

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

**Vergleich zweier Immunoassays zum Nachweis  
Bienen- und Wespengiftspezifischer Antikörper**

**David von Kleist**

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. W. Ollert

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. B. Pontz

Die Dissertation wurde am 05.06.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2002 angenommen.

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	<b><u>Seite</u></b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Allgemeines	5
1.2. Wespe oder Biene	10
1.3. Klinik und Epidemiologie	12
1.4. Hyposensibilisierung	13
1.5. Derzeitiger Stand und Probleme der in-vitro Diagnostik	15
1.6. Ziel der Arbeit	15
<b>2. Material und Methoden</b>	
2.1. Materialgewinnung	17
2.2. Hauttest	17
2.3. In-vitro-Teste	18
2.3.1. Pharmacia CAP System RAST FEIA	19
2.3.2. DPC Biermann AlaSTAT	24
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1. Patientenkollektiv	29
3.2. Vergleich von Anamnese, CAP- und AlaSTAT-System	31
3.3. Vergleich von Hauttest, CAP- und AlaSTAT-System	32
3.4. Korrelationsanalysen von DPC und AlaSTAT	34
3.5. Vergleich von Sensitivität und Spezifität	36
3.6. Spezifisches IgG	42
3.7. Mittelwertsvergleich spezifisches IgG	44

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>62</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
RAST <sup>®</sup>	Radioallergosorbenttest
Ig	Immunglobulin
s-Ig	spezifisches Immunglobulin
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AlaSTAT <sup>®</sup>	Produktname
CAP	Carrier Polymer
IC	Intracutan

## 1. Einleitung

### 1.1. Allgemeines

Wer sich in der Sommerzeit bei schönem Wetter im Freien aufhält, weiss nur all zu gut, wie lästig vornehmlich Wespen an der Kaffeetafel oder im Biergarten sein können. Besonders in den Monaten August und September haben sie Hochkonjunktur. Und immer wieder kann man in der Tagespresse Schlagzeilen wie „Tod durch Wespenstich“ oder „Wespe killt Kind“ lesen.

Auch wenn das in den seltensten Fällen vorkommt, so handelte es sich bei den insgesamt 18194 Notarzteinsätzen des Jahres 1992 im Stadt- und Landbereich München immerhin um 59 Insektenstichnotfälle durch Hymenopterenengiftallergie [8]. Dies waren 37,8% aller notärztlich behandelten anaphylaktischen Notfälle in diesem Jahr. Auf die Gesamtbevölkerung der BRD hochgerechnet, ergeben sich daraus über 3000 anaphylaktoide Insektenstichnotfälle pro Jahr. In Europa und Nordamerika sterben mehr Menschen an Insektenstichen als durch das Gift eines Schlangenbisses. Und es ist anzunehmen, dass viele der Todesfälle, die als Hitzschlag oder Herzanfall deklariert wurden, in Wirklichkeit auf Insektenstiche zurückzuführen sind [69].

Aus der Gesundheitssurvey-Studie des Robert-Koch-Instituts geht hervor, dass bei 47% aller Frauen und 33% der Männer im Laufe ihres Lebens eine allergische Erkrankung diagnostiziert wird. Die Häufigkeit von Heuschnupfen ist in Deutschland von 1990 bis 1998 um 70% gestiegen, die von Asthma hat sich mehr als verdoppelt, wie dem Weißbuch „Allergie in Deutschland 2000“ zu entnehmen ist [58]. In einer umweltepidemiologischen Studie in Hamburg wurde festgestellt, dass 24,5% gegenüber Wespe und Biene, 14,9% gegen Wespe und 3,0% gegen Biene sensibilisiert waren [59]. Allgemein besteht eine steigende Tendenz in der Zunahme der Allergien.

Trotz dieser dramatischen Schilderungen gibt es auch einige Insekten, die von den meisten Menschen sehr geschätzt werden wie z. B. die Honigbiene. Andere erfreuen sich einer geringeren Beliebtheit wie z. B. Mücke, Floh, Wanze

und Küchenschabe. Über die Vielzahl der unterschiedlichen Daseinsformen und Lebensweisen weiß der Durchschnittsbürger wenig. Dabei nehmen die Insekten mit über 800 000 verschiedenen Spezies (etwa 80% der Arten des Tierreiches) einen hohen Stellenwert auf unserer Erde ein [44].

Zu ihnen zählen auch die Hymenopteren. Sie gliedern sich in die Familie der Apidae, zu denen Biene und Hummel zählen, der Vespidae, unter die die verschiedenen Wespenarten und Hornissen fallen, sowie der Formicoidae, Ameisen. In Abbildung 1 ist die Taxonomie der Hymenopteren (Adaptiert nach Müller [42]) grafisch dargestellt.

