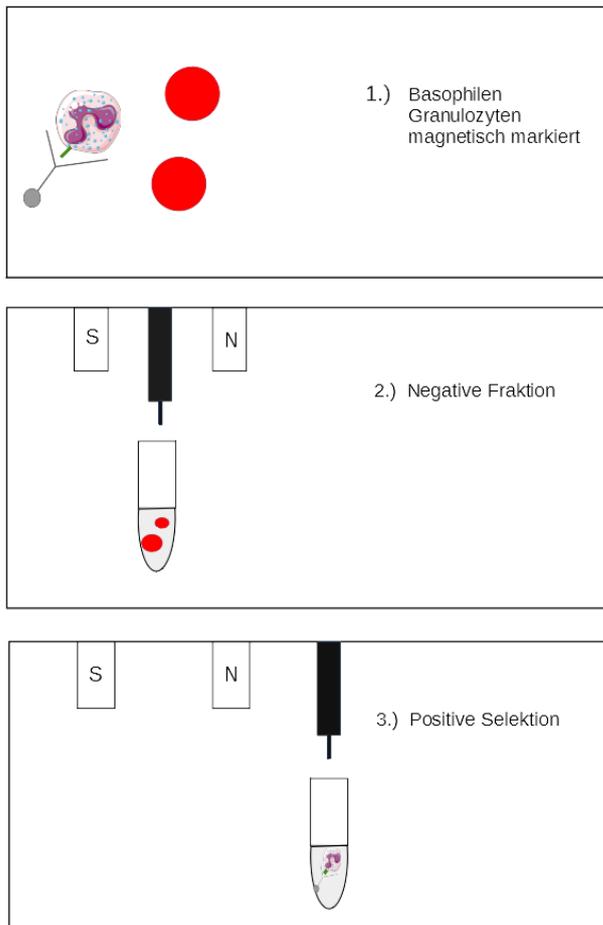
Die Methode beruht darauf, dass charakteristische Oberflächenmarker einer Zellpopulation, wie zum Beispiel die der basophilen Granulozyten mit Antikörpern markiert werden. Diese Antikörper werden dann mit paramagnetischen Partikeln

(*Beads*) gekoppelt. Ist kein beadgekoppelter Antikörper mit der gebrauchten Oberflächenmarker-Spezifität verfügbar, ist zwar keine direkte, aber eine indirekte Markierung möglich. Für die indirekte Markierung wird die Zelle mit einem markerspezifischen Primärantikörper markiert und in einem zweiten Schritt ein magnetbeadgekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt.

Nun kommt der AutoMacs Pro Separator zum Einsatz. Die Trennsäule des AutoMacs enthält ferromagnetische Stahlpartikel und befindet sich in einem starken Magnetfeld. Das Magnetfeld hält alle markierten Zellen zurück und lässt alle unmarkierten durchfließen.

In unserer Studie wurden zunächst mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation PBMC isoliert.

Mit Hilfe des *Diamond Basophil Isolation Kit, human* wurden in einem ersten Schritt alle nicht-basophilen Zellen indirekt magnetisch markiert und die basophilen Granulozyten zunächst anhand einer Negativ-Selektion separiert. Hierfür wird der *Basophil Biotin-Antibody Cocktail* (Cocktail aus Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA, HLA-DR und CD235a) und die *Anti-Biotin MicroBeads* (*MicroBead* gekoppelt an antibiotin Antikörper von der Maus IgG1) verwendet. Das Prinzip besteht nun darin, dass alle magnetisch markierten Zellen von einer Kolumne zurückgehalten werden, die unmarkierten basophile Granulozyten nicht. Das *Diamond Basophil Isolation Kit, human* unterscheidet sich insofern vom *Basophil Isolation Kit, human*, dass hier in einem zweiten Schritt eine Positiv-Selektion erfolgt, bei welchem die Basophilen zusätzlich mit *CD123 MicroBeads* markiert werden, während unmarkierte ausgeschwemmt werden, sodass eine Isolation der basophilen Granulozyten von nahezu 100% erreicht werden soll. [66] CD123 wird auch Interleukin-3 Rezeptor genannt und wird auf plasmazytischen dendritischen Zellen und basophile Granulozyten exprimiert [54].



**Abb. 4: Prinzip der magnetischen Zellmarkierung** (modifiziert nach [66]).

Abbildung 4 zeigt das Prinzip der magnetischen Zellmarkierung der basophilen Granulozyten im zweiten Schritt. Die basophilen Granulozyten wurden magnetisch markiert. Dann wurde zunächst die negative Fraktion aller unmarkierten Zellen aussortiert. Im nächsten Schritt wurden alle markierten Zellen als positive Selektion aussortiert.

#### 2.4.7.1 Protokoll magnetische Zellseparation

Im ersten Schritt wurde das Programm *DepleteS* gewählt. Die drei Ansätze wurden in einem gekühlten Reck platziert. In dem Röhrchen „Originale“ befand sich nun die Probe. In das Röhrchen „Negative“ wurden die Basophilen sortiert und in das Röhrchen „Positive“ alle restlichen Zellen aussortiert.

Im zweiten Schritt wurden die Zellen bei 300xg 10 Minuten zentrifugiert. Danach mit 100µl CD123 *MicroBeads* gemischt und 15 Minuten kaltgestellt.

Es wurden 2ml kalter *AutoMacs* Puffer hinzugegeben und erneut bei 300xg 10 Minuten zentrifugiert.

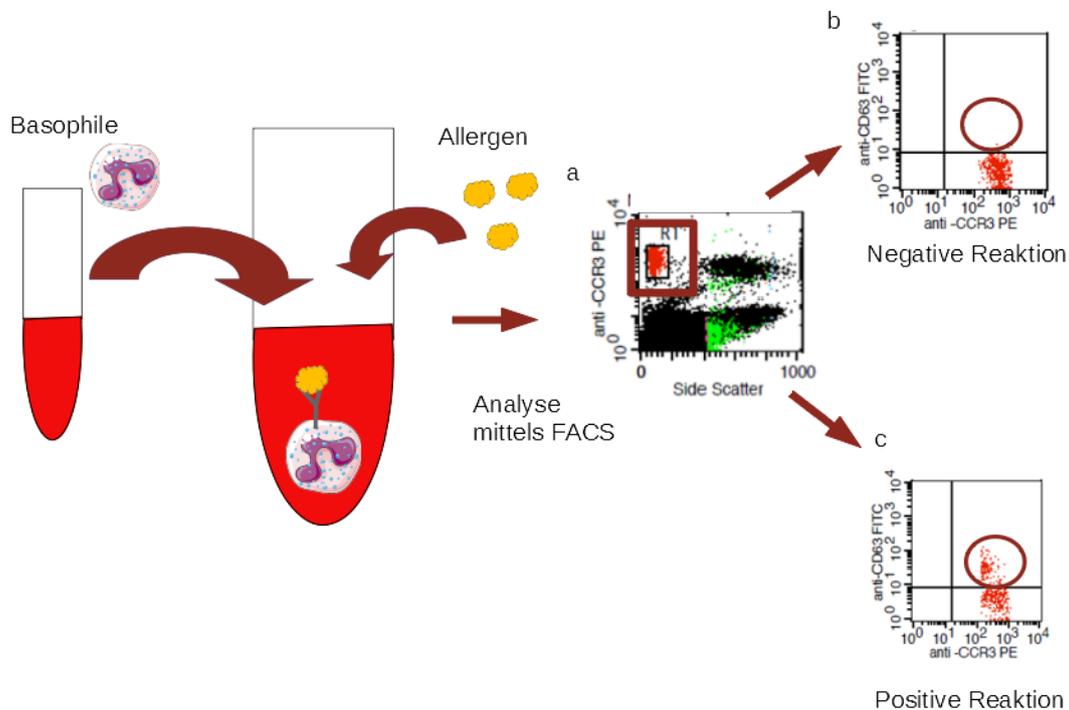
Zur Übergabe in den *AutoMacs* wurden 500µl Puffer hinzugegeben.

Das Programm *PosseID2* führte nun eine positive Selektion der basophilen Granulozyten durch.

Es wurden 300-350µl PBS Puffer für den BAT hinzugefügt.

Die erfolgreiche Aufreinigung wurde mit einer erneuten Anfärbung der Zellen mittels Tryptan-Blaus und anschließender FACS-Analyse kontrolliert [66].

## 2.4.8 Protokoll Flow CAST



**Abb. 5: BAT bei Typ I-Allergie.** Das Vollblut wird mit den Allergenen inkubiert. In der FACS-Analyse werden die basophilen Granulozyten identifiziert und deren spezifische Aktivierung über den Oberflächenmarker CD63 dargestellt. **a)** Selektion der basophilen Granulozyten mittels CCR3-PE/Side Scatter, **b)** Negativkontrolle bei einem Patienten mit Wespengiftallergie, **c)** positive Reaktion bei einem Patienten mit Wespengiftallergie.

Flow2CAST ist ein BAT mit dessen Hilfe man Allergien vom Soforttyp nachweisen kann. Nach Kontakt mit dem spezifischen Allergen erfolgt eine Zellstimulation. Die Expression von CD63 auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten wird dann *in-vitro* bestimmt.

#### **2.4.8.1 Vorbereitung der Reagenzien**

Der Stimulationspuffer (enthält Kalzium, Heparin, Interleukin-3) wurde mit 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst und die beiden Stimulationskontrollen hergestellt:

Die Stimulations-Kontrolle anti-FcεRI mAk und die Stimulations-Kontrolle fMLP wurden jeweils mit 1,5 ml Stimulations-Puffer gelöst.

Das Lyse-Reagenz wurde mit 225ml deionisiertes Wasser verdünnt. Das Färbereagenz (anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE mAk) und der Waschpuffer wurden bereits gebrauchsfertig geliefert.

#### **2.4.8.2 Vorbereitung der Hymenopteregifte**

Für die Studie wurde Bienen- und Wespengift herangezogen. Bei den Allergenen handelt es sich um Allergene der Firma Bühlmann, die in lyophilisierter Form geliefert und bei 2-8°C gelagert wurden. Diese wurden für jeden Test frisch aufgetaut. Es wurden je zwei verschiedene Konzentrationen getestet und eine Verdünnungsreihe angesetzt:

Die Allergene wurden in 250µl Stimulationspuffer aufgelöst. Für die weitere Verdünnung wurden nun 50µl der ersten Verdünnung mit 200µl Stimulationspuffer vermischt.

Daraus ergaben sich folgende Konzentrationen:

Allergen unverdünnt: 11,5 ng/ml

Allergen verdünnt: 2,3 ng/ml

#### **2.4.8.3 Testprinzip und Durchführung**

Beim Protokoll Flow2CAST wurden 5 Ansätze (Negativkontrolle, Positivkontrolle 1 und 2, und zwei Verdünnungen) vorbereitet. Die Blutprobe wurde durch vorsichtiges invertieren des Blutentnahmeröhrchens gemischt. In die Negativkontrolle wurde 50µl Stimulationspuffer, in die Positivkontrolle 1 50µl der Stimulationskontrolllösung (anti-FcεRI mAk), in die Positivkontrolle 2 50µl Stimulationskontrolllösung 2 (fMLP) und in den Allergenansatz 50µl verdünntes Allergen gegeben. Anschließend kamen jeweils 100µl Stimulationspuffer und 50µl Vollblut in EDTA hinzu und wurden mit der Pipette durchmischt.

Danach wurden in jeden Ansatz 20µl Färbereagenz pipettiert und es folgte eine 15-minütige Inkubation in 37 Grad warmen Wasserbad.

Nach Zugabe 2ml vorgewärmtem Lysereagenz zu jedem Röhrchen wurden die Ansätze 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

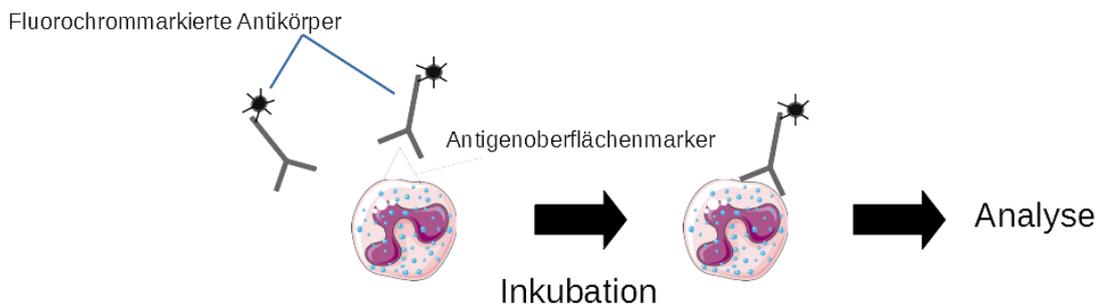
Schließlich wurden die Proben 10 Minuten bei 3500rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellpellets in 300µl Waschpuffer resuspendiert.

Die FACS-Analyse folgte im Anschluss.

#### 2.4.8.4 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte direkt im Anschluss mit dem BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer, (Becton-Dickinson, Heidelberg; Software: BD CellQuest™Pro) mit der Laserdiode bei 488 nm und den 4 Parametern: 1. Forward Scatter, 2.Side Scatter 3.-4. Zwei Kanäle für die Fluorochrome FITC und PE (FL1, FL2), um die aktivierten basophilen Granulozyten zu detektieren. Genaueres zur durchflusszytometrischen Datenanalyse und Auswertung wird nun im folgenden Abschnitt erläutert.

#### 2.4.8.5 Grundlagen der Durchflusszytometrie



**Abb. 6: Grundlage der Durchflusszytometrie.** Die fluorochrommarkierten Antikörper koppeln spezifisch an die Antigene auf der Zelloberfläche.

Bei einer durchflusszytometrischen Messung befinden sich die markierten Zellen in einem laminaren Probenstrom in welchem sie einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden. Hierbei werden Informationen über die Zellgröße, die Granularität und die Spezifität der gebundenen Antikörper gesammelt. Diese Informationen entstehen durch die gestreute und reflektierte Strahlung des Lasers und durch das emittierte Licht der fluoreszenzmarkierten Antikörper [67].

Abbildung 6 stellt dar, wie die basophilen Granulozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern besetzt werden, indem sie spezifisch an Antigene auf der Zelloberfläche koppeln. Bei der Durchflusszytometrie können Zellen von 0,2-150  $\mu\text{m}$  Größe gemessen und analysiert werden, indem sie einzeln einen Laserstrahl passieren. Dabei werden die relative Partikelgröße, die relative Granularität und die relative Fluoreszenzintensität gemessen. Der Transport findet durch ein Flüssigkeitssystem statt, welcher die Zellen hydrodynamisch fokussiert. Der Laser, also das optische System, ermittelt wie die Zellen das einfallende Licht streuen und die Fluoreszenz emittieren. Die entsprechenden Lichtsignale werden dann zu Detektoren geleitet und mittels elektronischer Systeme weiterverarbeitet [65].

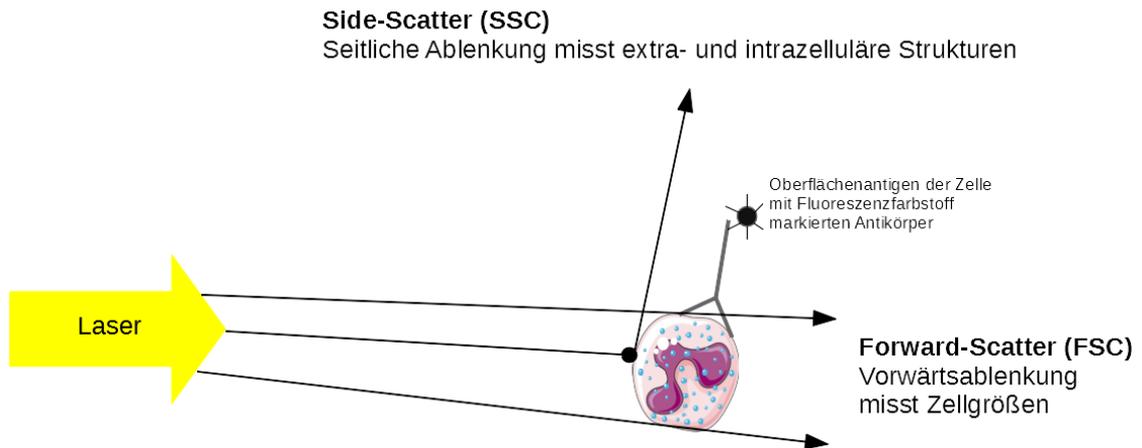
#### **2.4.8.6 Lichtstreuung**

Lichtstreuung tritt dann auf, wenn ein Partikel einer kolloidalen Lösung das einfallende Laserlicht ablenkt (TYNDALL-Effekt). Das Maß dieser Streuung ist abhängig von der Größe des Partikels, seiner internen Komplexität, der Zellmembran, dem Kern, der weiteren granulären Zellkomponenten, der Zellform und der Oberflächenbeschaffenheit.

Man unterscheidet Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, welche bei gleichzeitiger Messung und korrelierter Darstellung die Unterscheidung von Zelltypen in einer heterogenen Zellpopulation ermöglicht.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC) ist proportional zur Zelloberfläche oder -größe und entspricht hauptsächlich dem gebeugten Licht. Es wird entlang der Achse des einfallenden Lichts mittels einer Photodiode detektiert.

Das Seitwärtsstreulicht (SSC) entsteht aus dem gebrochenen und reflektierten Licht und ist proportional zur Zellgranularität. Abbildung 7 zeigt die Merkmale der Lichtstreuung [65].



**Abb. 7: Merkmale der Lichtstreuung.** Seitwärtsstreulichtdetektor (Side-Scatter, SSC), die seitliche Ablenkung misst extra- und intrazelluläre Strukturen, ist proportional zur Zellgranularität. Der Vorwärtsstreulichtdetektor (Forward-Scatter, FSC), die Vorwärtsablenkung misst Zellgrößen.