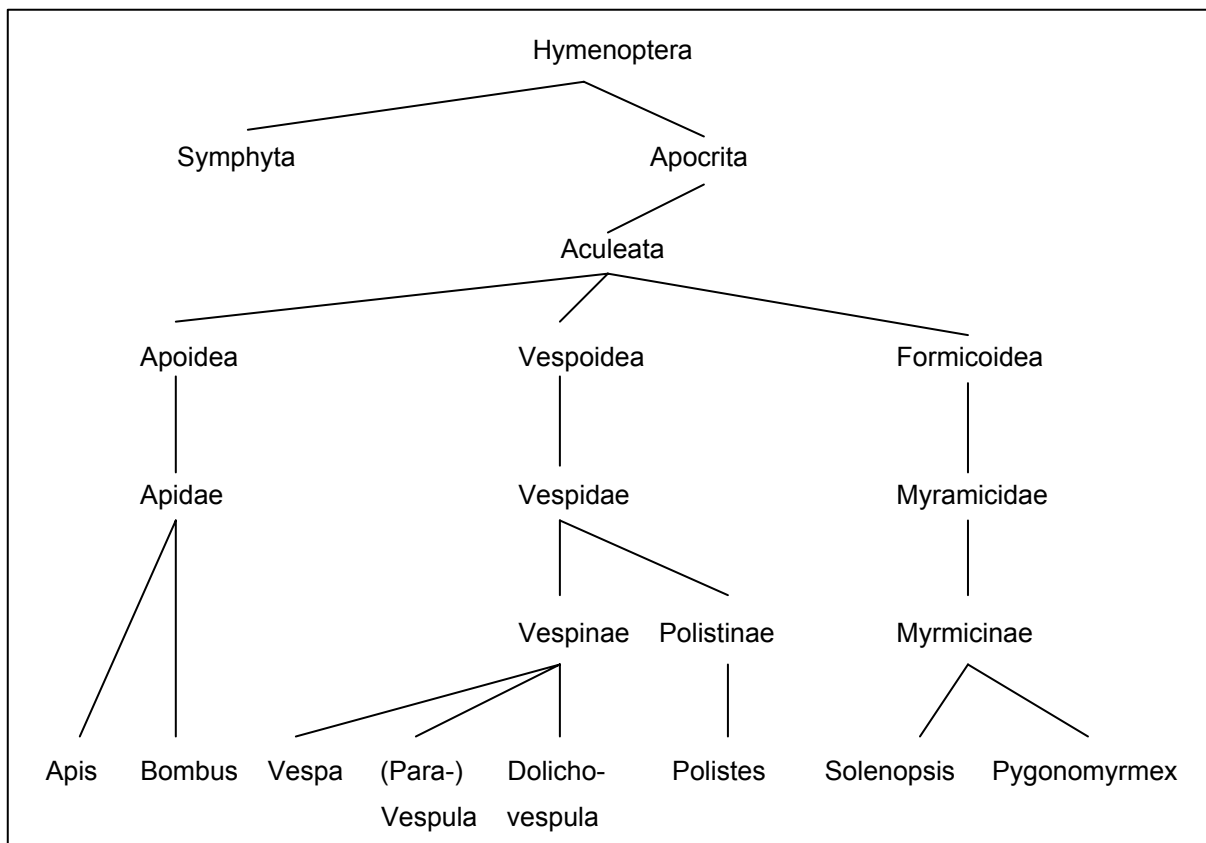


Abbildung 1: Taxonomie der Hymenopteren (Adaptiert von Müller [42])

Unter Allergie versteht man eine Überempfindlichkeitsreaktion unter Beteiligung des Immunsystems. Sie werden, je nach Verlauf, in vier Typen unterschieden, wie in Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Insektengiftallergie gehört zu den IgE vermittelten Typ-1 Reaktionen nach der Einteilung von Coombs und Gell 1963 [11]. Neben ihr zählen dazu die saisonale und ganzjährig auftretende Rhinokonjunktivitis, die Urticaria und das allergische Asthma. Ursache für das Auftreten der Beschwerden ist die Reaktion eines Antigens mit spezifischen IgE-Antikörpern. Eine derartige Reaktion wurde erstmals um 2800 v. Chr. beschrieben, bei welcher der ägyptische Pharao Menes nach einem Hymenopterenstich verstorben sein soll [44]. Husemann berichtete 1867 in der deutschen Fachliteratur als erster Wissenschaftler über dieses Phänomen [27].

Zielzellen der allergischen Reaktion bilden IgE - Antikörper, die sowohl frei zirkulierend im Blut als auch an Granulozyten und Gewebsmastzellen zu finden sind.

Die Zusammensetzung von Insektengiften ist keinesfalls gleich. Jedoch ist ihnen der Aufbau aus biogenen Aminen, basischen Peptiden und höher molekularen Eiweißen, meist Enzymen, gemeinsam (Tabelle 2 und 3).

*Tabelle 1: Einteilung der Allergien nach Coombs und Gell [11]*

Allergietyp	Reaktion
Typ I	Überempfindlichkeit vom anaphylaktischen Typ, Allergie vom Soforttyp
Typ II	Überempfindlichkeit vom zytotoxischen Typ
Typ III	Immunkomplexreaktion
Typ IV	Zellvermittelte Überempfindlichkeit, Allergie vom Spättyp

Tabelle 2: Inhaltsstoffe von Bienengift (nach Habermann [19], O'Conner [52], Shipolini [62])

Komponenten	Molekulargewicht	Anteil am Trockengewicht in %	Toxizität	Allergenaktivität
<b>Niedermolekulare Substanzen</b>	bis 1000	25	gering	keine
Pheromone		-		
Histamin	111	1	lokal	keine
Dopamin	153	<1	-	-
Noradrenalin	169	<1	-	-
Aminosäuren	100-200	1	-	-
Oligopeptide	200-1000	14	-	-
Phospholipide	100-400	5	-	-
Kohlenhydrate	180	2	-	-
<b>Größere Peptide</b>	1000-5000	60	ausgeprägt	meist keine
Melittin	2840	ca. 50	Membrangift	+
Apamin	2038	2	Neurotoxin	-
MCD-Peptid	2593	2	Histaminliberator	-
Tertiapin	ca. 2000	0,1	Histaminliberator	-
Secapin	ca. 2600	0,5	?	-
Cardiopep	?	0,7	+ chronotrop + inotrop	-
<b>Enzyme</b>	10000-20000	15	gering (außer PLA 2)	ausgeprägt
Phospholipase A2	19000	12	Membrangift	++++
Lysophospholipase	22000	1		?
Hyaluronidase	45000-50000	2	spreading-factor	+++
Saure Phosphatase	49000	<1		++
Alpha-Glukosidase	170000	<1		?
Esterasen	?	<1		?
<b>Andere</b>				
Adolpin	11092	1	Analgetisch, Block. des Arachidonsäuremetabolismus	?
Proteaseinhibitor	9000	0,8		?
Allergen C	105000	<1	?	+



Tabelle 3: Inhaltsstoffe von Wespengift (nach Edery [12], Nakajima [51])

Komponenten	Molekulargewicht	Anteil am Trockengewicht in %	Allergenaktivität
<b>Niedermolekulare Substanzen</b>	bis 1000		-
Pheromone		-	
Histamin	111	3-6	-
Serotonin	176	1	-
Azetylcholin	182	1	-
Katecholamine	150-200	< 1	-
Kohlenhydrate	180		-
Aminosäuren	100-200		-
Polyamide			-
<b>Peptide</b>	1000-5000		-
Kinine	1000-3000		-
Mastoparan	Ca. 1500		-
Chemotaktisches Peptid	Ca. 1500		-
Hämolysin	6000		+
<b>Enzyme</b>			
Phospholipase (A + B)	35000	6-14	+++
Hyaluronidase	45000	1-3	+++
Saure Phosphatase	?		+
Alkalische Phosphatase	?		+
Protease	?		++
DN-ase	?	<1	?
Cholinesterase	?		?
Histidindecaboxylase	?		?
Saccharidase	?		?
<b>Andere</b>			
Antigen 5	25000	5-10	+++
Vmac 1	97000		+
Vmac 3	39000		+

## 1.2. Wespe oder Biene?

Immer wieder zeigte sich bei der Anamneseerhebung, dass viele Patienten weder eine genaue Beschreibung geben konnten noch Kenntnisse über das Insekt hatten, welches sie gestochen hatte. Anhand nachfolgender Fotos und kurzer Beschreibungen soll der Unterschied zwischen Biene und Wespe noch einmal verdeutlicht werden.

Die bei uns in Deutschland am häufigsten vorkommende Wespenart ist die Deutsche Wespe (*Paravespula germanica*: siehe Abbildung 2).



Abbildung 2: Wespe (*Paravespula germanica*) [21]

Sie nistet meist im Boden in sehr großen Nestern mit Volksstärken bis zu 7000 Tieren. Sie hat, wie auch die Gemeine Wespe (*Paravespula vulgaris*), einen langen Lebenszyklus bis Anfang November. Diese beiden Arten können im Vergleich zu anderen lästig werden und dringen auch in Wohnungen ein. Der Unterschied im Aussehen zur Biene besteht in ihrem deutlich gelb-schwarz gestreiften Körper, der sich zum Kopf hin verjüngt. Wespen ernähren sich für gewöhnlich von Nektar und Baumsaft, weshalb sie auch von Obst und süßen Getränken besonders angelockt werden.



*Abbildung 3: Biene (Apis mellifera)[23]*

Bienen haben einen braun-schwarz beringten, glänzenden, eher pelzigen Körper (Abbildung 3). Ihre Vorliebe gilt blühenden Pflanzen, insbesondere Klee. Bienen sind in ihrem Flugverhalten im Vergleich zu Wespen ruhiger und weniger aggressiv. Da Bienen überwintern, treten sie schon im Frühsommer auf und nicht erst wie die Wespen, bei der nur die Königin überwintert, im Hochsommer und Herbst.

Auch im Stichverhalten unterscheiden sich beide Insektenarten. So können Wespen mehr als einmal stechen, Bienen hingegen verlieren beim Stich ihren Stachel. Dieser ist am Ende mit einem Widerhaken versehen und bleibt daher meist in der Wunde zurück. Diese Eigenschaften können Hinweise auf das Insekt geben, nur sollte man sich nicht allein darauf verlassen. Es kann ebenso vorkommen, dass Wespen ihren Stachel verlieren, oder bei Bienen der Stachel nicht mehr in der Wunde steckt.

### 1.3. Klinik und Epidemiologie

Auch wenn die durchschnittliche Giftmenge eines Bienenstichs nur zwischen 50 - 100 µg [25, 34] die der Wespe bei 2 - 10 µg [25] Gift liegt, so können die Folgen doch verheerend sein. Das klinische Erscheinungsbild einer Hymenopterngiftallergie (Latenzzeit 10-20 Minuten [39]) reicht von systemischer Reaktion mit Urticaria, Quincke-Ödem über Übelkeit, Erbrechen, Nausea, Diarrhoe, Atemnot und/oder Larynxödem bis hin zum anaphylaktischen Schock mit Todesfolge (siehe Tabelle 4).

Die Prävalenz der Insektengiftallergie in der Gesamtpopulation wird für schwere Lokalreaktionen mit 1,5% - 17%, für schwere Allgemeinreaktionen mit 0,35% - 5% angegeben. Dies wurde bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht, wobei diese Untersuchungen auf anamnestischen Angaben beruhen [41, 10, 14, 17, 60, 61].

*Tabelle 4: Einteilung der allergischen Reaktionen auf Hymenopterenstiche nach Müller [38] mit Modifikation [40]*

Grad 0	schwere Lokalreaktion, Schwellung an Stichstelle > 10 cm im Durchmesser
Grad 1	leichte Allgemeinreaktion, generalisierte Urticaria, Pruritus, Übelkeit, Angst
Grad 2	mäßige Allgemeinreaktion: beliebige Symptome aus Grad 1 und mindestens zwei der folgenden: Quincke-Ödem, Engegefühl im Thorax, Giemen, Bauchbeschwerden, Nausea, Erbrechen, Durchfall, Schwindelgefühl
Grad 3	schwere Allgemeinreaktionen: beliebige Symptome aus Grad 1 und 2 und mindestens zwei der folgenden: Dysphagie, Dyspnoe, Heiserkeit, verwaschene Sprache, Benommenheit, Schwächegefühl, Todesangst
Grad 4	Schockreaktionen: beliebige Symptome aus Grad 1, 2 und 3 sowie mindestens zwei der folgenden: Zyanose, Blutdruckabfall, Kollaps, Inkontinenz, Bewusstlosigkeit

Zur Diagnosestellung einer Insektengiftallergie werden heutzutage, ergänzend zur Anamnese, ein Hauttest sowie der in vitro-IgE-Nachweis (z. B. RAST usw.) hinzugezogen [43, 67]. Sie bilden die Grundlage zur weiteren Therapie, und ziehen gegebenenfalls eine Hyposensibilisierung nach sich.

#### 1.4. Hyposensibilisierung

Die Hyposensibilisierung dient heutzutage zur Therapie und Prävention weiterer systemischer Reaktionen auf Insektenstiche oder auch anderer IgE vermittelter allergischer Erkrankungen. Anamnese eines vorausgegangenen Sticheignisses, Hauttests und der Nachweis spezifischer IgE-Antikörper sind Voraussetzung für eine Hyposensibilisierung. Des Weiteren sind zusätzliche Erkrankungen, Lebensalter und Compliance des Patienten zu berücksichtigen. Dem Patienten wird das auslösende Allergen in steigenden Dosen subkutan verabreicht. Die Dauer beträgt in der Regel mindestens 3 Jahre, ist aber auch sehr von der Compliance des Patienten abhängig. Von den 202 Patienten, die mit einem oder beiden ELISA-Test Systemen positiv getestet wurden, begannen 140 eine Hyposensibilisierung.



Abbildung 4: Wespenstachel [22]

Diese wird in der Regel nach einem Schema begonnen, so wie es in Tabelle 5 dargestellt ist. Anschließend wird mit 100 µg/ml so lange fortgeführt, bis die Hyposensibilisierung abgeschlossen ist. Bei jeder Injektion wird die Uhrzeit notiert und vermerkt, ob es zu Allgemeinreaktionen wie Erythem oder Urticaria gekommen ist. Das Protokoll wird der Krankenakte beigelegt.

Während oder am Ende einer Hyposensibilisierung kann eine Stichprovokation mit einem lebenden Insekt erfolgen. Der Zeitabstand der zwischen Beginn der Hyposensibilisierung und der Stichprovokation liegt sollte jedoch mindestens 6 Monate betragen. Die Biene bzw. Wespe befindet sich in einem kleinem Kästchen welches dem Patienten direkt auf die Haut gesetzt wird. Der Patient wird währenddessen in Intubationsbereitschaft von einem Anästhesisten überwacht.

Eine Hyposensibilisierung ist nach wie vor nur unter größten Sicherheitsbedingungen durchzuführen, vor allem der Lebendstich. Ein Notfallset ist auch nach einer Hyposensibilisierung von jedem Allergiker mit sich zu führen.

*Tabelle 5: Dosierungsschema für die Schnell-Hyposensibilisierung*

Tag	Konzentration µg/ml	Menge ml	Dosis µg
1	0,01	0,1	0,001
	0,1	0,1	0,01
2	1,0	0,1	0,1
	1,0	0,4	0,4
	1,0	0,7	0,7
3	10,0	0,1	1,0
	10,0	0,4	4,0
	10,0	0,7	7,0
4	100,0	0,1	10,0
	100,0	0,4	40,0
	100,0	0,7	70,0
5	100,0	1,0	100,0

## 1.5. Derzeitiger Stand und Probleme der in vitro Diagnostik

Der von Wide et al. [62] entwickelte Radioallergosorbenttest (RAST) gehört heute zu den Standardverfahren in der Allergiediagnostik. Seit seiner Einführung wurde der RAST durch technische Modifikation kontinuierlich weiterentwickelt, darüber hinaus erschienen zahlreiche Publikationen über diese Art der Diagnostik.

Problematisiert wurden in diesen Dokumentationen unter anderem auch Fehlerquellen in der Allergiediagnostik und der Vergleich mit dem Hauttest.