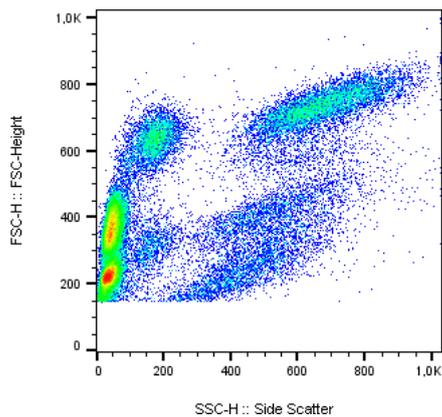
Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu den gebundenen Fluorochromen, das heißt, dass desto mehr gebundene Fluorochrome vorhanden sind, umso mehr Fluoreszenz emittiert wird.

Die eingesetzten Fluorochrome sind das Fluorescein Isothiocyanat (FITC), ein gelbgrüner Farbstoff und das R-Phycoerythrin (R-PE), ein roter Farbstoff [67]. Mittels der Fluoreszenzfarbstoffe können bestimmte Zelltypen, so auch die basophilen Granulozyten identifiziert werden, da der Farbstoff an monoklonale Antikörper bindet. Das Färbemuster korreliert mit den entsprechenden FSC- und SSC-Daten jeder Subpopulation [65].

#### 2.4.8.7 Identifizierung der basophilen Granulozyten im Flow-CAST

Die Messdaten wurden hier mittels einer Zweiparameterdarstellung als Punktwolken-Diagramm dargestellt und konnten mittels *Gating* auf die Subpopulation der basophilen Granulozyten eingeschränkt werden. Das *Gating* beschreibt das Setzen eines *Gates* (Auswahlfenster).

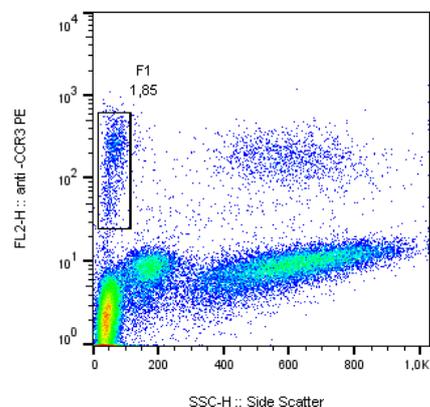
### 2.4.8.7.1 BAT<sup>PBMC</sup> bei Wespengiftallergie



**Abb. 8: Drei unterschiedliche Populationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) im SSC-Diagramm.**

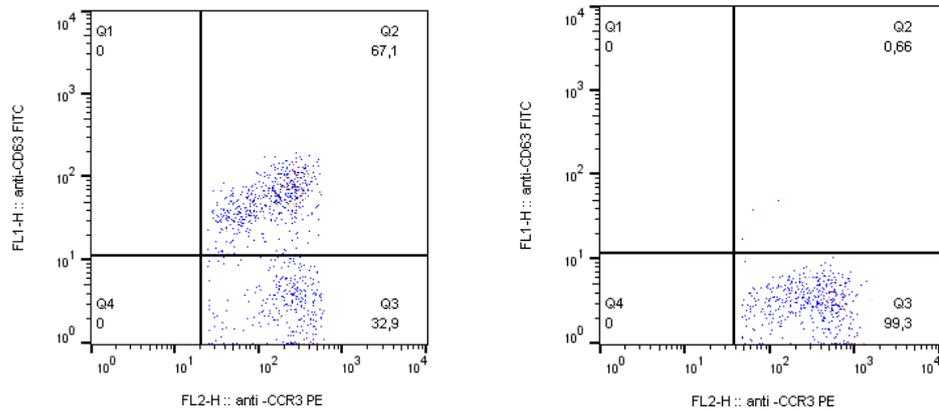
Die Analyse besteht aus zwei Schritten:

Im ersten Schritt wird ein Fenster 1 (R1) so gesetzt, dass die gesamten basophilen Granulozyten welche CCR3 positiv sind eingeschlossen sind:



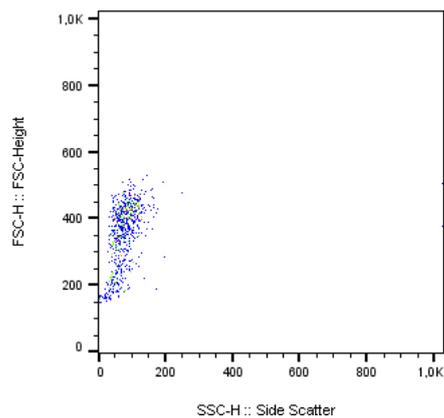
**Abb. 9: Selektion von basophilen Granulozyten.** R1 repräsentiert die CCR3 positiven basophilen Granulozyten.

Im zweiten Schritt werden dann die CD63 positiven basophilen Granulozyten selektiert, also der Prozentsatz der hell-fluoreszierten, aktivierten Zellen im Vergleich zu der Gesamtzahl aller basophilen Zellen berechnet.

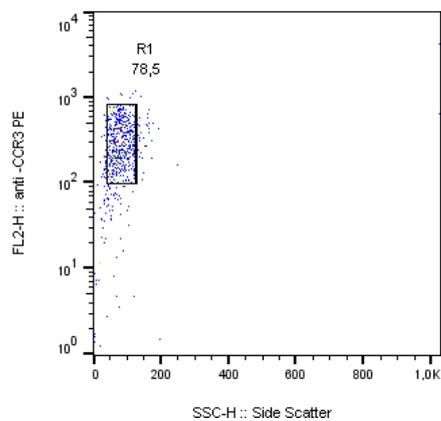


**Abb. 10: Bestimmung Prozentsatz der CD63-positiven Zellen (Q2) im Vergleich zu der Gesamtzahl aller basophilen Granulozyten (Q2 und Q4).** Links Patient mit Wespengiftallergie. Rechts gesunder Spender ohne Nachweis einer Wespengiftallergie.

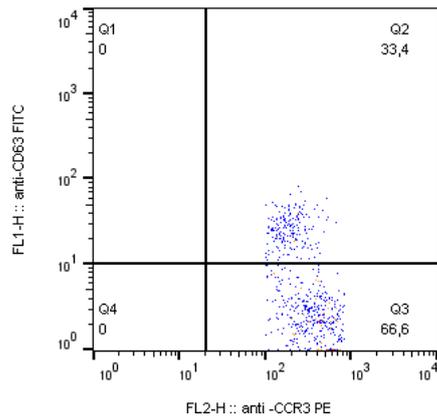
#### 2.4.8.7.2 BAT<sup>BG</sup> nach vorheriger Selektion der Basophilen Granulozyten



**Abb. 11: Basophilen Granulozyten im FSC/SSC Diagramm.**



**Abb. 12: R1 repräsentiert die CCR3 positiven basophilen Granulozyten.**



**Abb. 13: Bestimmung Prozentsatz der CD63-positiven Zellen (Q2) im Vergleich zu der Gesamtzahl aller Basophilen Granulozyten (Q2 und Q4).**

## 2.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse des BAT sind als prozentuale Werte der Basophilenaktivierung angegeben. Um die Zuverlässigkeit des Testverfahren beurteilen zu können, wurde die Sensitivität und die Spezifität herangezogen.

Sensitivität beschreibt die Fähigkeit eines Tests einen Patienten mit Krankheit korrekt zu identifizieren.

**Sensitivität** = Anzahl richtig positiver Testergebnisse/(Anzahl richtig positiver + Anzahl falsch negativer)

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit einen gesunden Patienten auch als gesund zu erkennen.

**Spezifität** = Anzahl richtig negativer Tests/(Anzahl richtig negativer Tests+ falsch positiver Tests)

Weiterhin wurde ein nichtparametrisches Verfahren mit Analysen durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für unpaarige Daten verwendet (SPSS 26.0). Die graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism 8.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Charakterisierung

Das Patientenkollektiv, welches in Tabelle 9 dargestellt ist, setzte sich zusammen aus Patienten mit positiver Anamnese bezüglich einer Typ I-Wespen- oder Bienengiftallergie, sowie Nachweis von sIgE für Bienen- und/oder Wespengiftallergie vor Beginn einer spezifischen Immuntherapie.

Letztendlich wurden in die Studie 28 Patienten mit nachgewiesener Hymenoptereingift-Allergie einbezogen. Davon waren 23 (82%) Frauen und 5 (18%) Männer. Der jüngste Patient war 34 und der älteste Patient 78 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 55 Jahre.

2 Patienten (7,14%) konnten in den Grad 0, 7 Patienten (25%) in den Grad 1, 13 Patienten (53,54%) in den Grad 2, 6 Patienten (21,43%) in den Grad 3 und keiner in den Grad 4 der anaphylaktischen Reaktion eingeteilt werden.

<b>Patienten mit Hymenoptereingiftallergie n=28</b>		
<b>Alter (Jahren)</b>	55 (34-78)	
<b>Geschlecht (w/m)</b>	23/5	
<b>Gesamt IgE (kU/l)</b>	78,67 (6,64-393)	
<b>Tryptase (µg/l)</b>	4,0 (1,71-16,4)	
<b>Schweregrad der Anaphylaxie</b>		
	(n)	(%)
<b>Grad 0</b>	2	7,14
<b>Grad 1</b>	7	25,00
<b>Grad 2</b>	13	53,54
<b>Grad 3</b>	6	21,43
<b>Grad 4</b>	0	0

**Tabelle 9: Klinische Charakterisierung der Patientengruppen.**



## 3.2 Auswertung Standarddiagnostik

Oft ist die Anamnese nicht eindeutig. Bei unklaren Insektenstichen dient die Standarddiagnostik dazu, einen anamnestisch begründeten Verdacht einer Insektengiftallergie zu verifizieren, um im Hinblick auf die spezifische Immuntherapie die richtige Diagnose zu stellen.

### 3.2.1 Ergebnisse der Anamnese

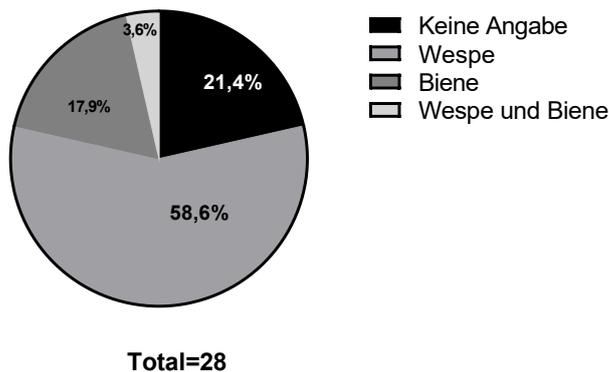


Abb. 15: Angaben der Stichanamnese bei 28 Patienten, Häufigkeit in Prozent.

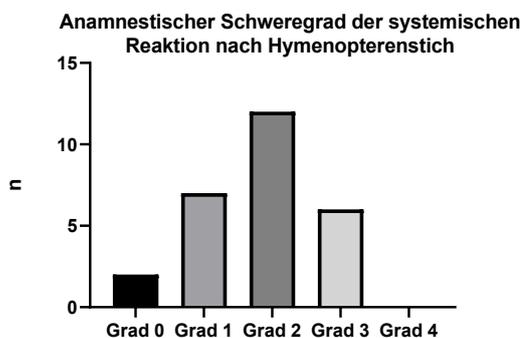


Abb. 16: Anzahl der Patienten eingeteilt in Schweregrad 0-4.

Eine Stich-Anamnese wurde bei 23 der 28 Patienten von den Patienten angegeben. Abbildung 15 zeigt die Häufigkeit der Angaben der Stichanamnese. 17 Patienten (58,6%) gaben an einmal oder mehrmals von einer Wespe gestochen worden zu sein und stimmten dabei mit ihrer Annahme mit der Behandlungsdiagnose überein. 5 (17,9%) gaben an, von einer Biene gestochen worden zu sein, wobei bei diesen 5 ebenfalls eine Bienengiftallergie als Behandlungsdiagnose

festgestellt wurde. Darunter gaben sich zwei als Imker aus. 1 Patient gab an bereits von einer Biene und einer Wespe gestochen wurden zu sein, wobei diagnostisch nur eine Wespengiftallergie festgestellt wurde.

### **3.2.2 Ergebnisse in der Hauttestung**

Bei allen 4 Patienten mit der Behandlungsdiagnose einer alleinigen Bienengiftallergie zeigte sich in der Pricktestung ein positives Ergebnis. Alle vier reagierten auf die Konzentration mit 300µg/ml und 100 µg/ml, ein Patient zusätzlich auf 10µg/ml und einer auf 10µg/ml und auf 1 µg/ml.

Bei Patienten mit der Behandlungsdiagnose einer Wespengiftallergie kam es, im Bezug zu dieser, zu falsch negativen und falsch positiven Ergebnissen in den Hauttestungen. Bei Patient Nr. 37 zeigte die Pricktestung bei 100 µg/ml eine falsch positive Reaktion. Prick- und Intrakutantestung mit Wespengift verblieben falsch negativ. Bei den Patienten Nr. 23, 34, und 36 kam es zu falsch positiven Ergebnissen bei Bienengift.

Patient Nr. 11, 31, 34 und 53 reagierten in der Pricktestung nicht, dafür in der sensitiveren Intrakutantestung positiv auf Wespengift.

Nur bei einem Patienten konnte eine echte Bienen- und Wespengiftallergie als Behandlungsdiagnose festgestellt werden. Er reagierte im Pricktest positiv auf Bienen- und Wespengift und jeweils auf die Konzentrationen 100 µg/ml und 300 µg/ml.

War der Pricktest bereits positiv, wurde keine Intrakutantestung durchgeführt. Bei dem Pricktest auf Wespengift reagierten die meisten Patienten auf eine Allergenkonzentration von 300 µg/ml, danach auf 100µg/ml, 9 Patienten auf 10 µg/ml und nur ein Patient auf 1µg/ml. 9 Patienten reagierten im Pricktest auf Wespengift nicht, 4 davon reagierten in der Intrakutantestung, einer verblieb auch in der Intrakutantestung falsch negativ. Bei den anderen 4 stellte sich die Diagnose einer alleinigen Bienengiftallergie.

Bei dem Pricktest auf Bienengift reagierten 8 Patienten auf eine Testung mit 300µg/ml und 7 davon auch auf 100µg/ml.

Damit reagierten insgesamt 86% der Patienten auf eine Testung mit 300µg/ml, 68% auf 100µg/ml, 32% auf 10 µg/ml und 3,6% auf 1µg/ml. Die Ergebnisse der Hauttestung sind im Anhang (s. Tabelle 6 des Anhangs) dargestellt.

### 3.2.3 Ergebnisse der Fluoreszenz-Enzym-Immunoassays

#### 3.2.3.1 Gesamt-IgE

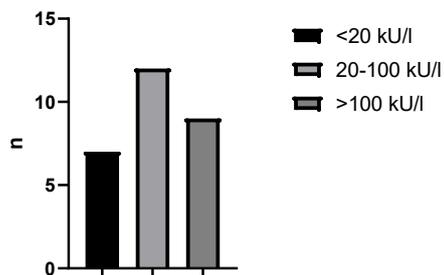


Abb. 17: Ergebnisse im Gesamt-IgE, Anzahl der Patienten innerhalb der drei Klassen.

Sieben Patienten zeigten eine Aktivierung von unter 20kU/l, zwölf von 20-100kU/l und neun über 100 kU/l.

#### 3.2.3.2 Tryptase

Bei fast allen Patienten lag der Tryptase-Wert im Normbereich, also unter 13,5µg/l. Hier wurden Werte zwischen 1,71µg/l und 7,92µg/l gemessen. Nur bei einem Patienten, Patient Nr. 29 wurde ein erhöhter Wert von 16,4µg/l gemessen.

### 3.2.3.3 Komponentenbasierte Diagnostik mit rekombinanten Allergenen

10 Patienten zeigten im FEIA ein positives Ergebnis auf Bienen- und Wespengift. Nur bei einem von diesen 10 Patienten ließ sich dieses Ergebnis mittels komponentenbasierter Diagnostik bestätigen und es lag eine echte Doppelsensibilisierung, welche von der Kreuzallergie abzugrenzen ist, vor. Der BAT fiel in 8 Fällen auf die Bienentestung negativ aus. Eine echte Doppelsensibilisierung auf Bienen- und Wespengiftallergie konnte in einem Fall dargestellt werden. Pat Nr. 12 reagierte auf die Komponenten rVes v 5, rApi m 1 und rApi m 3 und ist damit gegen beide Gifte doppelsensibilisiert (s. auch Auswertungsschema Abb. 2). Eine Reaktion auf die Komponenten rApi m 3 und rVes v 5 zeigt eine „echte Doppelsensibilisierung“ an. In den anderen 8 Fällen ist von einer Kreuzreaktivität auszugehen. Pat Nr. 26, 33, 34, 35, 37, 43 und 53 zeigten im FEIA auf natives Bienengift zusätzlich eine positive Reaktion an, allerdings nicht in der weiterführenden Komponentendiagnostik. Bei Patient 21, bei welchem eine Bienengiftallergie festgestellt werden konnte, kam es zusätzlich zu einer Kreuzallergie auf Wespengift.