Im Rahmen dieser Fehlerquellen wurden immer wieder falsch-positive, bzw. falsch-negative RAST beschrieben. Unter dieser zu hohen Sensitivität leidet die Spezifität. Als Ursachen kommen z.B. Kreuzreaktionen oder hohe Gesamt-IgE-Werte für falsch-positive RAST in Frage. Durch fehlendes Patientenrisiko gegenüber dem Hauttest und auf Grund seiner einfachen Handhabung war der RAST eines der beliebtesten Standardmessverfahren in der Allergiediagnostik. Mittlerweile wird er jedoch nicht mehr für die Routinediagnostik angewendet. Ein Hauptgrund warum an weiteren Testverfahren geforscht wurde, war die Radioaktivität, die für diejenigen die mit ihm umzugehen hatten, immer ein erhöhtes Risiko darstellten. Er wurde durch modernere Verfahren, wie dem RAST FEIA abgelöst.

## 1.6. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit werden die Immunoassays CAP RAST FEIA der Firma Pharmacia und AlaSTAT von DPC Biermann miteinander verglichen. Dazu sollen insbesondere die Unterschiede in Bezug auf Sensitivität wie auch Spezifität des spezifischen IgE und IgG gegen Bienen- und Wespengift herausgearbeitet werden.

Die Testsysteme unterscheiden sich durch ihren Aufbau und Handhabung. So ist das Phamacia CAP System ein Festphase Test, das DPC AlaSTAT System hingegen ein Flüssigphase Test.

Es gilt herauszufinden, welcher Standard für die Diagnostik sowohl in der Klinik als auch in der Praxis am geeignetsten ist und in Bezug auf Sensitivität und Spezifität die präzisesten Ergebnisse liefert.



## **2. Material und Methoden**

### 2.1. Materialgewinnung

Die untersuchten und für diese Arbeit verwendeten Proben stammen aus dem fortlaufenden Serumeingang im Routinelabor der Allergieabteilung der Dermatologischen Klinik am Biederstein der Technischen Universität München, wo auch jeweils der Hauttest durchgeführt wurde.

Für die in-vitro-Testung wurde den Patienten nach dem Aufnahmegespräch Blut entnommen. Dabei kam es immer wieder vor, dass Patienten nicht genau wussten wie das Insekt aussah, von dem sie gestochen wurden. Zur Verifizierung in der Anamnese kann es hilfreich sein, nach Jahreszeit und Verbleib des Stachels in der Einstichstelle zu fragen.

Durch Zentrifugation ( 10 Min., 4000 U/min, 4°C ) konnte das Serum gewonnen werden, welches dann Portionsweise zu 150 µl bei - 20° C eingefroren wurde. Das Serum wurde anschließend mit den zu untersuchenden Systemen CAP von Pharmacia und AlaSTAT von Biermann auf spezifische IgE-Antikörper für Bienen- und Wespengift getestet. Jede Analyse wurde mindestens zweimal bestimmt, entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.2. Hauttest

Der Hauttest ist neben der Anamnese eine der häufigsten routinemäßig eingesetzten diagnostischen Maßnahmen bei Insektenstichallergien. Er dient zum Nachweis einer Allergie durch Auslösung einer lokalen urtikariellen Reaktion mit Juckreiz, Erythem und Quaddelbildung. Die Durchführung sollte nicht unmittelbar nach dem Sticheignis erfolgen, sondern erst einige Wochen später, da die Fähigkeit der Hautmastzellen auf eine erneute Exposition zu reagieren, erschöpft sein kann. Hinzu kommt, dass die Hauttestempfindlichkeit um so mehr abnimmt, je weiter das letzte Sticheignis zurückliegt [18, 63]. Um

falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, werden 4 bis 6 Wochen Abstand zum Stichereignis empfohlen.

Die durchgeführten Hauttestungen fanden ausschließlich in der Allergie-Ambulanz der Klinik am Biederstein statt.

Es wird zwischen dem mit reinem Insektengift [6, 20, 36] Pricktest und dem 10 bis 100 mal empfindlicheren Intracutantest [26] unterschieden. Letzterer wird in Verdünnungsstufen (Zehnerpotenzen) durchgeführt und fand bei dieser Studie Anwendung. Zur Anwendung kamen Alk-Reless von Scherax, und Venomil von Bencard. Die Verdünnungsreihe lautete wie folgt:

0,0001 µg/ml, 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1µg/ml.

Als Positivkontrolle diente eine 0,01% Histaminlösung. Hierfür wurde das Produkt der Firma Allergopharma verwendet.

Nach Auftragen der Prick- bzw IC-Lösung und einer Inkubationszeit von 15 Minuten erfolgte das Ablesen des Ergebnisses. Eine Quaddel über 4 mm mit umgebendem Erythem von mehr als 10 mm gilt als positives Testergebnis.

### 2.3. In-vitro-Teste

Der erste Nachweis spezifischer IgE-Antikörper bei Insektengiftallergie gelang Reisman et al. durch den von Wide entwickelten Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) [57, 67]. Seitdem gilt der RAST als Goldstandard bei Routineuntersuchungen zum Nachweis insektengiftspezifischer IgE-Antikörper [15, 24, 32].

Allgemein gilt in der Allergiediagnostik, dass in-vitro-Tests zum Nachweis insektengiftspezifischer Antikörper möglichst erst 2 bis 3 Wochen nach dem Stichereignis, jedoch nicht später als 6 Monate durchgeführt werden sollten [28], da in diesem Zeitraum die höchste Serumkonzentration insektengiftspezifischer IgE-Antikörper vorliegt.

Die in dieser Arbeit miteinander zu vergleichenden Systeme sind einmal ein Festphase- (Pharmacia CAP) und ein Flüssigphase- (DPC Biermann AlaSTAT) Test. Der Unterschied besteht in Ihrem Aufbau und ihrer Handhabung. So ist beim Festphase-Test das spezifische Allergen an ein Cellulose CArrier Polymer

(CAP) gebunden. Beim Flüssigphase-Test findet die Reaktion wie der Name schon sagt in einem flüssigen Medium statt. Ziel und Prinzip beider Test ist es, die Bindung von Patientenblut-IgE an das Allergen nachzuweisen.

### 2.3.1. Pharmacia CAP System RAST® FEIA

Das CAP RAST FEIA System ist ein in vitro-Test, bei dem das spezifische Allergen an ein Cellulose Carrier Polymer (CAP) gebunden ist (Festphase) [45, 56]. Es kann zur Bestimmung zirkulierender IgE-Antikörper herangezogen werden. Das zu untersuchende Allergen, das an das ImmunoCAP gebunden ist, reagiert mit dem spezifischen IgE des Patientenserums für 30 Minuten => Ag-Ak-Komplex. Durch Waschen werden alle unspezifischen freien IgE-Ak entfernt. Anschließend werden Enzym-markierte sekundäre Antikörper gegen IgE hinzugegeben. Nach einer zweieinhalbstündigen Inkubation wird überschüssiges ungebundenes Enzym-Anti-IgE herausgewaschen und Entwickler-Reagenz (Fluoreszenz) für 10 Minuten hinzugegeben. Nach nochmaliger Inkubation wird mittels einer Stopplösung, nach Erreichen des Entwicklungshöhepunktes, die Reaktion abgestoppt und gemessen. Je höher der Fluoreszenz-Wert ist, desto mehr spezifisches IgE ist in der Probe vorhanden. Zur Auswertung des Testergebnisses wird die Fluoreszenz der Patientenprobe parallel zu einer Standardkurve gemessen und danach berechnet.