Patient	rVes v 5	rVes v 1	Wespen gift	Bienengift	rApi m 1	rApi m 3	rApi m 10	Gesamt IgE (in kU/l)	Trypsinase (ug/l)	Behandlungsdiagnose
11	2	2	2	0	0	/	0	6,64	7,92	Wespengiftallergie
12	2	0	2	4	4	3	0	132	7,35	Wespengiftallergie + Bienengiftallergie
20	0	0	0	4	4	2	2	74,2	3,71	Bienengiftallergie
21	0	0	1	3	2	0	0	8,04	2,04	Bienengiftallergie
23	2	0	2	0	0	0	0	21,9	3,87	Wespengiftallergie
25	3	0	3	0	0	0	0	16,6	4,51	Wespengiftallergie
26	4	3	4	2	0	0	0	150	5,76	Wespengiftallergie
29	4	0	3	0	0	0	0	46,9	16,4	Wespengiftallergie

Patient	rVes v 5	rVes v 1	Wespen gift	Bienengift	rApi m 1	rApi m 3	rApi m 10	Gesamt IgE (in kU/l)	Trypsinase (ug/l)	Behandlungsdiagnose
30	<b>3</b>	0	<b>3</b>	0	/	/	/	51	5,41	Wespen gift-allergie
31	0	<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	14,9	6,52	Wespen gift-allergie
32	0	0	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	61,8	2,38	Bienengift-allergie
33	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	0	0	0	<b>183</b>	3,79	Wespen gift-allergie
34	0	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	0	/	0	87,3	1,75	Wespen gift-allergie
35	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	0	0	0	<b>393</b>	2,07	Wespen gift-allergie
36	<b>3</b>	0	<b>3</b>	0	0	0	0	<b>195</b>	4,17	Wespen gift-allergie
37	<b>3</b>	0	<b>3</b>	<b>1</b>	/	/	/	92,9	5,19	Wespen gift-allergie
39	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	0	0	/	/	<b>123</b>	2,96	Wespen gift-allergie
40	<b>2</b>	0	<b>2</b>	0	0	0	0	8,76	5,37	Wespen gift-allergie
42	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	0	/	/	/	23,7	2,67	Wespen gift-allergie
43	<b>2</b>	0	<b>3</b>	<b>1</b>	0	0	0	9,39	4,73	Wespen gift-allergie
44	<b>4</b>	0	<b>4</b>	0	0	0	0	56,2	1,71	Wespen gift-allergie
45	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	0	0	0	0	<b>133</b>	5,25	Wespen gift-allergie
46	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	0	0	0	0	84	2,04	Wespen gift-allergie
48	<b>3</b>	0	<b>3</b>	0	0	0	0	22,2	1,94	Wespen gift-allergie
49	0	0	0	1	1	0	0	8,13	2,14	Bienengift-allergie
53	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	0	0	0	<b>169,1</b>	2,07	Wespen gift-allergie
54	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	0	0	0	0	40,9	1,98	Wespen gift-allergie
56	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	0	0	0	0	17,9	3,33	Wespen gift-allergie

**Tabelle 11: Ergebnisse der komponentenbasierten Diagnostik mittels FEIA bei Patienten mit anamnestisch belegter anaphylaktischer Reaktion.**

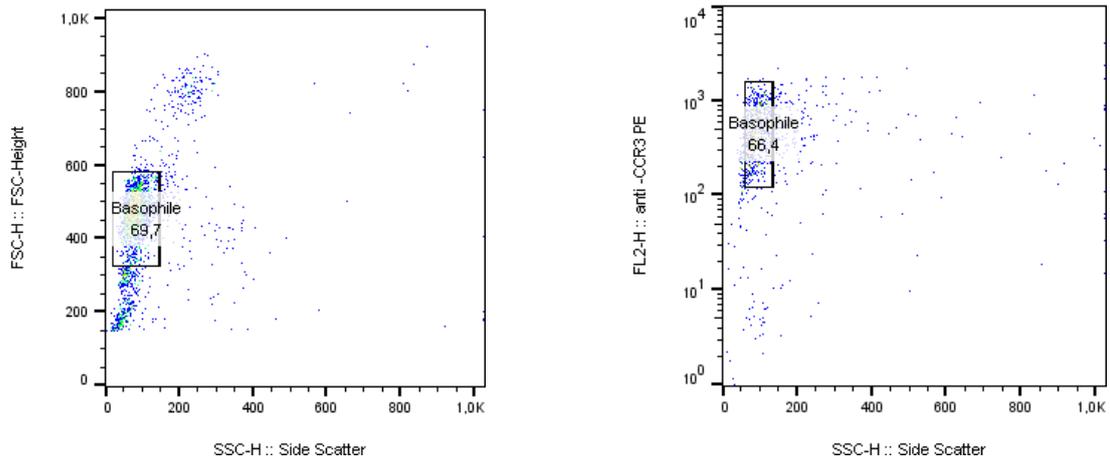
Positive Werte sind fett gedruckt, Positive Werte im Sinne einer Kreuzallergie sind grau hinterlegt

### 3.3 Ergebnisse der Basophilenaktivierungstests

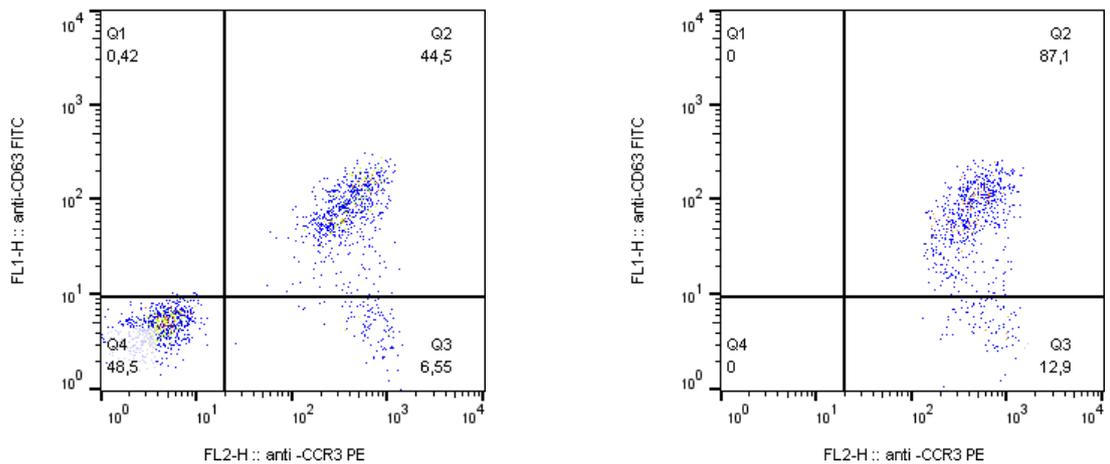
Nach Herstellerangaben wurden die Ergebnisse der Messung beim Flow2CAST als positiv gewertet, wenn der Prozentsatz der aktivierten basophilen Granulozyten nach Inkubation mit dem Wespen- oder Bienengiftallergen >10% betrug. Die Probe galt als auswertbar, wenn die Negativkontrolle <2,5% und wenigstens eine der beiden Positivkontrollen eine Basophilenaktivierung von >10% anzeigte.

Insgesamt blieben nach Ausschluss der nicht auswertbaren Tests 28 Patientenproben, die in die Studie miteinbezogen wurden. Die Einzelergebnisse der Basophilenaktivierung im Flow2CAST aller Tests sind im Anhang dargestellt.

Zunächst testeten wir in unserer Studie zwei verschiedenen *Kits*, das *Basophil Isolation Kit, human* und das *Diamond Basophil Isolation Kit, human*. Beim *Basophil Isolation Kit* findet eine Negativselektion der Basophilen Granulozyten statt. Es werden alle Zellen, außer die basophilen Granulozyten markiert und entsprechend magnetisch zurückgehalten, während die Basophilen dadurch separiert werden. Bei dem *Diamond Basophil Isolation Kit, human*, folgt noch ein weiterer Schritt mit den *MicroBeads CD123*, sodass es zu einer Positivselektion der Basophilen Granulozyten kommt. Wir entschieden uns für das *Diamond Basophil Isolation Kit, human*, da sich eine größere Reinheit der Basophilenseparation darstellte. Das entspricht im Protokoll, auf welches weiter unten eingegangen werden soll, Schritt 2 (*PosseID2*).



**Abb. 18: Vergleich der Kits:** links: Verwendung *Basophil Isolation Kit, human*. rechts: Verwendung *Diamond Basophil Isolation Kit, human*: R1 repräsentiert die CCR3 positiven Basophilen Granulozyten.



**Abb. 19: Vergleich der Kits:** links: Verwendung *Basophil Isolation Kit, human*. rechts: Verwendung *Diamond Basophil Isolation Kit, human*: Bestimmung Prozentsatz der hell-fluoreszierten (CD63-positiven) Zellen (Q2) im Vergleich zu der Gesamtzahl aller Basophilen Granulozyten (Q2 und Q4).

Abbildungen 18 und 19 zeigen beispielhaft das *Gating* nach Verwendung des *Basophil Isolation Kit, human* und des *Diamond Basophil Isolation Kit, human* im Vergleich (beispielhafte Patientenprobe).

Im Folgenden wird die herkömmliche Aufarbeitung verkürzt  $BAT^{PBMC}$  und die mit zusätzlicher Separation mittels *Diamond Basophil Isolation Kit, human*  $BAT^{BG}$  genannt.

### 3.3.1 Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und anhand des spezifischen IgE belegter Sensibilisierung gegen Wespengiftallergie

Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der Patienten mit Wespengiftallergie im BAT bei der Durchführung nach Herstellerangaben ( $BAT^{PBMC}$ ) und nach vorheriger Filtrierung der basophilen Granulozyten durch das *Diamond Kit* ( $BAT^{BG}$ ). Grau hinterlegt sind Aktivierungen  $<10\%$ , die im Bezug zur Behandlungsdiagnose einem falsch negativen Ergebnis entsprechen. Negativkontrollen befinden sich in einer Übersicht im Anhang. Bei Patient Nr. 39 und 46 fällt die  $PC^{fMLP}$  in beiden BAT negativ aus, die  $PC^{anti-fcRI}$  fällt im  $BAT^{PBMC}$  zusätzlich negativ aus. Bei beiden Patienten kommt es im Bezug zur Behandlungsdiagnose zu einem falsch negativen Ergebnis in beiden Allergenansätzen. Pat Nr. 25 reagiert sowohl im  $BAT^{PBMC}$ , als auch im  $BAT^{BG}$  auf die  $PC^{fMLP}$  nicht. Bei Pat Nr. 36 und 56 fällt lediglich die  $PC^{fMLP}$  im  $BAT^{BG}$  negativ aus.

Pat.- Nr.	Positivkontrolle (anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)		Allergen (unverdünnt)		Allergen (verdünnt)	
	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>
11	93,7	93,36	72,14	55,45	97,42	95,7	91,32	92,13
23	76,27	87,24	28,73	23,22	82,47	75,52	54,98	24,94
25	62	42,24	6,67	<b>7,39</b>	56,94	59,96	18,18	55,81
29	95,59	88,32	49,6	26,52	93,73	90,85	90,46	91,42
30	49,42	21,13	35,38	10	57,94	20,48	41,76	28,97
31	81,32	74,95	47,38	28,89	69,24	89,03	49,85	67,12
36	95,79	58,89	11,73	2,24	95,96	61,79	91,08	56,65
39	<b>1,69</b>	<b>0,99</b>	25,05	<b>3,09</b>	<b>1,26</b>	<b>2,05</b>	<b>1,57</b>	<b>1,26</b>
40	80,49	39,07	39,39	12,47	54,35	39,88	57,39	28,66
42	41,92	63,62	63,6	43,64	34,99	71,53	37,47	65,82
44	42,12	55,29	44,4	34,72	38,79	34,95	35,41	53,17
45	87,17	41,25	22,98	11,85	35,87	52,21	<b>4,74</b>	29,8
46	<b>2,36</b>	<b>1,48</b>	10	<b>1,66</b>	<b>2,23</b>	<b>2,59</b>	<b>1,01</b>	<b>2,38</b>
48	91,93	81,34	55,86	32,34	85,14	85,17	63,53	72,88
54	80,08	26,56	10,56	<b>1,75</b>	64,32	35,46	<b>7,74</b>	17,75
56	90,99	55,37	18,74	<b>4,47</b>	72,98	46,42	21,59	23,77

**Tabelle 12: Ergebnisse BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup> der Basophilenaktivierung bei Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und mit Nachweis von spezifischen IgE gegen Wespengift in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftkonzentration.**

Basophilenaktivierungen <10% sind fett gedruckt

Grau hinterlegt sind falsch negative Werte (im Bezug zur Behandlungsdiagnose)

### **3.3.2 Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und belegter Sensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift anhand des spezifischen IgE**

Tabelle 13 fasst die Ergebnisse der BATs von Patienten zusammen, die spezifisches IgE sowohl auf Wespengift- als auch auf Bienengiftallergie gezeigt hatten. Eine Übersicht über die Negativkontrollen befindet sich im Anhang (s. Tabelle 5 des Anhangs). Bei Patient Nr. 12 fallen beide Tests im verdünnten Allergenansatz negativ aus. Im unverdünnten Allergenansatz kommt es ebenfalls im  $BAT^{PBMC}$  zu einem falsch negativen Ergebnis mit einer Aktivierung von 5,67%. Der  $BAT^{BG}$  fällt gradeeben positiv aus (16,77% Basophilenaktivierung). Bei Patient Nr. 26 kommt es zu einer knappen Aktivierung von 13,38% nur im verdünnten Allergenansatz im  $BAT^{BG}$ . Bei Patient Nr. 32 und 53 kommt es zu einem falsch negativen Ergebnis in beiden Tests. Bei fünf Patienten (Pat Nr. 21, 33, 34, 37, 43) bei denen eine alleinige Bienen- oder Wespengiftallergie als Behandlungsd Diagnose festgestellt wurde, fällt das Ergebnis übereinstimmend aus. Bei vier von diesen Patienten ist die Aktivierung im  $BAT^{PBMC}$  deutlich höher. Auf die Ergebnisse der Positivkontrollen soll weiter unten näher eingegangen werden.

Pat-Nr. + Allergen	Positivkontrolle (Anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)		Allergen (unverdünnt)		Allergen (verdünnt)		Behandlungsdiagnose
	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	
12 W	43,02	30,51	46,88	15,4	<b>5,67</b>	16,77	<b>1,89</b>	<b>1,05</b>	Wespengiftallergie und Bienengiftallergie
12 B	28,15	29,12	41,67	20,45	15,26	14,02	<b>1,46</b>	<b>2,87</b>	
21 W	73,97	40,72	27,21	12,73	<b>2,88</b>	1,88	<b>3,56</b>	<b>0,82</b>	Bienengiftallergie
21 B	73,97	40,72	27,21	12,73	74,66	38,59	47,71	35,44	
26 W	<b>7,2</b>	17,85	37,76	53,52	<b>2,39</b>	13,38	<b>0,26</b>	<b>3,78</b>	Wespengiftallergie
26 B	Nicht erhoben								
32 W	<b>3,4</b>	<b>3,4</b>	33,57	33,57	<b>0,21</b>	<b>0,21</b>	<b>0,21</b>	<b>0,41</b>	Bienengiftallergie
32 B	<b>6,67</b>	<b>0,41</b>	35,66	13,20	<b>2,99</b>	<b>0,41</b>	<b>2,69</b>	<b>1,01</b>	
33 W	81,71	51,61	10,43	<b>4,41</b>	83,58	48,53	43,27	56,01	Wespengiftallergie
33 B	81,62	51,61	10,06	<b>4,41</b>	<b>1,03</b>	<b>0,39</b>	<b>1,94</b>	<b>0</b>	
34 W	93,52	77,42	29,48	15,27	53,98	74,48	13,03	49,76	Wespengiftallergie
34 B	92,06	77,42	28,69	15,27	<b>1,24</b>	<b>3,25</b>	<b>1,04</b>	<b>0,84</b>	
35 W	34,98	28,86	65,14	27,26	<b>4,25</b>	13,91	<b>0</b>	<b>0,68</b>	Wespengiftallergie
35 B	34,98	28,86	65,14	27,26	<b>0,22</b>	<b>0,36</b>	<b>0,48</b>	<b>0,34</b>	
37 W	69,74	38,84	67,15	26,68	77,78	46,27	30,46	15,5	Wespengiftallergie
37 B	68,51	40,04	63,01	27,11	<b>1,63</b>	<b>2,71</b>	<b>0,89</b>	<b>0,56</b>	
43 W	73,93	<b>6,02</b>	15,49	<b>0,6</b>	77,69	15,92	75,63	<b>9,84</b>	Wespengiftallergie
43 B	76,78	<b>6,49</b>	18,35	<b>1,15</b>	<b>0,4</b>	<b>1,48</b>	<b>0</b>	<b>0,47</b>	
53 W	34,7	11,87	20,84	11,54	<b>1,23</b>	<b>0,77</b>	<b>0,85</b>	<b>1,89</b>	Wespengiftallergie
53 B	34,7	11,87	20,84	11,54	<b>0</b>	<b>0,19</b>	<b>0,73</b>	<b>0,57</b>	

**Tabelle 13: Ergebnisse BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup> der Basophilenaktivierung bei Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und mit Nachweis von spezifischen IgE gegen Bienen- oder Wespengift in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftkonzentration.**

Basophilenaktivierungen <10% sind fett gedruckt

Grau hinterlegt sind falsch negative Werte (im Bezug zur Behandlungsdiagnose)

### 3.3.3 Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und belegter Sensibilisierung gegen Bienengiftallergie anhand des spezifischen IgE

Bei zwei Patienten zeigte das IgE eine Monosensibilisierung auf Bienengift an. Auch der BAT führte hier zu der Diagnose einer Bienengiftallergie. Der unverdünnte Allergenansatz fiel in beiden Tests positiv aus, während der verdünnte Allergenansatz nur im BAT<sup>BG</sup> bei Patient Nr. 20 positiv ausfiel.

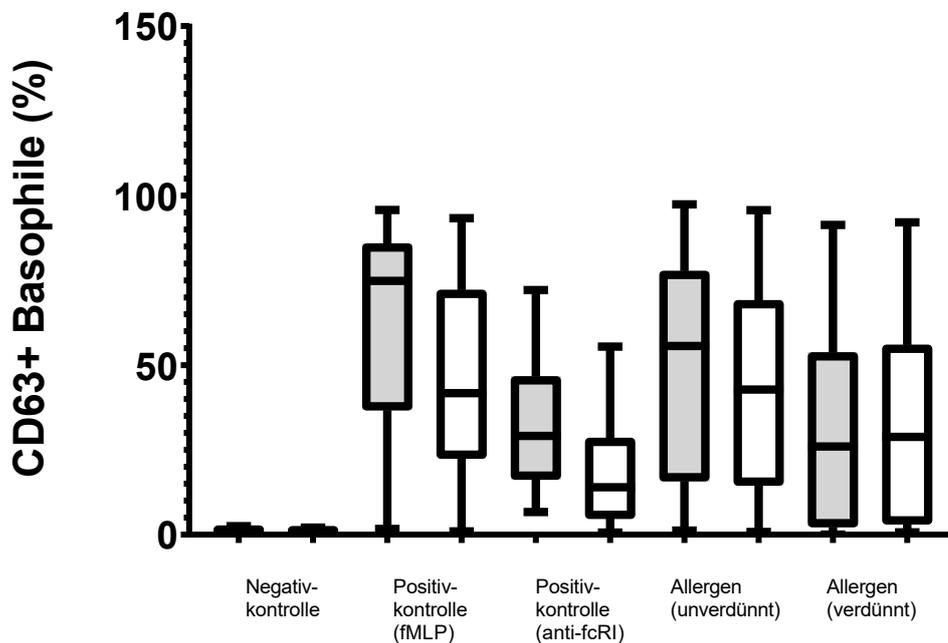
Pat.- Nr.	Positivkontrolle (anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)		Allergen (unverdünnt)		Allergen (verdünnt)	
	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>
20	77,26	80,38	19,06	19,32	17,45	36,8	<b>7,32</b>	55,51
49	75,68	61,9	13,62	<b>5,65</b>	42,54	45,75	<b>2,11</b>	<b>2,79</b>

**Tabelle 14: Ergebnisse BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup> der Basophilenaktivierung bei Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und mit Nachweis von spezifischen IgE gegen Bienengift in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Bienengiftkonzentration.**

Basophilenaktivierungen <10% sind fett gedruckt

Grau hinterlegt sind Werte falsch negative Werte (im Bezug zur Behandlungsdiagnose)

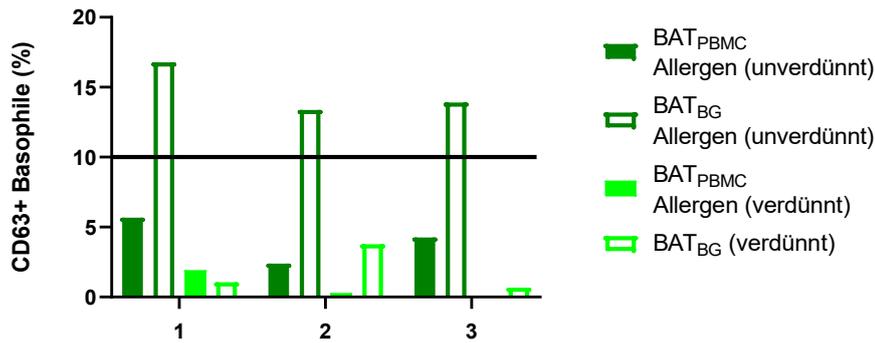
### 3.3.4 Graphischer Vergleich der Basophilenaktivierung im BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup>



**Abb. 20:** Der Vergleich der Basophilenaktivierung (CD63-Expression) zwischen BAT<sup>PBMC</sup> (graue Balken) und BAT<sup>BG</sup> (weiße Balken) in Prozent aller 28 Patienten nach Inkubation mit Puffer (=Negativkontrolle), fMLP (=Positivkontrolle 1), anti-fcεRI (=Positivkontrolle 2) und zwei verschiedenen Bienen- und Wespengiftkonzentrationen bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion in der Anamnese, sowie Nachweis von spezifischem IgE. Es zeigt sich tendenziell eine höhere Basophilenaktivierung im BAT<sup>PBMC</sup>, außer in dem unverdünnten Allergenansatz.

Abbildung 20 zeigt die Basophilenaktivierung aller 28 Patienten, niedrigster, höchster und mittlerer Wert. Es zeigt sich im BAT<sup>BG</sup> im Vergleich zum BAT<sup>PBMC</sup> eine Tendenz zu einer geringgradigen Aktivierung. Lediglich im verdünnten Allergenansatz fällt die Aktivierung etwas höher im BAT<sup>BG</sup>, als im BAT<sup>PBMC</sup> aus.

In unserer Studie zeigten 10 von 28 (36%) Patienten in der serologischen Diagnostik mittels Bestimmung des sIgE gegen native Hymenoptereingifte eine Doppelsensibilisierung. Hier führte der BAT<sup>PBMC</sup> in 5 Fällen zu falsch negativen Ergebnissen. In 3 Fällen davon führte der BAT<sup>BG</sup> allerdings zu einem positiven Ergebnis im unverdünnten Allergenansatz. Die drei Patienten sind in Abbildung 21 dargestellt.

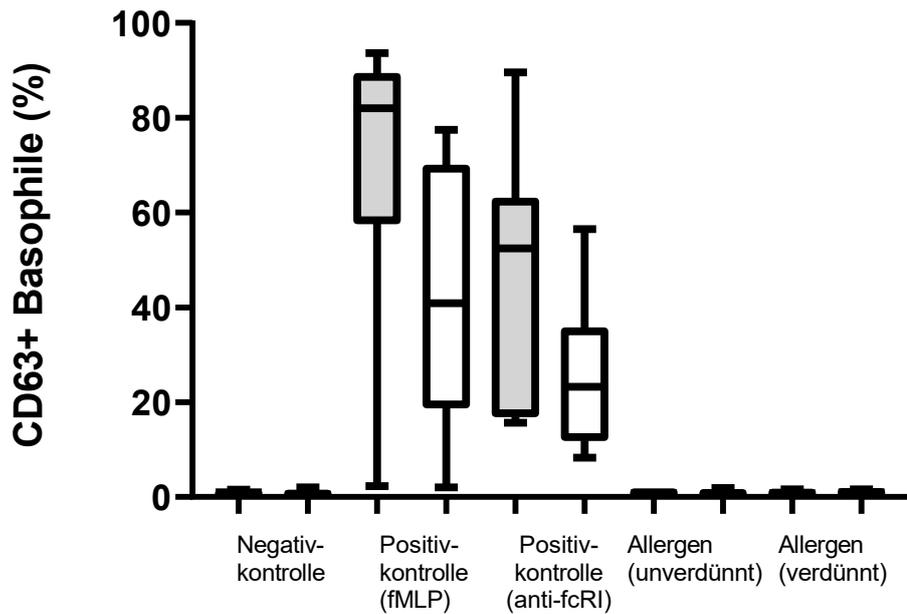


**Abb. 21: Darstellung der 3 Patienten die im BAT<sup>BG</sup> positiv ausfielen, im BAT<sup>PBMc</sup> negativ.** Bei allen drei Patienten fällt der verdünnte Allergenansatz in beiden Tests unter 10% Basophilenaktivierung aus, im unverdünnten Allergenansatz der BAT<sup>BG</sup> über 10%.

Auf die Positivkontrollen und die Ergebnisse der gesunden Spender soll nun im Folgenden genauer eingegangen werden.

### 3.3.5 Spender ohne Nachweis einer Bienen- oder Wespengiftallergie

Als Kontrollgruppe dienten 10 Spender, die sowohl anamnestisch als auch im FEIA ohne Nachweis einer Bienen- oder Wespengiftallergie verblieben. Die Einzelergebnisse der 10 Kontrollpersonen sind im Anhang in tabellarischer Form dargestellt (s. Tabelle 3 des Anhangs).

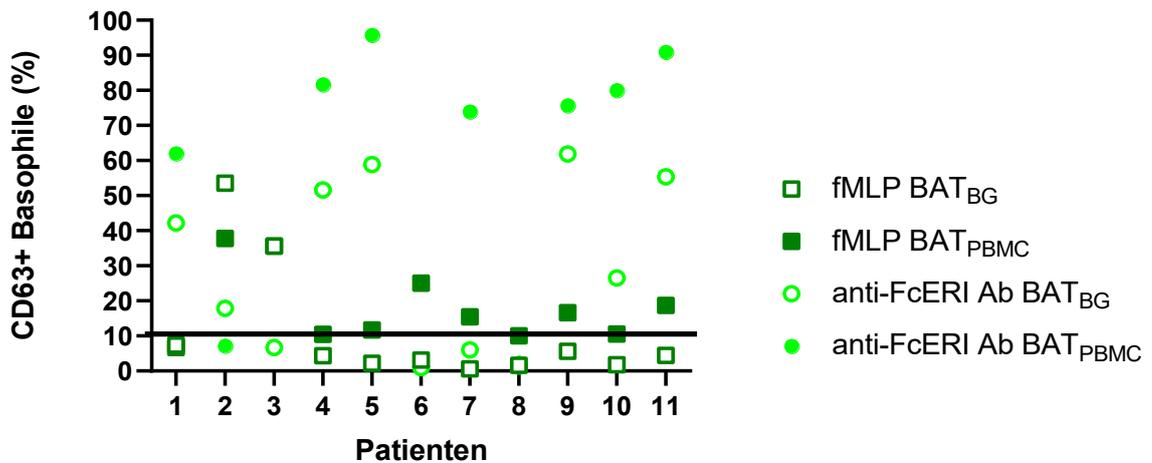


**Abb. 22: Vergleich BAT<sup>PBMc</sup> (graue Balken) und BAT<sup>BG</sup> (weiße Balken) bei 10 Spendern** (ohne Nachweis einer Bienen- oder Wespengiftallergie) Basophilenaktivierung (CD 63- Expression) in Prozent.

Abbildung 22 zeigt die graphische Darstellung der 10 Spender, jeweils im Vergleich BAT<sup>PBMc</sup> und BAT<sup>BG</sup> der Negativkontrolle, der Positivkontrollen und der beiden Allergenkonzentrationen. Die Negativkontrollen und die Allergenstimulationen zeigen keine großen Diskrepanzen zwischen den beiden Tests.

Da es sowohl bei den Spendern, als auch bei den Probanden zu Diskrepanzen zwischen den Positivkontrollen im BAT<sup>PBMc</sup> und im BAT<sup>BG</sup> kam, folgt im nächsten Abschnitt eine detailliertere Analyse der Positivkontrollen.

### 3.3.5.1 Positivkontrollen BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup>



**Abb. 23: Positivkontrollen fMLP und anti-FcεRI im BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup> bei 11 Patienten im Vergleich.** Bei 11 Patienten kommt es in den Positivkontrollen zu Diskrepanzen zwischen den beiden Tests, die Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> fällt deutlich öfter im BAT<sup>BG</sup> negativ aus.

In 11 Fällen, welche in Abbildung 23 dargestellt sind, gab es in den Positivkontrollen Diskrepanzen zwischen dem BAT<sup>PBMC</sup> und dem BAT<sup>BG</sup>. In 2 Fällen funktionierte lediglich die Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> im BAT<sup>PBMC</sup>. In 9 Fällen funktionierte die Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> im BAT<sup>BG</sup> nicht, in 3 Fällen davon auch die Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> nicht (Patient Nr. 39, 43 und 46).

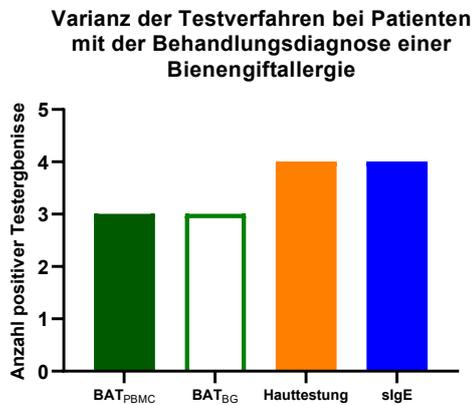
Die Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> fällt in beiden Tests gleich oft <10% aus (in 14% der Fälle). Die Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> fällt deutlich öfter im BAT<sup>BG</sup> negativ aus (in 32% der Fälle) als im BAT<sup>PBMC</sup> (in 3,6% der Fälle). In 18 Fällen führten alle Positivkontrollen sowohl im BAT<sup>PBMC</sup> als auch im BAT<sup>BG</sup> zu einer Aktivierung >10%. In einem Test funktionierte die Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> in beiden Tests nicht (Patient Nr. 25).

Tabelle 15 zeigt, dass sich bei den gesunden Spendern im Vergleich der beiden Tests eine große Diskrepanz bei den Positivkontrollen ergab. Bei der Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> ergab sich eine Diskrepanz in der Aktivierung von 9-66% höhere Basophilenaktivierung im BAT<sup>PBMC</sup> als im BAT<sup>BG</sup>. Lediglich bei einem der zehn Spender fiel die Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> um 14,6% im BAT<sup>BG</sup> höher aus, als beim BAT<sup>PBMC</sup>. Bei der Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> sieht es ähnlich aus. In der Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> fiel die Basophilenaktivierung bei 2 Patienten im BAT<sup>BG</sup> unter 10% aus, der BAT<sup>PBMC</sup> ergab eine positive Aktivierung.

Pat.-Nr.	Positivkontrolle (anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)	
	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>
6	83,33	29,09	17,22	29,09
13	78,8	69,44	15,68	12,76
14	93,27	71,4	51,7	56,53
15	87,4	21,32	62,98	13,67
16	42,28	11,41	89,54	36,83
18	62,83	77,43	17,33	9,53
19	80,65	57,01	16,21	<b>8,32</b>
28	93,63	42,71	53,73	18,54
41	87,98	39,07	63,08	27,88
51	<b>2,31</b>	<b>2,05</b>	53,14	35,26

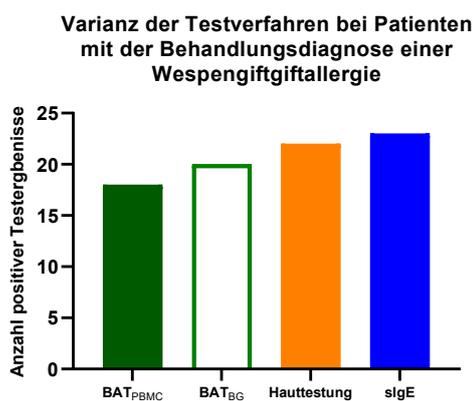
**Tabelle 15: Darstellung der Basophilenaktivierung bei gesunden Spendern in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Positivkontrolle fMLP und anti-FcεRI im BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup>. Basophilenaktivierungen <10% sind fett gedruckt; Grau hinterlegt sind Basophilenaktivierungen <10%.**

### 3.3.6 Vergleich der Ergebnisse im BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup> mit der Standarddiagnostik (slgE und Hauttestung)



**Abb. 24:** Darstellung der Anzahl positiver Testergebnisse der Testverfahren (BAT<sup>PBMC</sup>, BAT<sup>BG</sup>, Hauttestung, slgE im Bezug zur Behandlungsdiagnose) bei 4 Patienten mit der Behandlungsdiagnose einer Bienengiftallergie. (BD: Behandlungsdiagnose)

Bei 4 Patienten, welche in Abbildung 24 dargestellt sind, wurde eine alleinige Bienengiftallergie als Behandlungsdiagnose detektiert. Hier stimmen die Ergebnisse im slgE und der Hauttestungen überein. Die beiden BAT Varianten verblieben bei einem Patienten sowohl im BAT<sup>BG</sup>, als auch im BAT<sup>PBMC</sup> falsch negativ.



**Abb. 25:** Darstellung der Anzahl positiver Testergebnisse der Testverfahren (BAT<sup>PBMC</sup>, BAT<sup>BG</sup>, Hauttestung, slgE im Bezug zur Behandlungsdiagnose) bei 23 Patienten mit der Behandlungsdiagnose einer Wespengiftallergie. (BD: Behandlungsdiagnose)

Eine alleinige Wespengiftallergie in der serologischen Diagnostik anhand des jeweiligen spezifischen IgE wurde, unter Beachtung der komponentenbasierten Diagnostik bei 23 Patienten festgestellt, welche in Abbildung 25 dargestellt sind. 22 Patienten reagierten ebenso in den Hauttestungen auf Wespengift positiv. Bei 3 Patienten von diesen 23 ergab sich im Bezug zur Behandlungsdiagnose ein falsch negativer Test im  $BAT^{PBMC}$  und  $BAT^{BG}$ , und bei weiteren 2 Patienten ein falsch negativer Test nur im  $BAT^{PBMC}$ .

Bei einem Patienten stellte sich als Behandlungsdiagnose eine Bienen- und Wespengiftallergie da. Der BAT für Bienengift verblieb beim  $BAT^{PBMC}$  bei diesem Patienten im Bezug zur Behandlungsdiagnose falsch negativ.