Das Prinzip der Messmethoden ist bei der Bestimmung von s-IgE und s-IgG gleich. Zu beachten ist lediglich, dass das s-IgG vor der Testung ( 1:100 ) verdünnt werden muss.

In der Packung sind die Reagenzien zur Durchführung des Testes wie in Tabelle 6 abgebildet enthalten.

*Tabelle 6: Materialien s-IgE CAP-System*

<b>Fluoroimmuno-Reagenzien für 384 Bestimmungen</b>
Enzym-Anti-IgE, $\beta$ -Galactosidase (Antiserum von Kaninchen)
Entwickler-Lösung 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosidase
Stop-Lösung (Natriumcarbonat)
<b>Standard-Reagenzien für 6 HP Standard-Kurven</b>
Anti-IgE ImmunoCAP (Antiserum von Schafen)
IgE Standards, Konzentrationen: 0,35; 0,7; 3,5; 17,5; 50 und 100 kU/l
Allergene Immuno CAP $i_1$ (Biene), $i_3$ (Wespe)
Kontrollen
Waschlösung
<b>Kalibrierung</b>
Die IgE-Standards sind gegen das 2. Int. Referenzpräparat 75/502 von menschlichem Serum-Immunglobulin E der WHO kalibriert.

Die Durchführung richtete sich streng nach Angaben des Herstellers.  
Die Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

<u>Abfolge</u>	<u>Durchführung</u>	<u>Menge</u>
1. Schritt	Verteilen der Anti-IgE-Immuno CAP's für Standard und Allergen auf Mikrotiterplatte 96 Well Flachboden	
	↓	
	10 min bei RT waschen	
2. Schritt	Pipettieren von Kontrolle/Standard/Probe	50 µl
3. Schritt	Transferieren von CAP's in die vorgelegte Probe	
	↓	
	30 min bei RT inkubieren	
	10 min bei RT waschen	
4. Schritt	Konjugat	50 µl
	↓	
	2,5 h bei RT inkubieren	
	10 min bei RT waschen	
5. Schritt	Entwickler	50 µl
	↓	
	10 min bei RT inkubieren	
6. Schritt	Pipettieren der Stoplösung	400 µl
	↓	
	2 min	
7. Schritt	Fluorometrische Messung	

Abbildung 5: Testablauf s-IgE Pharmacia CAP System

Auswertung:

*Tabelle 7: Konzentrationsgrenzen bei CAP IgE*

RAST - Klassen	U/ml	Spiegel der Allerg.-spez. IgE AK
0	< 0,35	nicht vorhanden/nicht nachweisbar
1	0,35 - 0,7	niedrig
2	0,7 - 3,5	mittel
3	3,5 - 17,5	hoch
4	17,5 - 50	sehr hoch
5	50 - 100	sehr hoch
6	> 100	sehr hoch

Die Materialien für die s-IgG Bestimmung sind in Tabelle 8 aufgezählt.

*Tabelle 8: Materialien s-IgG CAP-System*

<b>Fluoroimmuno-Reagenzien für 96 Bestimmungen</b>
Enzym-Anti-IgG, $\beta$ -Galactosidase (monoklonal, Antikörper von der Maus)
Entwickler-Lösung 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosidase
Stop-Lösung (Natriumcarbonat)
Probenverdünner (Hühnerserum in Pufferlösung)
<b>Kalibratoren für 1 Kurve</b>
IgG Kalibrator Konzentration: 0,02; 0,04; 0,1; 0,3; 1,0 und 2,0 mg/l
<b>Kalibratoren ImmunoCAP</b>
IgA/IgG Kalibrator ImmunoCAP (monoklonaler Antikörper von der Maus)
Allergen Immuno CAP $i_1$ G (Biene), $i_3$ G(Wespe)
Waschlösung
<b>Kalibrierung</b>
Die IgG Kalibratoren sind indirekt (durch eine unterbrochene Kette von Kalibratoren) gegen die internationale Referenzpräparation (IRP) 67/86 für Humanserumimmunglobuline A, G und M kalibriert.

<u>Abfolge</u>	<u>Durchführung</u>	<u>Menge</u>
1. Schritt	Verdünnung der Serumprobe 1:100 mit Probenverdünner	
2. Schritt	Verteilen der Anti-IgE-Immuno CAP's für Standard und Allergen auf Mikrotiterplatte 96 Well Flachboden	
	↓ 10 min bei RT waschen	
3. Schritt	Pipettieren von Kontrolle/Standard/Probe mit Diluent 1:100 verdünnt	50 µl
4. Schritt	Transferieren von CAP's in die vorgelegte Probe	
	↓ 30 min bei RT inkubieren	
	↓ 10 min bei RT waschen	
5. Schritt	Konjugat	50 µl
	↓ 2,5 h bei RT inkubieren	
	↓ 10 min bei RT waschen	
6. Schritt	Entwickler	50 µl
	↓ 10 min bei RT inkubieren	
7. Schritt	Pipettieren der Stoplösung	400 µl
	↓ 2 min	
8. Schritt	Fluorometrische Messung	

Abbildung 6: Testablauf s-IgG Pharmacia CAP System

### 2.3.2. DPC Biermann AlaSTAT

Dieser Test ist im Gegensatz zum CAP RAST FEIA ein Flüssigphase-Test, beim dem die Reaktion zwischen Allergenen und spezifischem IgE-/IgG-Antikörper in der flüssigen Phase stattfindet. Die Allergene sind an ein Ligand-markiertes, lösliches Polymer gebunden, als Ligand dient hier Biotin. Die Unterschiede bei der Testdurchführung von s-IgE und s-IgG liegen bei diesem System lediglich in den Inkubationszeiten und der für s-IgG notwendigen Vorverdünnung 1:100. Ansonsten ist der Versuchsablauf (siehe Abbildung 7 und 8) bei s-IgE und s-IgG fast identisch zum CAP-System. Die Bestandteile einer Testpackung sind in Tabelle 9 für s-IgE und Tabelle 11 für s-IgG wiedergegeben.

*Tabelle 9: Materialien s-IgE AlaSTAT-System*

Teilbare Mikrotiterplatte, ligandbeschichtet, bestehend aus 12 Streifen à 8 Bestimmungen
Ligand-markierter Anti-IgE-AK, (polyklonal, Ziege)
Enzym-markierter Anti-IgE-AK, (monoklonal, Maus), Meerrettichperoxidase gekoppelt
Anti-Ligand, Bindungsvermittler zwischen Ligand-beschichteter Festphase und Ligand-gekoppelten Allergenen
TMB-Substratlösung (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in gepufferter Peroxidlösung)
Gepufferte Waschlösung
IgE Referenz-Modul für 10 Standardreihen in Doppelbestimmung, A-F in den Konz.: 0,35; 0,7; 3,5; 17,5; 52,5; und 100 kU/l
Kontrollen



Die Durchführung erfolgte streng nach Angaben des Herstellers.