### 3.3.7 Ergebnisse der statistischen Auswertung

Behandlungsdiagnose	Anzahl	Sensitivität $BAT^{PBMC}$	Sensitivität $BAT^{BG}$
Bienegiftallergie	4	75%	75%
Wespengiftallergie	23	74%	83%
Bienen- und Wespengiftallergie	1	0%	100%
Insgesamt	28	75%	86%

**Tabelle 16: Sensitivität  $BAT^{PBMC}$  und  $BAT^{BG}$ .**

Die statistischen Werte der Sensitivität in Tabelle 16 sind mit dem Hintergrund einer geringen Probandenzahl zu sehen. Falsche Ergebnisse beziehen sich im Hinblick auf die Behandlungsdiagnose. Insgesamt kommt es im  $BAT^{BG}$  zu 24 richtig positiven und zu 4 falsch negativen Ergebnissen, und somit zu einer Sensitivität von 86%. Beim  $BAT^{PBMC}$  kommt es insgesamt zu 21 richtig positiven Ergebnissen und 7 falsch negativen, damit ergibt sich eine Sensitivität von 75%. Bei Pat Nr. 32, 36, 46 und 53 kommt es in beiden Tests zu falsch negativen Ergebnissen. Bei 3 Patienten, bei Patient Nr. 12, 26 und 35 kommt es zumindest in einer Verdünnung zu einer Basophilenaktivierung von über 10% im  $BAT^{BG}$ .

Rechnet man nun die 10 Probanden aus der Kontrollgruppe der freiwilligen gesunden Spender plus 17 Patienten bei denen im BAT sowohl auf Bienen- als

auch auf Wespengift getestet wurde, kommt man auf eine Fallzahl von 27. Bei allen 10 Kontrollpatienten ergab der BAT ein negatives Testergebnis. Auch bei den 17 Patienten, davon 2 Bienengiftallergiker, 1 Patient, der eine Allergie auf Bienen- und Wespengift aufwies und 14 Patienten mit Wespengiftallergie ist das Ergebnis negativ. Bei 16 Patienten fiel das Ergebnis für das jeweilige andere Gift richtig negativ aus. Damit ergibt sich eine Spezifität des BAT sowohl im BAT<sup>PBMC</sup> als auch im BAT<sup>BG</sup> von 100%.

Vergleich	Asymptomatische Signifikanz	Interpretation
Positivkontrolle (anti-FcεRI)	0,005	Signifikanter Unterschied
Positivkontrolle (fMLP)	0,000	Signifikanter Unterschied
Hymenopteregift (unverdünnt)	0,571	Kein signifikanter Unterschied
Hymenopteregift (verdünnt)	0,089	Kein signifikanter Unterschied

**Tabelle 17: Nichtparametrischer Test: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test Vergleich BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup>.**

Vergleicht man die Werte der Basophilenaktivierung zwischen BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup> im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ergibt sich in den Positivkontrollen ein signifikanter Unterschied in der Basophilenaktivierung. Hier weisen die Positivkontrollen im BAT<sup>PBMC</sup> deutlich höhere Werte auf. In den beiden Allergenansätzen ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Mittelwerte BAT								
	Positivkontrolle (anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)		Hymenopteregift (unverdünnt)		Hymenopteregift (verdünnt)	
	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>
Mittelwert (%)	61,80	45,58	33,06	18,23	49,91	43,30	31,89	33,84
N	28	28	28	28	28	28	28	28
Σ	30,96	28,74	19,34	15,35	33,09	29,51	30,73	28,84

**Tabelle 18: Mittelwerte im BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup>.**

N= Anzahl der Tests, Σ = Standardabweichung

In Tabelle 18 sind die Mittelwerte der Basophilenaktivierung in Prozent aufgeführt. In der Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> kommt es im Mittel zu einer circa 15% höheren Aktivierung im BAT<sup>PBMC</sup>. In der Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> zu einer fast doppelt so hohen Aktivierung im BAT<sup>PBMC</sup>. Bei den Hymenopterengiften zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Lediglich der verdünnte Hymenopteregiftansatz fällt im Mittelwert um knapp 2% im BAT<sup>BG</sup> höher aus, als im BAT<sup>PBMC</sup>.

## 4 Diskussion

In europäischen Studien liegt die Zahl der Patienten, die auf Insektenstiche mit einer allergischen Reaktion reagieren bei 2-4% der Bevölkerung [34]. Routinemäßig kann der behandelnde Arzt nach der Anamnese auf die Hauttestungen und das allergenspezifische IgE zurückgreifen, um den Verdacht einer Hymenopterengiftallergie zu verifizieren. Die etablierten Methoden sollten sich gegenseitig ergänzen und als Gesamtes zur richtigen Diagnose führen. Bei Unklarheiten steht der BAT als weiteres Diagnostikum zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden der *in-vitro* Basophilenaktivierung bei 28 Patienten mit Typ I-Allergie gegen Bienen- oder Wespengiftallergie verglichen. Zunächst wurde der BAT anhand der Herstellervorgaben, als eine im Labor bereits etablierte Methode durchgeführt. In der zweiten Methode wurden die basophilen Granulozyten zunächst mit Hilfe des *Diamond Basophil Isolation Kit, human* isoliert und der BAT im Anschluss durchgeführt. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob der Test durch die vorherige Separation der basophilen Granulozyten zu einer höheren Sensitivität führen kann. Darüber hinaus wurden 10 gesunde Probanden als Kontrollgruppe analysiert.

Im Folgenden sollen die erwähnten und auch in dieser Studie angewendeten Diagnostikverfahren näher auf ihre Wertigkeit hin untersucht werden.

### 4.1 Bedeutung und Interpretation der Standarddiagnostik

#### 4.1.1 Bedeutung der Anamnese

Die Anamnese ist keine sichere objektive Einschätzung. Eine korrekte Anamnese ist abhängig von den Angaben des Patienten, aber auch von der Symptomeinschätzung und damit subjektiven Einteilung des Arztes. Dennoch dient die Anamnese als Basis und kann leitende Hinweise geben.

In einigen Quellen heißt es, dass die genaue Benennung des stechenden Insekts den meisten Patienten schwerfällt und viele Patienten nicht zwischen Wespe und Biene unterscheiden können [68]. Eine Studie mit 640 Beteiligten von 2014 von Baker *et al.* ergab, dass lediglich 3,1% der Patienten alle 6 Bilder von Insekten korrekt zuordnen konnten, 1,6% erkannten kein Insekt richtig [69]. In einer anderen Quelle wiederum wird davon gesprochen, dass selbst ein Laie zwischen

Biene und Wespe unterscheiden kann [70]. In unserer Studie wurde bei 24 von 28 Patienten die Anamnese ausreichend dokumentiert. Von diesen 24 stimmten alle Angaben hinsichtlich des ursächlichen Insektes mit der hinterher festgestellten Diagnose überein. Dennoch kann durch eine korrekte Anamnese eine Sensibilisierung auf ein weiteres Hymenopterengift nicht ausgeschlossen werden.

Das individuelle Risiko für anaphylaktische Reaktion nach einem Stich hängt mit dem Lebensalter, Gesundheitszustand und persönlichen Aktivitäten zusammen und dies sind wichtige Anamneseangaben, die erfragt werden sollten [71].

In der Literatur wird ein höheres Alter als Risikofaktor für systemische Reaktionen oder aber auch einen letalen Ausgang angegeben [72]. In unserer Studie waren 82% der Patienten Frauen und das Durchschnittsalter betrug 55 Jahre. Am häufigsten wurde eine anaphylaktische Reaktion Grad 2 angegeben. Betrachtet man Abb. 14 und den Spearman-Rangkoeffizienten (s. Auswertung Tabelle 2 des Anhangs) lässt sich zwischen dem Alter und dem Schweregrad der systemischen Reaktion in unserer Studie kein Zusammenhang feststellen.

Weiterhin versicherten die Patienten sieben Tage vor der Blutentnahme keine antiallergischen Medikamente wie Antihistaminika oder Kortikosteroide eingenommen zu haben. Antihistaminika sollten zu keinen Interferenzen mit dem BAT führen, systemische Glukokortikosteroide und Cyclosporin A sollten aber vermieden werden [9].

Zunächst wurden bei den Patienten mit positiver Anamnese bezüglich Bienen- oder Wespengiftallergie das spezifische IgE gemessen und die Hauttestungen durchgeführt. Verblieb der Pricktest negativ, wurde der Intrakutantest durchgeführt.

#### **4.1.2 Bedeutung der Hauttestungen**

Die Hauttestungen sind in der Durchführung schnell, günstig und es kann eine große Menge an Allergenen gleichzeitig getestet werden [11] [37].

Hauttests sind allerdings bei bestimmten Patientengruppen kontraindiziert, wie Patienten, welche eine anaphylaktische Vorgeschichte haben [33] [38]. Weitere Kontraindikationen sind Hauterkrankungen im Testfeld, beeinträchtigter Allgemeinzustand, instabiles Asthma bronchiale, Behandlung mit  $\beta$ -Blockern und eine

bestehende Schwangerschaft [39]. Ein Nachteil stellt eine potenziell schwerwiegende, allergische Reaktion dar [1].

#### **4.1.2.1 Interpretation der Ergebnisse der Hauttestungen**

Die Hauttests werden vielfach als Goldstandard angegeben. Fällt der Pricktest negativ aus, kann laut Leitlinie die Intrakutantestung durchgeführt werden.

Bei vier Patienten wurde eine Bienengiftallergie vermutet. Bei allen vier zeigte der Pricktest ein positives Ergebnis und ergab damit eine Sensitivität von 100%. Ein Patient, bei dem eine echte Doppelsensibilisierung auf Bienen- und Wespengift festgestellt wurde, reagierte ebenfalls im Pricktest auf beide Gifte. Bei 23 Patienten, bei denen eine Wespengiftallergie als Behandlungsdiagnose festgestellt wurde, kam es unter Berücksichtigung der serologischen Untersuchungen und/oder BATs zu 4 falsch positiven Ergebnissen auf Bienengift. Bei einem davon kam es zusätzlich zu einem falsch negativen Ergebnis auf Wespengift, so dass hier mit Betrachtung der weiteren Ergebnisse im BAT und des IgE von einer Verwechslung der Gifte beim Beschriften ausgegangen werden kann. Die Schwellentestung wurde bei diesem Patienten nicht wiederholt. Damit ergab sich mit dem Hintergrund eines geringen Stichprobenumfangs eine Sensitivität von nur 68% für Wespengift im Pricktest. Die Spezifität betrug 71% für Bienengift und 100% für Wespengift.

Falsche Ergebnisse können auftreten, wenn nicht der richtige Zeitpunkt zur diagnostischen Abklärung gewählt wurde. Es sollte eine Refraktärphase von 4 Wochen nach einer akuten anaphylaktischen Reaktion eingehalten werden [73].

Ein Pricktest mit 300 µg/ml kann eine ähnliche Sensitivität erreichen, wie der Intrakutantest. Die meisten Patienten (86%) reagierten auf eine Konzentration von 300µg/ml. Ähnliche Ergebnisse erzielten Möbs *et al.* in einer Studie von 2018 mit 75 Patienten und kamen auf 82,7% positiver Testergebnisse bei einer Konzentration von 300µg/ml [74].

Noch sensitiver als der Pricktest ist der Intrakutantest. Die Sensitivität des Intrakutantest wird für Biene und Wespe mit über 95% angegeben, die Spezifität mit 80-90% [34]. Der Intrakutantest sollte vorgenommen werden, wenn der Pricktest trotz positiver Anamnese unauffällig ist [40]. Auch in unserer Studie konnten durch die Intrakutantestung 4 weiteren Patienten eine positive Wespengiftallergie

zugeordnet werden, welche durch den Pricktest nicht angezeigt wurde. Als Nachteile anzusehen sind die Schmerzhaftigkeit, höhere technischer und zeitlicher Aufwand und ein höheres Risiko für anaphylaktische Reaktionen [75]. Ein weiterer Nachteil wird in der Fehleranfälligkeit angegeben, da eine Schwierigkeit in der korrekten Applikation besteht [74].

### **4.1.3 Bedeutung des spezifischen IgE**

Die Vorteile der serologischen Testung begründen sich darin, dass der Test schnell und günstig ist und nur eine geringe Menge Blut benötigt wird. Des Weiteren ist er unabhängig von Alter, Hautzustand, Medikation, Symptomen und einer Schwangerschaft durchführbar [37].

Ein Nachteil ist, dass ein positiver Nachweis von sIgE eine Allergie noch nicht beweisen kann [37]. Deutlich zeigt dies auch, dass 15% der Allgemeinbevölkerung gegen Hymenopterenengifte sensibilisiert sind, aber deutlich weniger klinisch relevante Symptome zeigen [24].

#### **4.1.3.1 Interpretation der serologischen Ergebnisse**

Das Gesamt-IgE wird in drei Gruppen eingeteilt. Bei sieben Patienten fiel das Gesamt-IgE unter 20 kU/l aus, was für eine geringe Wahrscheinlichkeit einer generellen Neigung zur Allergieentwicklung sprechen soll, doch bei allen sieben konnte trotzdem eine Insektengiftallergie festgestellt werden. Die meisten Patienten fielen in die mittlere Kategorie, also einem möglichen Risiko zur Entwicklung einer Allergie mit Werten zwischen 20kU/l und 100 kU/l. Neun Patienten zeigten ein Gesamt-IgE über 100 kU/l, was für ein wahrscheinliche Risiko für das Auftreten einer Allergie sprechen soll. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Spiegel des Gesamt-IgE im klinischen Alltag nur eine Orientierung bzgl. des Allergierisikos gibt, jedoch niedrige Spiegel keine Allergie ausschließen.

Eine klinisch stumme Doppelsensibilisierung tritt bei bis zu 25% der Bevölkerung auf [14]. In einer anderen Quelle heißt es, dass Doppelpositivitäten bei bis zu 50% der Patienten vorkommen [76]. In unserem Kollektiv fanden sich bei 32%

klinisch irrelevante Doppelsensibilisierungen. Wie auch in anderen Studien, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, dass Doppelsensibilisierungen die Diagnostik erschweren können. Häufig kommt es bei Bestimmung des spezifischen IgE gegen natives Insektengift zum Auftreten falsch positiver Ergebnisse bezüglich Bienen- und Wespengiftsensibilisierung. Der Grund hierfür ist, dass die nativen Gifte auf Grund ähnlicher Proteine oder auf Grund von glykolytierten Seitenketten Bindungstellen für kreuzreagierende Antikörper aufweisen. Lässt man die komponentenbasierte Diagnostik außen vor, würde in der vorliegenden Studie die Serumdiagnostik bei 10 Patienten ein doppelt positives Ergebnis anzeigen. Davon konnte aber nur bei einem Patienten mittels komponentenbasierter Diagnostik eine klinisch relevante Doppelsensibilisierung festgestellt werden. Basierend auf dem oben erwähnten Auswertungsschema (s. Abb. 2) vor, hat nur Pat Nr. 12 eine echte Doppelsensibilisierung, da er auf die Komponenten rVes 5 als auch rApi m 1, rApi m 3 reagierte. Die komponentenbasierte Diagnostik stellt ein wichtiges *Tool* da, um zwischen einer „echten“ klinisch relevanten Allergie und einer Kreuzreaktivität zu unterscheiden [76]. Sie kann helfen die richtige Diagnose zu stellen, wenn das spezifische IgE gegen natives Insektengift doppelt positiv ausfällt, wenn eine Diskrepanz auftritt zwischen spezifischen IgE und den Hauttestungen oder beide Tests trotz positiver Anamnese negativ ausfallen [77]. Als Vorteil anzusehen ist, dass dadurch kein erhöhter Zeitaufwand gegeben ist. Eine Studie von Köhler *et al.* zeigte, dass die Sensitivität mit Zunahme der einzelnen Komponenten steigt [78]. Einschränkend ist anzumerken, dass es relevante Hymenoptereingiftkomponenten gibt, die als rekombinante Proteine zu diagnostischen Zwecken aber noch nicht zur Verfügung stehen.

In unserer Studie kamen Sensibilisierungen gegen die Komponente rVes 5 am häufigsten vor (22/28) und in abnehmender Häufigkeit rVes1 (13/28), rApi m1 (5/28), rApi m3 (2/28) sowie rApi m10 (1/28).

Auch in einer Untersuchung von Frick *et al.* 2016 (n=115) fand sich rApi m1 mit 81,7% am häufigsten. Hier wurde allerdings auch noch eine Häufigkeit von rApi m10 von 72% gemessen, wobei in unserer Analyse rApi m 10 nur bei einem Patienten zu detektieren war [79].

Routinemäßig wird bei allen Patienten im FEIA die basale Tryptase mitbestimmt. Erhöhte Werte über 11,4µg/ml können auf eine Mastozytose hinweisen und stellen ein weiteres Risiko für systemische Reaktionen da [80].

Nur bei einem Patienten unserer Studie war der Tryptase-Wert mit einem Wert von 16,4µg/ml erhöht.

## 4.2 Bedeutung der Basophilenaktivierung

Der BAT ist ein seit 10 Jahren etabliertes und kontinuierlich weiterentwickeltes zelluläres *in-vitro* Verfahren, das auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie beruht und sich als nützliches Werkzeug für die Diagnostik von IgE vermittelten Soforttyp-Allergien bewährt hat. Er findet Verwendung in der Lebensmittel-, Medikamenten-, Latex-, Aeroergen- und Hymenopterenengiftallergiediagnostik [81].

Insbesondere wenn ein Hauttest aufgrund der Anamnese nicht in Frage kommt, wie nach einem schwerem Schock, bei Säuglingen und Kleinkindern, einer Urticaria factitia oder generalisierten Hauterkrankungen, können BAT und spezifisches IgE als weiteres Diagnostikum verwendet werden [82]. Der BAT kommt zum Einsatz in Fällen, bei denen trotz der anderen Analysemöglichkeiten die Diagnose nicht eindeutig ist oder aber auch für experimentelle Studien [68]. Eine Studie konnte zeigen, dass bei 81% von 21 Patienten ohne im FEIA messbares spezifisches IgE, mit dem BAT eine Insektengiftsensibilisierung detektiert werden konnte. Der BAT kann detaillierte Informationen liefern und die Indikation zur Immuntherapie anzeigen bzw. als *FollowUp* einer Immuntherapie verwendet werden [3] [83].

Ein weiterer Vorteil ist, dass der BAT weniger stressvoll für die Patienten ist und keine allergische Reaktion hervorrufen kann [9]. Auch bei niedrigem Gesamt-IgE hat der BAT eine hohe Sensitivität [37].

Nachteile der flowzytometrischen Bestimmung sind ein hoher Zeitaufwand, eine schwierige Interpretation der Ergebnisse und hohe Kosten. Der BAT ist damit nicht für die Standarddiagnostik vorgesehen [78] [68].

Bereits in einer Studie von 1991 wurde der monoklonale Antikörper CD63 beschrieben, um die Aktivität der basophilen Granulozyten anhand der Verände-

rung an der Oberflächenexpression zu messen [55]. CD63 ist der am besten untersuchte Marker, der direkt mit der Basophilendegranulation bzw. -aktivierung verbunden ist [56] [53] [9].

Im Vergleich zu Mastzellen sind basophile Granulozyten zirkulierende, zwar leicht zu analysierende Zellen, aber als limitierender Faktor für die Diagnostik ist ihre geringe Anzahl anzusehen [81]. Unsere Studie zeigt, dass aber bereits mit 60ml Blut ausreichend basophilen Granulozyten gewonnen werden können. Die basophilen Granulozyten wurden mithilfe des *Diamond Basophil Isolation Kit, human* von den PMBC isoliert. Im Vergleich zu anderen bekannten Techniken lassen sich mit der magnetischen Separation höhere Reinheiten, insbesondere auch bei kleinen Zellpopulationen erzielen, obwohl eine hohe Reinheit mit einem niedrigen Zellangebot verbunden ist [63]. Mit der Positiv-Selektion sollen, im Vergleich zur Negativ-Selektion noch höhere Reinheiten erreicht werden, wobei aber die Gefahr der unkontrollierten Zellaktivierung besteht. Außerdem tragen positiv selektierten Zellen nach dem Vorgang entsprechende Antikörper auf der Oberfläche, was sich möglicherweise als störend herausstellen könnte. Hier besteht die Möglichkeit mit weiteren Schritten die *Beads* wieder zu entfernen. Zum Beispiel enzymatisch oder mithilfe des DETACHaBEADS® System [84]. Dies wurde in unserer Studie nicht angewendet.

Zunächst testeten wir die beiden Kits *Diamond Basophil Isolation Kit, human* und das *Basophil Isolation Kit, human* im Vergleich. Schaut man sich die beispielhafte Auswertung (Abbildung 18) an, fällt direkt auf, dass das *Diamond Kit* die stimulierten basophilen Granulozyten zuverlässiger isoliert.

Der BAT kann entweder mit Vollblut (BAT<sup>PBMC</sup>) oder ausschließlich mit basophilen Granulozyten (BAT<sup>BG</sup>) durchgeführt werden. Wobei der Test mit Vollblut am häufigsten angewendet wird [9]. Hierbei ergeben sich Unterschiede in Zeit, Aufwand und Durchführung. Für beide Tests wird EDTA Blut benötigt. Für den BAT<sup>PBMC</sup> nach Herstellerangaben reichen bereits weniger als 5ml Blut aus, während der BAT<sup>BG</sup> circa 60ml Blut benötigt, um zu einer ausreichenden Menge an basophilen Granulozyten zu gelangen. Liefert der BAT<sup>PBMC</sup> nach Herstellerangaben bereits nach circa einer Stunde Ergebnisse, sind beim BAT<sup>BG</sup> deutlich mehr Arbeitsschritte notwendig, so dass die Arbeitszeit circa 6-7h betrug. Durch das *Diamond Kit* fallen für den BAT<sup>BG</sup> deutlich mehr Kosten an. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der BAT<sup>BG</sup> teurer, zeitintensiver, technikintensiver, damit

auch fehleranfälliger als der  $BAT^{PBMC}$  ist. Außerdem werden zur Durchführung des  $BAT^{PBMC}$  patientenfreundlich nur 5ml Vollblut benötigt im Vergleich zu 60ml beim  $BAT^{BG}$ .

Zu diskutieren ist, ob die weiteren Zentrifugenschritte und Handhabung mit den Zellen bei der Versuchsreihe  $BAT^{BG}$  zu Zellverlust oder Zellschädigung führen und ob die vorherige Separation der basophilen Granulozyten zu Hintergrundaktivierungen führt [6, 57, 85]. Die Durchführung des Tests mit Vollblut spiegelt die physiologische Situation der basophilen Granulozyten im Vergleich zur selektiven Diagnostik eher wider. Andererseits können so Interferenzen mit anderen Serumbestandteilen, wie z.B. anti-IgE nicht ausgeschlossen werden und ebenfalls die Diagnostik beeinflussen [6, 57]. Die Separation von Zellen von schützenden Elementen aus dem Plasma könnte die Aktivierung von zellbindenden sIgE verbessern [9].

### **4.3 Interpretation der Ergebnisse im $BAT^{PBMC}$ und $BAT^{BG}$ in der vorliegenden Studie**

Vergleicht man die Auswertung des  $BAT^{PBMC}$  und  $BAT^{BG}$  miteinander, fällt auf, dass die Tests zu ähnlichen Ergebnissen kommen. Der BAT kann lediglich eine Aussage darüber treffen, ob eine Sensibilisierung gegen das getestete Allergen vorliegt oder nicht. Die absolute Zahl der basophilen Granulozyten, welche durch das Allergen aktiviert wurde, spiegelt nicht den Grad der Sensibilisierung wider. Steigt die Allergenkonzentration führt das auch zu einer Zunahme der aktivierten Basophilen. Eine erneute Abnahme der Aktivierung bei noch höheren Giftkonzentrationen würde durch toxische Effekte des Insektengifts zustande kommen [46].

In 25 Fällen stimmen die Resultate des  $BAT^{PBMC}$  und  $BAT^{BG}$  überein und zeigen in 6 Fällen davon ein falsch negatives Ergebnis. In 2 Fällen kommt es in der 1 zu 5 Verdünnung der standardisierten Konzentration des Allergens in beiden Tests zu einer Aktivierung  $<10\%$ . In 3 Fällen gibt es eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Tests. Bei Patient Nr. 20, Nr. 45 und Nr. 54 kommt es im  $BAT^{BG}$  in der 1 zu 5 Verdünnung zu einem positiven Ergebnis, während der  $BAT^{PBMC}$  hier unter  $10\%$  fällt.

Weiterhin unterscheiden sich die beiden Tests im Grad der Aktivierung. In 11 Fällen stimmen beiden Tests ungefähr überein (Differenz von bis zu 5% in der Aktivierung) in dem unverdünnten Hymenopterengiftansatz fällt der  $BAT^{PBMC}$  10 mal höher aus, und 7 mal der  $BAT^{BG}$ , während es in dem verdünnten Hymenopterengiftansatz umgekehrt ist: 10 mal fällt die Basophilenaktivierung im  $BAT^{BG}$  und 7 mal im  $BAT^{PBMC}$  höher aus.

Um eine korrekte Auswertung des BAT zu gewährleisten, sind bei jedem Versuch Positivkontrollen und eine Negativkontrolle notwendig.

Laut einer Studie reagieren 10-20% der Patienten auf eine IgE-Stimulation nicht. [86] Auch in einer anderen Quelle heißt es, dass 6-17% der Population nicht auf den Stimulus durch Aktivierung des  $Fc\epsilon RI$  reagieren und damit ein falsch-negatives Ergebnis zeigen können [9]. Der Flow2Cast® Test sieht deshalb vor 2 Positivkontrollen zu verwenden, da es Patienten gibt, die nur auf eine IgE-unabhängige Stimulation reagieren.

In unserer Studie funktionierten in 18 Fällen (64%) beide Positivkontrollen in beiden Tests. In 11 Fällen kam es zu Diskrepanzen zwischen den beiden Tests. Hier fällt insbesondere auf, dass die Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> in 8 Fällen im  $BAT^{BG}$  nicht funktionierte, dafür aber im  $BAT^{PBMC}$ . Hier zeigt sich eine große Diskrepanz in der Aktivierung der beiden verschiedenen Testdurchläufe. Diese reduzierte Aktivierung der Positivkontrollen nach Basophilenseparierung könnte auf eine methodisch bedingte reduzierte Ansprechbarkeit z.B. durch Zellschädigung hinweisen. In der Literatur wird angegeben, dass 15-20% der Patienten auf eine IgE-unabhängige Stimulation mit fMLP nicht reagieren [87].

In unserer Studie führte die Positivkontrolle<sup>anti-FcεRI</sup> sowohl im  $BAT^{PBMC}$ , als auch im  $BAT^{BG}$  bei 14% zu einer Aktivierung <10%. Die Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> funktionierte im  $BAT^{PBMC}$  bei 3,6% nicht (Aktivierung <10%). Im  $BAT^{BG}$  führte die Positivkontrolle<sup>fMLP</sup> bei 32% der Patienten nicht zu einer Aktivierung > 10%. Aus dieser Gruppe zeigten 3 weitere Patienten keine ausreichende Aktivierung auf beide durch beide Positivkontrollen. Ähnliches spiegelt sich bei den Positivkontrollen der Kontrollgruppe wider.

### 4.3.1 Doppelsensibilisierungen

Es wurde bereits erwähnt, dass die Doppelsensibilisierungen die Diagnostik erschweren kann und es insbesondere bei diesen Patienten zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. In der Literatur wird davon gesprochen, dass circa 30%-40% der Patienten eine Doppelpositivität im IgE aufweisen, obwohl in der Vergangenheit nur ein Stichereignis oder die Stiche von nur einem Insekt berichtet wurden [88, 89]. Japp *et al.* führten 2006 ebenfalls eine Studie zu dieser Problematik durch. Von 147 Patienten zeigten 24,5% sIgE zu beiden Giften [90].

Rund 60% der Patienten haben sIgE sowohl für Wespen- als auch Bienengift. Bei einem Viertel bis einem Drittel dieser Patienten zeigt der BAT aber nur ein positives Ergebnis an. [9] Von unseren 28 Patienten hatten im Vergleich dazu nur 35% (10 Patienten) sIgE für beide Gifte. Der BAT zeigte bei 9 von diesen 10 Patienten nur ein positives Ergebnis an und stimmte damit mit der Behandlungsdiagnose überein.

### 4.3.2 Sensitivität, Spezifität

Die Sensitivität des BAT wird mit 67-75%, aber auch Sensitivitäten von 85-100%, Spezifität 83-100% angegeben [32] [91]. Verbleiben Hauttest und serologische Diagnostik negativ, kann der BAT in 60-80% der Fälle eine IgE-abhängige Sensibilisierung identifizieren [31].

Mit einer gesamten Sensitivität von 75% beim BAT<sup>PBMC</sup> und 86% beim BAT<sup>BG</sup> kommen wir zu ähnlichen Ergebnissen, wie in vorherigen Studien angegeben. Insgesamt ergab sich beim BAT<sup>BG</sup>, wie bereits erwähnt eine Sensitivität von 86% aufgrund von 24 richtig positiven Ergebnissen und beim BAT<sup>PBMC</sup> eine geringere Sensitivität von nur 75% bei 21 richtig positiven Ergebnissen bezogen auf die Behandlungsdiagnose. Hier ergibt sich ein Unterschied von 11% in der Sensitivität. Diese starke Differenz muss mit dem Hintergrund einer geringen Probandenzahl betrachtet werden.

Unter Verdünnung des Hymenoptereingifts lässt sich nur eine geringe Tendenz zu einer verbesserten Sensitivität vermuten. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass das Verhältnis von angebotenen Allergen und Zielzelle die Sensitivität beeinflussen könnte. Eine höhere Allergenkonzentration führte auch zu einer höheren Aktivierung der basophilen Granulozyten.

Verschiedene Konzentrationen sind eine gute Alternative, sind allerdings zeitaufwendiger, teurer und können in ihrer Variabilität die Ergebnisse stark beeinflussen [81].

## 5 Schlussfolgerung

Die richtige Diagnostik ist der entscheidende Weg, um einen Therapieerfolg zu erzielen. Als Therapieerfolg wird ein Ausbleiben einer allergischen Reaktion bei Reexposition definiert und wird bei circa 95% der Wespengiftallergikern und nur 80-90% der Bienengiftallergikern angegeben [34]. Hier stellte sich uns die Frage, wie die gesamte Diagnostik noch verbessert werden kann, welche Rolle der BAT spielt, um unnötige Immuntherapien zu vermeiden, damit nicht nur der Patient, sondern auch das Gesundheitssystem entlastet werden. Beim spezifischen IgE stellte sich die Frage, wie gut die verfügbaren Testallergene sind und ob das vorhandene Panel an Komponenten ausreicht.

Weiterhin stellte sich die Frage, wie der BAT im Allgemeinen, bzw. auch der BAT<sup>BG</sup> noch verbessert werden kann. Hier könnten weitere Konzentrationen ausgetestet werden oder ggf. anstatt der nativen Gifte nur relevante Allergenkomponenten Anwendung finden. Abzuwägen sind aber die nur geringe Erhöhung der Sensitivität im Verhältnis zu Zeitaufwand und Kosten. Statistisch gesehen ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Basophilenaktivierung zwischen BAT<sup>PBMC</sup> und BAT<sup>BG</sup> in den beiden Verdünnungen. Die Positivkontrollen ergaben einen signifikanten Unterschied, was auf eine reduzierte Ansprechbarkeit nach Separation der basophilen Granulozyten hindeuten könnte.

Schwierigkeiten treten sowohl in der *in-vitro* als auch in der zellulären Diagnostik auf. Bei manchen Patienten fällt die Serumkonzentration von Insektengift-sIgE bereits nach einigen Wochen, bei den meisten aber erst nach Monaten oder Jahren unter die Nachweisgrenze [92].

Es ist auch möglich, dass Antikörper nicht mehr im Serum nachweisbar sind, aber die basophilen Granulozyten noch Allergen-spezifische IgE-Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen, sodass hier die zellulären Tests von Vorteil wären. Zelluläre Tests können aber wiederum auch negativ ausfallen, obwohl noch Antikörper im Serum nachgewiesen werden können [89]. Weiterhin kann die Kombination der

Testverfahren die Sensitivität erhöhen. Dies wird auch in unserer Studie bestätigt, da oft erst die Kombination von Anamnese, Serumdiagnostik und Hauttestung die vermutete Diagnose bestätigen konnte.

Es ist wichtig eine klinisch relevante Doppelpositivität von einer klinisch irrelevanten Doppelpositivität zu unterscheiden, insbesondere zum Schutz der Patienten, aber auch zur Einsparung von Kosten im Gesundheitssystem. Im Zweifelsfall sollte eine potenziell lebensrettende spezifischen Immuntherapie mit beiden Hymenopterengiften durchgeführt werden.

Aktuell lohnt es sich nicht den BAT<sup>BG</sup>, unter Berücksichtigung des Aufwandes im Verhältnis zur, nur tendenziell verbesserten Sensitivität durchzuführen. Möglicherweise können zukünftige, zellschonendere Separationsverfahren bessere Ergebnisse erzielen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Roberts, G., et al., *Neues Rahmenwerk zur Interpretation von IgE-Tests — eine wissenschaftliche Zusammenfassung*. Allergo Journal, 2018. **27**(5): p. 41-50.
2. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Das Immunsystem*, in *Stryer Biochemie*. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 993-1024.
3. Ansoerge, S., *Immunsystem*, in *Biochemie und Pathobiochemie*, G. Löffler, P.E. Petrides, and P.C. Heinrich, Editors. 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1103-1140.
4. Franco H. Falcone, H.H., and Bernhard F. Gibbs, *The human basophil: a new appreciation of 2019*.
5. Renz, H. and B. Gierten, *Durchflusszytometrie*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2019, Springer. p. 735-735.
6. Ebo, D., et al., *Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology*. Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2008. **74**(4): p. 201-210.
7. Bühring, H.-J., et al., *The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors*. Blood, 1999. **94**(7): p. 2343-2356.
8. Yanase, Y., et al., *Activation of Human Peripheral Basophils in Response to High IgE Antibody Concentrations without Antigens*. Int J Mol Sci, 2018. **20**(1).
9. Eberlein, B., et al., *Basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease – an overview*. Allergo Journal International, 2016. **25**(4): p. 106-113.
10. Miyake, K. and H. Karasuyama, *Emerging roles of basophils in allergic inflammation*. Allergol Int, 2017. **66**(3): p. 382-391.
11. Luttmann, W., et al., *Antikörper*, in *Der Experimentator: Immunologie*. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-50.
12. Averbeck, M., et al., *Immunologische Grundlagen der Allergien*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2007. **5**(11): p. no-no.
13. Valenta, R. and E. Wollmann, *Bedeutung rekombinanter Allergene und Allergenderivate*, in *Allergologie*, T. Biedermann, et al., Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 193-211.
14. Ruëff, F. and T. Jakob, *Erkrankungen durch Bienen-und Wespenstiche*. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie, 2017: p. 1-7.
15. Ring, J., et al., *Guideline for acute therapy and management of anaphylaxis: S2 Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Association of German Allergologists (AeDA), the Society of Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the German Academy of Allergology and Environmental Medicine (DAAU), the German Professional Association of Pediatricians (BVKJ), the Austrian Society for Allergology and Immunology (OGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine (DGAI), the German Society of Pharmacology (DGP), the German Society for Psychosomatic Medicine (DGPM), the German Working Group of Anaphylaxis Training and Education (AGATE) and the patient organization German Allergy and Asthma Association (DAAB)*. Allergo J Int, 2014. **23**(3): p. 96-112.
16. Graessel, A., et al., *Komponenten-aufgelöste Diagnostik der Hymenopteren-giftallergie*. BIoSpektrum, 2016. **22**(7): p. 713-716.
17. Klimek, L., et al., *Allergen-Microarrays für die molekulare Komponentendiagnostik von Typ-I-Allergien*. HNO, 2011. **59**(10): p. 988-993.
18. Lieberman, P., et al., *The diagnosis and management of anaphylaxis practice parameter: 2010 update*. Journal of Allergy and Clinical immunology, 2010. **126**(3): p. 477-480. e42.