Neben der Probenbestimmung wurden eine Standardreihe und eine Kontrolle durchgeführt.

<u>Abfolge</u>	<u>Durchführung</u>	<u>Menge</u>
1. Schritt	Pipettieren von Kontrolle/Standard/Probe	50 µl
2. Schritt	Ligandenmarkiertes Anti-IgE für Standard Ligandenmarkiertes Allergen für Kontrolle/Probe	50 µl 50 µl
	↓	
	1 h bei RT schütteln	
3. Schritt	Antiligand	50 µl
	↓	
	1 h bei RT schütteln Dekantieren 4 x mit Waschpuffer waschen	
4. Schritt	Enzymkonjugat	200 µl
	↓	
	1 h bei RT schütteln Dekantieren 4 x mit Waschpuffer waschen	
5. Schritt	TMB Substrat	200 µl
	↓	
	sofort kinetisch bei $\lambda = 650 \text{ nm}$ messen	

Abbildung 7: Testablauf s-IgE DPC Biermann AlaSTAT

Auswertung:

*Tabelle 10: Konzentrationsgrenzen bei AlaSTAT IgE*

Klassen	kU/l	Interpretation
0	< 0,35	neg. für das betreffende Allerg.
1	0,35 - 0,69	fraglich
2	0,70 - 3,49	positiv
3	3,50 - 17,49	stark positiv
4	17,5 - 52,49	stark positiv
5	52,5 - 99,99	stark positiv
6	> 100	stark positiv

*Tabelle 11: Materialien s-IgG AlaSTAT-System*

Teilbare Mikrotiterplatte, ligandbeschichtet, bestehend aus 12 Streifen à 8 Bestimmungen
Ligand-markierter Anti-IgG-AK, (polyklonal, Ziege)
Enzym-markierter Anti-IgG-AK, (monoklonal, Maus), Meerrettichperoxidase gekoppelt
Anti-Ligand, Bindungsvermittler zwischen Ligand-beschichteter Festphase und Ligand-gekoppelten Allergenen
Probendiluent, Gepufferte Proteinlösung
TMB-Substratlösung (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in gepufferter Peroxidlösung)
Gepufferte Waschlösung
s-IgG Referenz-Modul für 10 Standardreihen, A-G in den Konz.: 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 und 2,0 mg/l

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Neben der Probenbestimmung wurden eine Standardreihe und eine Kontrolle durchgeführt.

<u>Abfolge</u>	<u>Durchführung</u>	<u>Menge</u>
1. Schritt	Pipettieren von Kontrolle/Standard/Probe mit Diluent 1:100 verdünnt	25 µl
2. Schritt	Ligandenmarkiertes Anti-IgE für Standard Ligandenmarkiertes Allergen für Kontrolle/Probe	50 µl 50 µl
	↓	
3. Schritt	Antiligand	50 µl
	↓	
4. Schritt	Enzymkonjugat	200 µl
	↓	
5. Schritt	TMB Substrat	200 µl
	↓	
	sofort kinetisch bei $\lambda = 650 \text{ nm}$ messen	

Abbildung 8: Testablauf s-IgG DPC Biermann AlaSTAT

Auswertung:

Werte von  $< 25$  mg/l bedeuten, dass kein spezifischer IgG-Titer nachweisbar ist. Bei einem Ergebnis von  $> 25$  mg/l ist ein spezifischer IgG-Titer nachweisbar.

Nicht nur die präzise Durchführung der Tests entsprechend den Angaben des Herstellers ist für eine aussagekräftige Interpretation wichtig, sondern auch das Alter der Reagenzien, die Anzahl der durchgeführten Replikate und die Angaben der RAST-Werte (% Totalaktivität, % Normalserum, % Standardserum,  $\mu\text{g/ml}$ ).

Weiterhin spielen patientenabhängige Faktoren eine Rolle. Zu diesen zählen Titer blockierende Antikörper, Gesamt-IgE-Titer, das Alter der Patienten, der Zeitpunkt der Blutentnahme und nicht zuletzt andere Krankheiten wie z. B. die Urticaria pigmentosa.

### **3. Ergebnisse**

#### 3.1. Patientenkollektiv

Die Datensammlung bezieht sich auf ein Patientenkollektiv aus den Jahren 1997 und 1998. Das Probandenkollektiv bestand aus 252 Patienten im Alter von 1 bis 81 Jahren mit einem Verdacht auf eine Bienen- oder Wespengiftallergie. 60,5% waren Frauen, 39,5% Männer. Das Durchschnittsalter der Männer betrug 40,2 Jahre, das der Frauen 44,1 Jahre (Tabelle 12). Stichtag für die Altersberechnung ist der 18.11.1998.

Dabei wurde das Untersuchungsmaterial sowohl mit dem CAP System der Firma Pharmacia als auch mit dem AlaSTAT System der Firma DPC Bierman untersucht.

47 Patienten, bei denen keine Bienen- bzw. Wespengiftallergie bekannt war, wurden nach dem gleichen Schema untersucht (Tabelle 13). Das Durchschnittsalter der Männer betrug 41,3 Jahre, das der Frauen 41,4 Jahre.

*Tabelle 12: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Verdacht auf Bienen- oder Wespengiftallergie*

Alter	Frauen	Männer	Total
bis 19 Jahre	10	16	26
20 – 29 Jahre	19	13	32
30 – 39 Jahre	28	17	45
40 – 49 Jahre	29	20	49
50 – 59 Jahre	42	12	54
60 – 69 Jahre	14	17	31
ab 70 Jahre	11	4	15
Total	153	99	252

Laut Anamnese bestand bei 44 Patienten Verdacht auf eine Bienengiftallergie, bei 82 Patienten auf eine Wespengiftallergie. Darunter waren 5 Patienten, die sowohl eine Bienen- als auch eine Wespengiftallergie hatten. 42 Patienten konnten das Insekt, welches sie gestochen hatte, nicht identifizieren von denen 2 bereits systemische Reaktionen auf Wespenstiche hatten.

Die Symptomatik nach dem Insektenstich wurde anhand des Schweregrades der anaphylaktischen Reaktion nach den Müller-Stadien [38] klassifiziert (Tabelle 4).

Die Einteilung von den 44 Patienten, bei denen es sich um eine systemische Reaktion auf Bienenstiche handelte, erfolgte entsprechend der Müller-Klassifikation (Tabelle 4) so wie in Tabelle 10 dargestellt:

Die Einteilung nach Müller (Tabelle 4) bei den 81 Patienten mit einer systemischen Reaktion auf Wespen ist in Tabelle 10 wiedergegeben.

Werden Reaktionsgrad auf einen Insektenstich mit systemischer Reaktion und die Mittelwerte der Einzelergebnisse von den Patienten die darüberangaben machen konnten und das Insekt identifizierten, so ist in Tabelle 14 und 15 zu sehen, dass kein Zusammenhang diesbezüglich besteht.