19. Honold, M. and A. Walther, *Allergie und anaphylaktische Reaktionen*. Notfallmedizin up2date, 2011. **6**(02): p. 141-160.
20. Ring, J. and K. Brockow, *Soforttyp-Allergie: Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale, Anaphylaxie*, in *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, G. Plewig, et al., Editors. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 453-460.
21. Worm, M., *Epidemiologie der Anaphylaxie*. Der Hautarzt, 2013. **64**(2): p. 88-92.
22. Adib-Tezer, H., *Bienen- und Wespengiftallergie: Sensibilisierung und spezifische Immuntherapie*. JDDG, 2018. **16**(10): p. 1248.
23. Ben-Shoshan, M. and A. Clarke, *Anaphylaxis: past, present and future*. Allergy, 2011. **66**(1): p. 1-14.
24. Schäfer, T., *Epidemiologie der Insektengiftallergie*. Allergo Journal, 2009. **18**(5): p. 353-358.
25. Bilo, B.M., et al., *Diagnosis of Hymenoptera venom allergy*. Allergy, 2005. **60**(11): p. 1339-49.
26. Wieczorek, D., A. Kapp, and B. Wedi, *Insektengiftallergie im Kindesalter*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2017. **165**(2): p. 117-123.
27. Przybilla, B., et al., *Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie*. Allergo Journal, 2011. **20**(6): p. 318-339.
28. Przybilla, B. and F. Ruëff, *Insektengiftallergie*, in *Allergologie*, T. Biedermann, et al., Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 239-248.
29. Jakob, T., et al., *Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie: aktuelle Konzepte und Entwicklungen mit besonderem Fokus auf die molekulare Allergiediagnostik*. Allergo Journal, 2017. **26**(3): p. 33-50.
30. Klimek, L., O. Pfaar, and E. Rietschel, *Allergien bei Kindern und Jugendlichen: Grundlagen und klinische Praxis*. 2013: Schattauer Verlag.
31. Müller, S., *Problemfälle der In-vitro-Diagnostik bei Hymenoptereingiftallergie*. Der Hautarzt, 2014. **65**(9): p. 790.
32. Hemmer, W., *Kreuzreaktionen zwischen den Giften von Hymenopteren unterschiedlicher Familien, Gattungen und Arten*. Der Hautarzt, 2014. **65**(9): p. 775.
33. Jakob, T., S. Blank, and E. Spillner, *Optimierte Diagnostik der Insektengiftallergie durch rekombinante Allergene*, in *Molekulare Allergiediagnostik*, J. Kleine-Tebbe and T. Jakob, Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 257-275.
34. Reimers, A. and U. Müller, *Labordiagnostik bei der Insektengift-Allergie/Laboratory Examinations in Hymenoptera Venom Allergy*. LaboratoriumsMedizin, 2002. **26**(3/4): p. 115-119.
35. Klimek, L. and S. Becker, *Molekulare, komponenten-basierte Diagnostik in der HNO-ärztlichen Allergologie*. HNO, 2017. **65**(10): p. 818-825.
36. Spillner, E., S. Blank, and T. Jakob, *Potenzial, Fallstricke und aktueller Status der molekularen Diagnostik am Beispiel der Insektengiftallergie*. Allergo Journal, 2012. **21**(4): p. 249-258.
37. Fischer, J. and A.S. Yazdi, *Moderne Allergiediagnostik und ihre klinische Anwendung*. Der Hautarzt, 2016. **67**(1): p. 27-32.
38. Matricardi, P., et al., *EAACI molecular allergology user's guide*. Pediatric Allergy and Immunology, 2016. **27**: p. 1-250.
39. Boumiza, R., A.L. Debard, and G. Monneret, *The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives*. Clin Mol Allergy, 2005. **3**: p. 9.
40. Ruëff, F., et al., *Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttypreaktionen*. Allergo Journal, 2010. **19**(6): p. 402-415.
41. Schiener, M., et al., *Allergen-specific immunotherapy of Hymenoptera venom allergy - also a matter of diagnosis*. Hum Vaccin Immunother, 2017. **13**(10): p. 2467-2481.

42. Dreborg, S., *Histamine reactivity of the skin*. Allergy, 2001. **56**(5): p. 359-64.
43. Ishizaka, K., T. Ishizaka, and M.M. Hornbrook, *Physicochemical properties of reaginic antibody: V. Correlation of reaginic activity with  $\gamma$ E-globulin antibody*. The Journal of Immunology, 1966. **97**(6): p. 840-853.
44. Ott, H., J. Baron, and H.F.J.D.H. Merk, *In-vitro-Testungen in der Allergologie*. 2006. **57**(6): p. 502-508.
45. Johansson, S., H. Bennich, and L. Wide, *A new class of immunoglobulins in human serum*. Immunology, 1968. **14**(2): p. 265.
46. Neis, M.M., et al., *In-vitro-Diagnostik und Monitoring bei Insektengifthyposensibilisierung*. Der Hautarzt, 2011. **62**(9): p. 677.
47. Przybilla, B., et al., *Erhöhte basale Serumtryptasekonzentration oder Mastozytose als Risikofaktor der Hymenoptereingiftallergie Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAKI)(AWMF-Leitlinie 061/018)/Elevated basal serum tryptase concentration or mastocytosis as a risk factor in Hymenoptera venom allergy (AWMF-Guideline 061/018)*. LaboratoriumsMedizin, 2007. **31**(5): p. 214-217.
48. Stoevesandt, J. and A. Trautmann, *Bienen- und Wespengiftallergie in verschiedenen Lebensphasen*. Akt Dermatol, 2019. **45**(01/02): p. 24-31.
49. Yavuz, S.T., et al., *Clinical features of children with venom allergy and risk factors for severe systemic reactions*. International archives of allergy and immunology, 2013. **160**(3): p. 313-321.
50. Radüge, I. and T. JakobGunter, *Update Insektengiftallergie: Fragen und Antworten aus der Allergieforschung*. Allergo Journal, 2017. **26**(8): p. 46-50.
51. Müller, U.R., *Rekombinante Hymenoptereingiftallergene*. Allergo Journal, 2003. **12**(1): p. S25-S31.
52. Jappe, U., *Nomenklatur der Allergene*. Der Hautarzt, 2018. **69**(1): p. 90-91.
53. Starostzik, C. and T. Jakob, *Basophilenaktivierungstest: Provokation auf zellulärer Ebene*. Allergo Journal, 2016. **25**(4): p. 14-15.
54. Santos, A.F., et al., *The expression of CD123 can decrease with basophil activation: implications for the gating strategy of the basophil activation test*. Clinical and translational allergy, 2016. **6**(1): p. 11.
55. Knol, E.F., et al., *Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1991. **88**(3): p. 328-338.
56. Wedi, B., *Zelluläre In-vitro-Allergiediagnostik*. Der Hautarzt, 2010. **61**(11): p. 960.
57. Ebo, D., et al., *Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives*. Allergy, 2006. **61**(9): p. 1028-1039.
58. Bühring, H.-J., A. Streble, and P. Valent, *The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis*. International archives of allergy and immunology, 2004. **133**(4): p. 317-329.
59. Eberlein-König, B., et al., *Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy*. Allergy, 2006. **61**(9): p. 1084-1085.
60. Eberlein, B., et al., *A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics*. Clinical & Experimental Allergy, 2010. **40**(3): p. 411-418.
61. Kepley, C.L., et al., *Multiple defects in Fc epsilon RI signaling in Syk-deficient nonreleaser basophils and IL-3-induced recovery of Syk expression and secretion*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5913-20.
62. [www.phadia.com](http://www.phadia.com). <http://WWW/de/4/Produkte/Tests/ImmunoCAP-Tryptase/Testprinzip-ImmunoCAP-Tryptase/>.
63. Luttmann, W., et al., *Zellseparation*, in *Der Experimentator: Immunologie*. 2014, Springer. p. 51-72.
64. Christen, P., R. Jaussi, and R. Benoit, *Trennverfahren und allgemeine Analysemethoden*, in *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 479-492.

65. Biosciences, B. *Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung*. 2014.
66. ; Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/GB-en/resources/macshandbook/macstechnologies/cell-separation/magnetic-cell-separation.html#structure-section-f0e4f47f-76ac-4be8-9e92-8f8cf87cd50b>.
67. Luttmann, W., et al., *Durchflusszytometrie*, in *Der Experimentator: Immunologie*. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 73-101.
68. Eberlein-König, B., et al., *Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit insect venom allergy*. JOURNAL OF INVESTIGATIONAL ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 2004. **14**(1): p. 10-16.
69. Baker, T.W., et al., *The HIT study: Hymenoptera Identification Test—how accurate are people at identifying stinging insects?* Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2014. **113**(3): p. 267-270.
70. Mauss, V. and F. Ruëff, *Hinweise zur Unterscheidung von Bienen- und Wespengruppen mit Relevanz für systemische Stichreaktionen in Zentraleuropa*. Allergo Journal, 2017. **26**(3): p. 20-27.
71. Stoevesandt, J. and A. Trautmann, *Bee and Vespula Venom Allergy Throughout the Stages of Life*. AKTUELLE DERMATOLOGIE, 2019. **45**(1-2): p. 24-31.
72. Przybilla, B., J. Ring, and F. Rueff, *Anaphylaxie*. Der Hautarzt, 2007. **58**(12): p. 1025.
73. Ruëff, F., et al., *Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttyp-Reaktionen*. Pneumologie, 2011. **65**(08): p. 484-495.
74. Möbs, C., D. Wiedemann, and W. Pfützner, *Evaluation of a modified skin prick test for diagnosis of Hymenoptera venom allergy*. Allergo Journal International, 2019. **28**(2): p. 43-49.
75. Lockey, R.F., et al., *Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST)*. Journal of allergy and clinical immunology, 1987. **79**(4): p. 660-677.
76. Spillner, E., S. Blank, and T. Jakob, *Hymenoptera allergens: from venom to "venome"*. Frontiers in immunology, 2014. **5**: p. 77.
77. Ebo, D., et al., *Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy*. Clinical & Experimental Allergy, 2013. **43**(2): p. 255-261.
78. Kohler, J., et al., *Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(5): p. 1383-9, 1389.e1-6.
79. Frick, M., et al., *Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy*. Journal of allergy and clinical immunology, 2016. **138**(6): p. 1663-1671. e9.
80. Blum, S., et al., *Influence of total and specific IgE, serum tryptase, and age on severity of allergic reactions to Hymenoptera stings*. Allergy, 2011. **66**(2): p. 222-228.
81. Chirumbolo, S., *Basophil activation test in allergy: time for an update?* International archives of allergy and immunology, 2012. **158**(2): p. 99-114.
82. Kleine-Tebbe, J., *Immunologisch basierte allergologische Diagnostik in vitro und ex vivo*. Allergo Journal, 2003. **12**(3): p. 198-200.
83. Hoffmann, H.J., et al., *The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease*. Allergy, 2015. **70**(11): p. 1393-405.
84. Scouten, W.H. and P. Konecny, *Reversible immobilization of antibodies on magnetic beads*. Analytical biochemistry, 1992. **205**(2): p. 313-318.
85. Hemmings, O., et al., *Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy*. Curr Allergy Asthma Rep, 2018. **18**(12): p. 77.
86. Kleine-Tebbe, J., et al., *Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives*. International archives of allergy and immunology, 2006. **141**(1): p. 79-90.

87. Nguyen, K.-L., S. Gillis, and D.W. MacGlashan Jr, *A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking*. *Journal of allergy and clinical immunology*, 1990. **85**(6): p. 1020-1029.
88. Egner, W., et al., *The frequency and clinical significance of specific IgE to both wasp (Vespula) and honey-bee (Apis) venoms in the same patient*. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 1998. **28**(1): p. 26-34.
89. Rüeff, F., *Standards und Fallstricke der In-vitro-Diagnostik der Insektengiftallergie*. *Der Hautarzt*, 2010. **61**(11): p. 945.
90. Jappe, U., et al., *In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition*. *Allergy*, 2006. **61**(10): p. 1220-1229.
91. Ott, H., *Basophil Activation Test for the Diagnosis of Hymenoptera Venom Allergy in Childhood: a Pilot Study*. *Klinische Pädiatrie*, 2011. **223**(1): p. 32.
92. Mosbech, H., et al., *Insect allergy. Predictive value of diagnostic tests: a three-year follow-up study*. *Clinical & Experimental Allergy*, 1986. **16**(5): p. 433-440.

## 7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Einteilung der Immunreaktionen nach Coombs und Gell [12].</i>	2
<i>Tabelle 2: Übersicht über die Anaphylaxiegrade nach Ring und Messner [15].</i>	4
<i>Tabelle 3: Risikofaktoren für eine Anaphylaxie. (modifiziert nach [27])</i>	4
<i>Tabelle 4: Hinweise auf das reaktionsauslösende Insekt [27].</i>	6
<i>Tabelle 5: Rekombinante Hymenopterenengiftallergene bei der Biene und Wespe. (modifiziert nach [25, 31, 51] [52])</i>	10
<i>Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien.</i>	15
<i>Tabelle 7: Einteilung der FEIA-Klassen anhand des spezifischen IgE (kU/l) (linke Seite) sowie Einteilung der Wahrscheinlichkeit einer Allergie anhand des Gesamt-IgE (rechte Seite).</i>	17
<i>Tabelle 8: Übersicht über mittlere Dichten von humanen Blutzellen, weiteren Blutbestandteilen und Ficoll (modifiziert nach [63]).</i>	20
<i>Tabelle 9: Klinische Charakterisierung der Patientengruppen.</i>	32
<i>Tabelle 10: Charakterisierung der Allergene.</i>	33
<i>Tabelle 11: Ergebnisse der komponentenbasierten Diagnostik mittels FEIA bei Patienten mit anamnestisch belegter anaphylaktischer Reaktion.</i>	38
<i>Tabelle 12: Ergebnisse <math>BAT^{PBMC}</math> und <math>BAT^{BG}</math> der Basophilenaktivierung bei Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und mit Nachweis von spezifischen IgE gegen Wespengift in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftkonzentration.</i>	42
<i>Tabelle 13: Ergebnisse <math>BAT^{PBMC}</math> und <math>BAT^{BG}</math> der Basophilenaktivierung bei Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und mit Nachweis von spezifischen IgE gegen Bienen- oder Wespengift in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Wespengiftkonzentration.</i>	44
<i>Tabelle 14: Ergebnisse <math>BAT^{PBMC}</math> und <math>BAT^{BG}</math> der Basophilenaktivierung bei Patienten mit anamnestisch anaphylaktischer Reaktion und mit Nachweis von spezifischen IgE gegen Bienengift in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Bienengiftkonzentration.</i>	45
<i>Tabelle 15: Darstellung der Basophilenaktivierung bei gesunden Spendern in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Positivkontrolle fMLP und anti-FcεRI im <math>BAT^{PBMC}</math> und <math>BAT^{BG}</math>. Basophilenaktivierungen &lt;10% sind fett gedruckt; Grau hinterlegt sind Basophilenaktivierungen &lt;10%.</i>	50
<i>Tabelle 16: Sensitivität <math>BAT^{PBMC}</math> und <math>BAT^{BG}</math>.</i>	52
<i>Tabelle 17: Nichtparametrischer Test: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test Vergleich <math>BAT^{PBMC}</math> und <math>BAT^{BG}</math>.</i>	53
<i>Tabelle 18: Mittelwerte im <math>BAT^{PBMC}</math> und <math>BAT^{BG}</math>.</i>	54