### 3.2. Vergleich von Anamnese, CAP- und AlaSTAT-System

Von den Patienten, bei denen auf Grund der Anamneseerhebung eine systemische Reaktion auf Biene oder Wespe vorgelegen hat, werden in der Tabelle 16 die Ergebnisse der beiden Systeme gegenüber gestellt.

Es zeigt sich, dass beim CAP-System ein besserer Zusammenhang zwischen einer systemischen Reaktion und einem positiven Testergebnis besteht. Dies trifft für die Biene als auch für die Wespe zu. Wie der Tabelle 16 und der Abbildung 9 zu entnehmen ist

*Tabelle 13: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten ohne Verdacht auf Bienen- oder Wespengiftallergie*

Alter	Frauen	Männer	Total
bis 19 Jahre	3	2	5
20 – 29 Jahre	9	2	11
30 – 39 Jahre	2	3	5
40 – 49 Jahre	7	0	7
50 – 59 Jahre	6	6	12
60 – 69 Jahre	3	2	5
ab 70 Jahre	2	0	2
Total	32	15	47

*Tab. 14: Zuordnung Patienten – Reaktionsgrad bei systemischer Reaktion auf Bienen*

Reaktionsgrad	Patienten	Mittelwerte s-IgE CAP (U/ml)	Mittelwerte s-IgE AlaSTAT (kU/l)
1	3	5,45	1,55
2	30	9,71	3,0
3	8	4,75	0,93
4	1	1,89	0,35
nicht zuzuordnen / angegeben	2	0,89	0,35

*Tab. 15: Zuordnung Patienten – Reaktionsgrad bei systemischer Reaktion auf Wespen*

Reaktionsgrad	Patienten	Mittelwerte s-IgE CAP (U/ml)	Mittelwerte s-IgE AlaSTAT (kU/l)
1	9	7,60	0,81
2	47	6,50	0,56
3	21	5,08	0,39
4	2	1,79	0,35
nicht zuzuordnen / angegeben	2	44,0	1,71

Tabelle 16: CAP und AlaSTAT bei Anamnese mit pos. systemischer Reaktion

		Biene	Wespe
Anamnese mit positiver systemischer Reaktion			
CAP	positiv	40	69
	negativ	4	12
AlaSTAT	positiv	20	61
	negativ	24	20

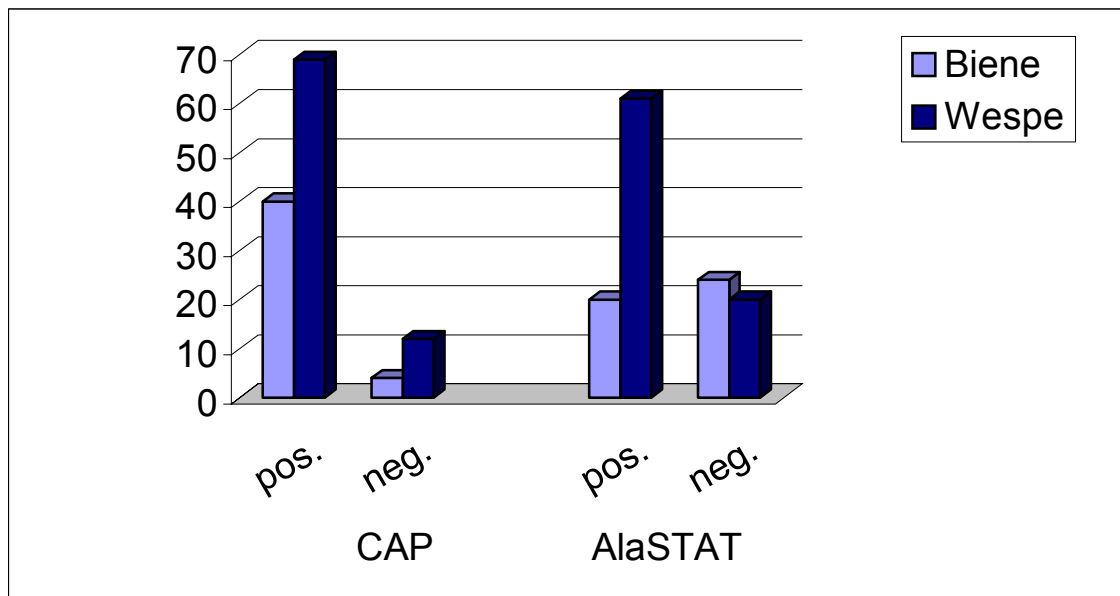


Abbildung 9: Positive und negative Hauttestreaktionen, gegenüber CAP und AlaSTAT bei Biene und Wespe

### 3.3. Vergleich von Hauttest, CAP- und AlaSTAT-System

Von insgesamt 252 Patienten wurde bei 138 ein Hauttest auf Biene und Wespe durchgeführt. Von den 47 Probanden der Kontrollgruppe ohne Verdacht auf Biene/Wespe-Allergie nahmen alle an einer Hauttestung teil. In Tabelle 17 und Abbildung 10 werden dargestellt, in welchem Verhältnis die drei Systeme in Bezug auf positive und negative Reaktionen stehen.

Eine positive Übereinstimmung von Hauttest, DPC und AlaSTAT zeigt sich bei 40 Bienengiftallergikern, bei den Wespengiftallergikern sind es 70 Patienten.



Tabelle 17: Verhältnis von Hauttest und Immunoassays in Bezug auf pos. und neg. Reaktion

Hauttest	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.
Pharmacia CAP System	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.
DPC AlaSTAT System	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.
Allergen								
Biene	40	43	3	21	4	0	26	1
Wespe	70	23	10	16	9	3	4	3