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prinzip Aktivierungsmarker. Das membrangebundene IgE wird nach Antigenkontakt vernetzt und es kommt zur Freisetzung der Mediatoren. Die spezifischen Aktivierungsmarker CD63 und CD203c werden hochreguliert. (modifiziert nach [5]) .....	10
Abb. 2: Entscheidungshilfe bei der Allergiediagnostik [62]. .....	18
Abb. 3: Verteilungsmuster a) vor und b) nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation [44]. ...	19
Abb. 4: Prinzip der magnetischen Zellmarkierung (modifiziert nach [66]).....	23
Abb. 5: BAT bei Typ I-Allergie. Das Vollblut wird mit den Allergenen inkubiert. In der FACS-Analyse werden die basophilen Granulozyten identifiziert und deren spezifische Aktivierung über den Oberflächenmarker CD63 dargestellt. a) Selektion der basophilen Granulozyten mittels CCR3-PE/Side Scatter, b) Negativkontrolle bei einem Patienten mit Wespengiftallergie, c) positive Reaktion bei einem Patienten mit Wespengiftallergie. ....	24
Abb. 6: Grundlage der Durchflusszytometrie. Die fluorochrommarkierten Antikörper koppeln spezifisch an die Antigene auf der Zelloberfläche. ....	26
Abb. 7: Merkmale der Lichtstreuung. Seitwärtsstreulichtdetektor (Side-Scatter, SSC), die seitliche Ablenkung misst extra- und intrazelluläre Strukturen, ist proportional zur Zellgranularität. Der Vorwärtsstreulichtdetektor (Forward-Scatter, FSC), die Vorwärtsablenkung misst Zellgrößen. ....	28
Abb. 8: Drei unterschiedliche Populationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) im SSC-Diagramm. ....	29
Abb. 9: Selektion von basophilen Granulozyten. R1 repräsentiert die CCR3 positiven basophilen Granulozyten. ....	29
Abb. 10: Bestimmung Prozentsatz der CD63-positiven Zellen (Q2) im Vergleich zu der Gesamtzahl aller basophilen Granulozyten (Q2 und Q4). Links Patient mit Wespengiftallergie. Rechts gesunder Spender ohne Nachweis einer Wespengiftallergie. ....	30
Abb. 11: Basophilen Granulozyten im FSC/SSC Diagramm. ....	30
Abb. 12: R1 repräsentiert die CCR3 positiven basophilen Granulozyten. ....	30
Abb. 13: Bestimmung Prozentsatz der CD63-positiven Zellen (Q2) im Vergleich zu der Gesamtzahl aller Basophilen Granulozyten (Q2 und Q4). ....	31
Abb. 14: Verteilung des Alters im Zusammenhang mit dem Schweregrad der anaphylaktischen Reaktion. ....	33
Abb. 15: Angaben der Stichnamnese bei 28 Patienten, Häufigkeit in Prozent. ....	34
Abb. 16: Anzahl der Patienten eingeteilt in Schweregrad 0-4. ....	34
Abb. 17: Ergebnisse im Gesamt-IgE, Anzahl der Patienten innerhalb der drei Klassen. ....	36
Abb. 18: Vergleich der Kits: links: Verwendung Basophil Isolation Kit, human. rechts: Verwendung Diamond Basophil Isolation Kit, human: R1 repräsentiert die CCR3 positiven Basophilen Granulozyten. ....	40
Abb. 19: Vergleich der Kits: links: Verwendung Basophil Isolation Kit, human. rechts: Verwendung Diamond Basophil Isolation Kit, human: Bestimmung Prozentsatz der hell-	

fluoreszierten (CD63-positiven) Zellen (Q2) im Vergleich zu der Gesamtzahl aller Basophilen Granulozyten (Q2 und Q4). .....	40
Abb. 20: Der Vergleich der Basophilenaktivierung (CD63-Expression) zwischen $BAT^{PBMC}$ (graue Balken) und $BAT^{BG}$ (weiße Balken) in Prozent aller 28 Patienten nach Inkubation mit Puffer (=Negativkontrolle), fMLP (=Positivkontrolle 1), anti-fcεRI (=Positivkontrolle 2) und zwei verschiedenen Bienen- und Wespengiftkonzentrationen bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion in der Anamnese, sowie Nachweis von spezifischem IgE. Es zeigt sich tendenziell eine höhere Basophilenaktivierung im $BAT^{PBMC}$ , außer in dem unverdünnten Allergenansatz. .	46
Abb. 21: Darstellung der 3 Patienten die im $BAT^{BG}$ positiv ausfielen, im $BAT^{PBMC}$ negativ. Bei allen drei Patienten fällt der verdünnte Allergenansatz in beiden Tests unter 10% Basophilenaktivierung aus, im unverdünnten Allergenansatz der $BAT^{BG}$ über 10%. .....	47
Abb. 22: Vergleich $BAT^{PBMC}$ (graue Balken) und $BAT^{BG}$ (weiße Balken) bei 10 Spendern (ohne Nachweis einer Bienen- oder Wespengiftallergie) Basophilenaktivierung (CD 63- Expression) in Prozent. ....	48
Abb. 23: Positivkontrollen fMLP und anti-FcεRI im $BAT^{PBMC}$ und $BAT^{BG}$ bei 11 Patienten im Vergleich. Bei 11 Patienten kommt es in den Positivkontrollen zu Diskrepanzen zwischen den beiden Tests, die Positivkontrolle <sup>anti-FcεRI</sup> fällt deutlich öfter im $BAT^{BG}$ negativ aus. ....	49
Abb. 24: Darstellung der Anzahl positiver Testergebnisse der Testverfahren ( $BAT^{PBMC}$ , $BAT^{BG}$ , Hauttestung, sIgE im Bezug zur Behandlungsdiagnose) bei 4 Patienten mit der Behandlungsdiagnose einer Bienengiftallergie. (BD: Behandlungsdiagnose) .....	51
Abb. 25: Darstellung der Anzahl positiver Testergebnisse der Testverfahren ( $BAT^{PBMC}$ , $BAT^{BG}$ , Hauttestung, sIgE im Bezug zur Behandlungsdiagnose) bei 23 Patienten mit der Behandlungsdiagnose einer Wespengiftallergie. (BD: Behandlungsdiagnose) .....	51

## 9 Anhang

Ergänzung zur statistischen Auswertung:

Statistik für Vorzeichentest				
	BAT <sup>PBMC</sup> - BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup> ver- dünnt – BAT <sup>BG</sup> verdünnt	PC1 BAT <sup>PBMC</sup> - PC1 BAT <sup>BG</sup>	PC2 BAT <sup>PBMC</sup> - PC2 BAT <sup>BG</sup>
<b>Z</b>	-,567	-1,701	-2,835	-3,969
<b>Asymptotische Signifikanz (2-seitig)</b>	,571	,089	,005	,000

Tabelle 1: Statistik für den Vorzeichentest

Korrelationen				
			Alter	Schweregrad
<b>Spearman-Rho</b>	Alter	Korrelationskoeffizient	1,000	,094
		Sig. (2-seitig)	.	,635
		N	28	28
	Schweregrad	Korrelationskoeffizient	,094	1,000
		Sig. (2-seitig)	,635	.
		N	28	28

Tabelle 2: Spearman-Rang-Korrelationen zwischen Alter und dem Schweregrad der anaphylaktischen Reaktion

( $r_s = .094$ ,  $p = .635$ ,  $n = 28$ ).

Pat-Nr.	Gesamt-IgE	Wepengift	Bienen-gift	Negativ-kontrolle		Positivkontrolle (anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)		Allergen (unverdünnt)		Allergen (verdünnt)	
				BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>
6	35,7	0	0	0,25	2,05	83,33	29,09	17,22	29,09	0,74	1,11	1,02	1,59
7	n.e.	0	0	0,29	k.D.	91,17	k.D.	26,98	k.D.	0,56	k.D.	0,73	k.D.
13	n.e.	0	0	1,5	1,05	78,8	69,44	15,68	12,76	1,29	0,84	1,31	1,43
14	2	0	0	0	0,63	93,27	71,4	51,7	56,53	0,26	0,65	0,78	1,35
15	6,34	0	0	1,11	0,22	87,4	21,32	62,98	13,67	0,33	0	0	0,45
16	162	0	0	1,02	0	42,28	11,41	89,54	36,83	1,28	0,4	1,63	0
18	39,8	0	0	0	1,39	62,83	77,43	17,33	9,53	0	0	0,25	1,14
19	63,3	0	0	1,55	0	80,65	57,01	16,21	8,32	0,85	0,23	0,28	1,17
28	16	0	0	1,05	0	93,63	42,71	53,73	18,54	1,24	0,41	0,82	0,21
41	7,59	0	0	0,42	1,08	87,98	39,07	63,08	27,88	0,83	0,63	0,21	0,42
52	9,33	0	0	0,91	0,43	2,31	2,05	53,14	35,26	0,71	1,88	0,91	0,85

**Tabelle 3: Gesunde Patienten ohne bekannte Allergie.** Der Tryptase-Wert und die einzelnen Komponenten wurden nicht bestimmt.

Pat-Nr.	Versuchsallegen	Negativkontrolle		Positivkontrolle (anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)		Allergen (unverdünnt)		Allergen (verdünnt)	
		BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>
22	Ibuprofen	0	n.a.	81,82	n.a.	6,16	n.a.	0,86	n.a.	0,74	n.a.
24	Ibuprofen	1,4	1,21	88,22	16,93	34,35	19,76	14,38	1	3,69	1,65
58	Ibuprofen	0,66	4,16	90,96	70,83	48,16	54,92	0,94	4,81	3,21	7,41
58	Novalgin	0,66	4,16	90,96	70,83	48,16	54,92	0,45	5,63	1,38	7,54
59	Ibuprofen	0,49	0,42	79,26	69,54	63,97	50,79	0,95	0,78	1,39	2,24
59	Paracetamol	0,49	0,42	79,26	68,87	63,97	49,9	0,25	0,65	2,02	1,29
60	Penicillin	1,37	1,28	80,22	50,58	57,86	29,64	0,64	1,05	1,22	1,59
60	Cefaclor	1,37	1,28	80,22	50,58	57,86	29,64	0,31	1,56	0,57	3,05

**Tabelle 4: Patienten die auf eine Allergie auf Medikamente getestet wurden.**

Pat.Nr.	Gesamt-IgE	Tryptase	Versuchsgift	Negativkontrolle		Positivkontrolle (anti-FcεRI)		Positivkontrolle (fMLP)		Allergen (unverdünnt)		Allergen (verdünnt)	
				BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>	BAT <sup>PBMC</sup>	BAT <sup>BG</sup>
1	n.e.	n.e.	Biene	2,15	1,53	97,16	60,14	66,95	58,47	14,41	1,85	14,86	3,27
2	n.e.	n.e.	Wespe	0,77	2,49	73,15	84,31	54,32	50,7	24,46	84,32	4,06	44,86
4	55,6	n.e.	Wespe	0,51	3,35	91,74	52,71	50,88	29,56	1,76	5,29	1,21	11,11
11	6,64	7,92	Wespe	1,69	2,08	93,7	93,36	72,14	55,45	97,42	95,7	91,32	92,13
12	132	3,71	Biene	0,3	0	43,02	30,51	46,88	15,4	5,67	16,77	1,89	1,05
			Wespe	0,7	0,4	28,15	29,12	41,67	20,45	15,26	14,02	1,46	2,87
17	132	3,71	Biene und Wespe	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
20	74,2	3,71	Biene	0	0,2	77,26	80,38	19,06	19,32	17,45	36,8	7,32	55,51
21	8,04	2,04	Biene	2,1	0	73,97	40,72	27,21	12,73	74,66	38,59	47,71	35,44
			Wespe	2,1	0,61	73,97	40,72	27,21	12,73	2,88	1,88	3,56	0,82
23	21,9	3,87	Wespe	1,42	1,48	76,27	87,24	28,73	23,22	82,47	75,52	54,98	24,94
25	16,6	4,51	Wespe	0,77	0,63	62	42,24	6,67	7,39	56,94	59,96	18,18	55,81
26	150	5,76	Wespe	0,51	0,22	7,2	17,85	37,76	53,52	2,39	13,38	0,26	3,78
27	112	2,51	Wespe	1,26	14	90,32	31,03	5,57	21,93	86,91	32,12	86,79	30,51
29	46,9	16,4	Wespe	1,4	1,52	95,59	88,32	49,6	26,52	93,73	90,85	90,46	91,42
30	51	5,41	Wespe	0,5	0,2	49,42	21,13	35,38	10	57,94	20,48	41,76	28,97
31	14,9	6,52	Wespe	0,56	0,4	81,32	74,95	47,38	28,89	69,24	89,03	49,85	67,12
32	61,8	2,38	Biene	1,47	1,47	6,67	6,67	35,66	35,66	2,99	2,99	2,69	2,69
			Wespe	0,83	0,83	3,4	3,4	33,57	33,57	0,21	0,21	0,21	0,21
33	183	3,78	Biene	0	0,18	81,62	51,61	10,06	4,41	1,03	0,39	1,94	0
			Wespe	0	0,18	81,71	51,61	10,43	4,41	83,58	48,53	43,27	56,01
34	87,3	1,75	Biene	0,62	1,16	92,06	77,42	28,69	15,27	1,24	3,25	1,04	0,84
			Wespe	0,84	1,16	93,52	77,42	29,48	15,27	53,98	74,48	13,03	49,76
35	393	2,07	Biene	0,62	0,33	34,98	28,86	65,14	27,26	0,22	0,36	0,48	0,34
			Wespe	0,62	0,33	34,98	28,86	65,14	27,26	4,25	13,91	0	0,68
36	195	4,17	Wespe	0	0,4	95,79	58,89	11,73	2,24	95,96	61,79	91,08	56,65
37	92,9	5,19	Biene	0,47	0,96	68,51	40,04	63,01	27,11	1,63	2,71	0,89	0,56
			Wespe	1,18	0,98	69,74	38,84	67,15	26,68	77,78	46,27	30,46	15,5
38	fehlt	fehlt	Wespe	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

39	123	2,96	Wespe	0,8	0,69	1,69	0,99	25,05	3,09	1,26	2,05	1,57	1,26
40	8,76	5,37	Wespe	0,42	1,05	80,49	39,07	39,39	12,47	54,35	39,88	57,39	28,66
42	23,7	2,367	Biene	1,23	1,02	37,21	64,2	61,72	42,57	1,02	1,08	0,41	0,2
			Wespe	1,03	0,97	41,92	63,62	63,6	43,64	34,99	71,53	37,47	65,82
43	9,38	4,73	Wespe	0	0,4	73,93	6,02	15,49	0,6	77,69	15,92	75,63	9,84
			Biene	0,4	0,56	76,78	6,49	18,35	1,15	0,4	1,48	0	0,47
44	56,2	1,71	Wespe	0,83	0,8	42,12	55,29	44,4	34,72	38,79	34,95	35,41	53,17
			Biene	0,63	0,99	33,95	55,99	39,76	35,21	0,63	0,63	0,62	1,24
45	133	5,25	Wespe	0,84	0,43	87,17	41,25	22,98	11,85	35,87	52,21	4,74	29,8
			Biene	0,64	0,39	87,22	40,27	21,61	13,45	1,07	0,58	0,75	0
46	84	2,04	Wespe	0,41	0	2,36	1,48	10	1,66	2,23	2,59	1,01	2,38
			Biene	0,39	0	2,52	1,34	10,06	1,32	0,2	0,19	0,4	0
47	16,7	2,37	Wespe	1,5	2,31	80,37	65,52	30,43	19,31	0	2,81	2,4	2,85
48	22,2	1,94	Wespe	1,08	1,84	91,93	81,34	55,86	32,34	85,14	85,17	63,53	72,88
			Biene	1,07	2,2	92,4	81,89	57,63	32,68	2,38	4,19	1,04	2,95
49	8,13	2,14	Biene	0,21	0,61	75,68	61,9	13,62	5,65	42,54	45,75	2,11	2,79
			Wespe	0,21	0,6	76,51	62,15	15,88	5,68	0,24	1,11	1,16	2,3
50	642	4,62	Wespe	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
51	142	11,5	Wespe	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
53	169,06	2,07	Wespe	0,17	0,2	34,7	11,87	20,84	11,54	1,23	0,77	0,85	1,89
			Biene	0,17	0,2	34,7	11,87	20,84	11,54	0	0,19	0,73	0,57
54	40,9	1,98	Wespe	2,5	0,19	80,08	26,56	10,56	1,75	64,32	35,46	7,74	17,75
			Biene	2,15	0,19	80,08	26,56	15,56	1,75	0,43	0	0,87	0,32
55	198	5,09	Wespe	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
56	17,9	3,33	Wespe	0,44	97	90,99	55,37	18,74	4,47	72,98	46,42	21,59	23,77
			Biene	0,44	0,94	90,91	55,93	18,2	4,61	0	0	0,32	0,22

**Tabelle 5: Ergebnisse aller Patienten mit Wespen- und Bienengiftallergie.**

Ergänzungen zur Hauttestung:

Patient	Behandlungs- diagnose	Prick Wespe (µg/ml)	Prick Biene (µg/ml)	Intrakutan Wespe (µg/ml)	Intrakutan Biene (µg/ml)
11	Wespenallergie	0	0	0,001	0
23	Wespenallergie	10 100 300	300	0	0,001
25	Wespenallergie	100 300	0	-	-
26	Wespenallergie	300	0	-	-
29	Wespenallergie	300	0	-	-
30	Wespenallergie	10 100 300	0	-	-
31	Wespenallergie	0	0	0,01 01	0
33	Wespenallergie	10 100 300	0	-	-
34	Wespenallergie	0	100	0,01	0
35	Wespenallergie	100 300	0	-	-
36	Wespenallergie	300	0	0	1
37	Wespenallergie	0	100 300	0	0
39	Wespenallergie	10 100 300	0	-	-
40	Wespenallergie	100 300	0	-	-
42	Wespenallergie	100 300	0	-	-
43	Wespenallergie	10 100 300	0	-	-
44	Wespenallergie	100 300	0	-	-
45	Wespenallergie	10 100 300	0	-	-
46	Wespenallergie	100 300	0	-	-
48	Wespenallergie	10 100 300	0	-	-
53	Wespenallergie	0	0	1	-
54	Wespenallergie	300	0	-	-
56	Wespenallergie	300	0	-	-
20	Bienenallergie	0	10 100 300	-	-
21	Bienenallergie	0	1 10 100 300	-	-
32	Bienenallergie	0	100 300	-	-
49	Bienenallergie	0	100 300	-	-
12	Wespenallergie und Bienenallergie	100 300	100 300	-	-

Tabelle 6: Ergebnisse in der Hauttestung.

## **10 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich in so vielfältiger Weise unterstützt haben.

Zuallererst danke ich PD Dr. Stephan Meller für die Bereitstellung des Themas, fachliche Unterstützung und kompetente Beratung und natürlich Korrektur der gesamten Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Martin Wagenmann für die Bereitschaft als Zweitkorrektor und Zweitprüfer meiner Arbeit zu fungieren.

Weiterhin danke ich Ulrike Keil, Sabine Kellermann und Heike Hawerkamp für die technische Anleitung und Einführung, insbesondere in die FACS-Analyse, sowie allen weiteren Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Ich danke allen Patienten und freiwilligen gesunden Spendern, welche durch eine bereitwillige Blutspende zu dieser Studie beitrugen.

Zu guter Letzt gebührt ein großes Dankeschön meiner Mutter, ohne deren Zuspruch ich eine Doktorarbeit sehr wahrscheinlich nicht begonnen hätte und an Arthur, der durch seine Unterstützung wesentlich zum Gelingen beigetragen hat.