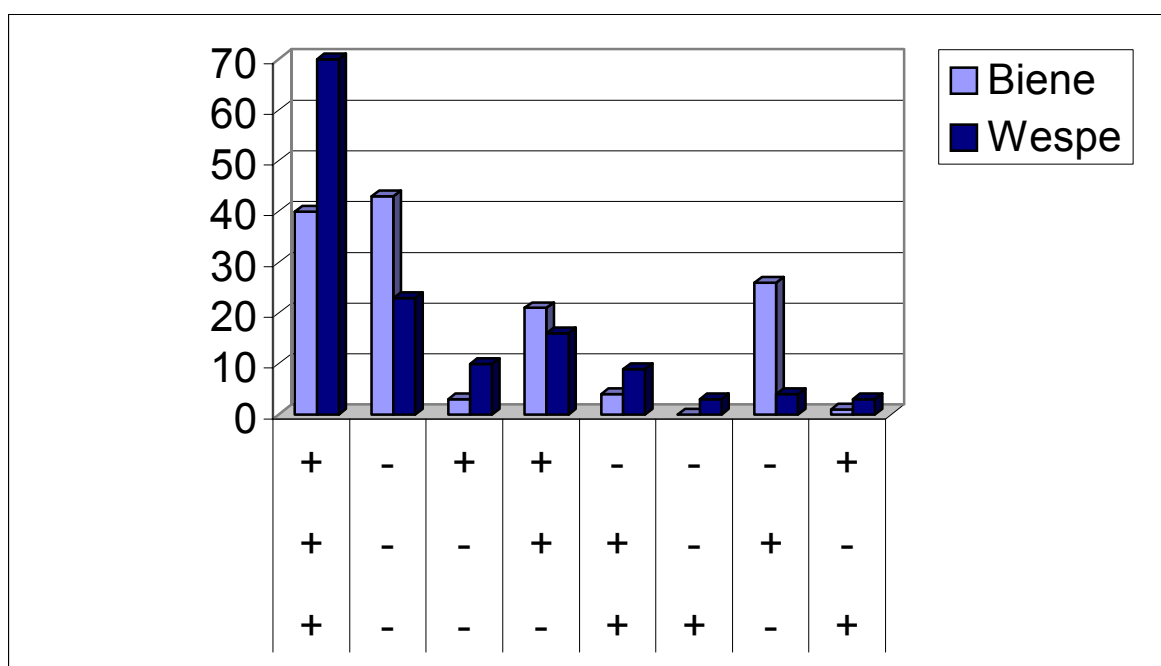


Abbildung 10: Darstellung des Zusammenhangs von Hauttest und Immunoassays in Bezug auf pos. und neg. Reaktion

### 3.4. Korrelationsanalysen von DPC und AlaSTAT

In den Abbildungen 11 bis 14, werden die Systeme DPC und AlaSTAT in Bezug auf IgE und IgG miteinander verglichen.

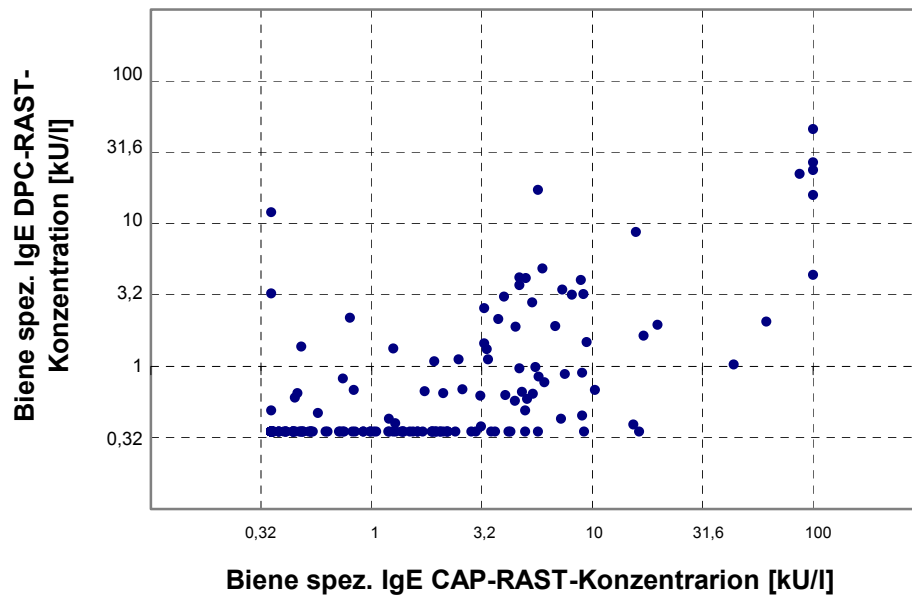


Abb. 11: Bestimmung von spezifischem IgE gegen Biene (NWG=0,35,  $r=0,71^{**}$ ,  $n=292$ )

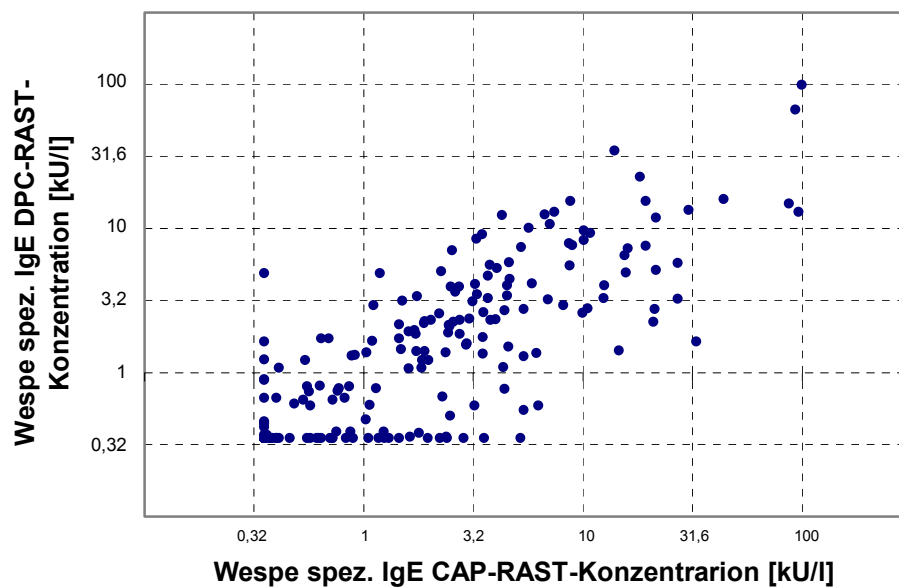


Abb. 12: Bestimmung von spezifischem IgE gegen Wespe (NWG=0,35,  $r=85^{**}$ ,  $n=290$ )

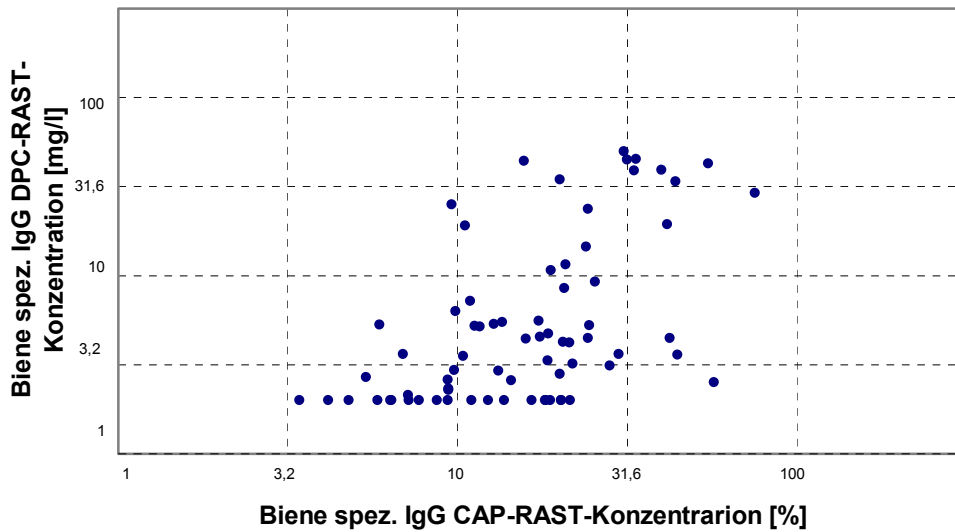


Abb. 12: Bestimmung von spezifischem IgG gegen Biene (NWG=2,0,  $r=0,54^{**}$ ,  $n=72$ )

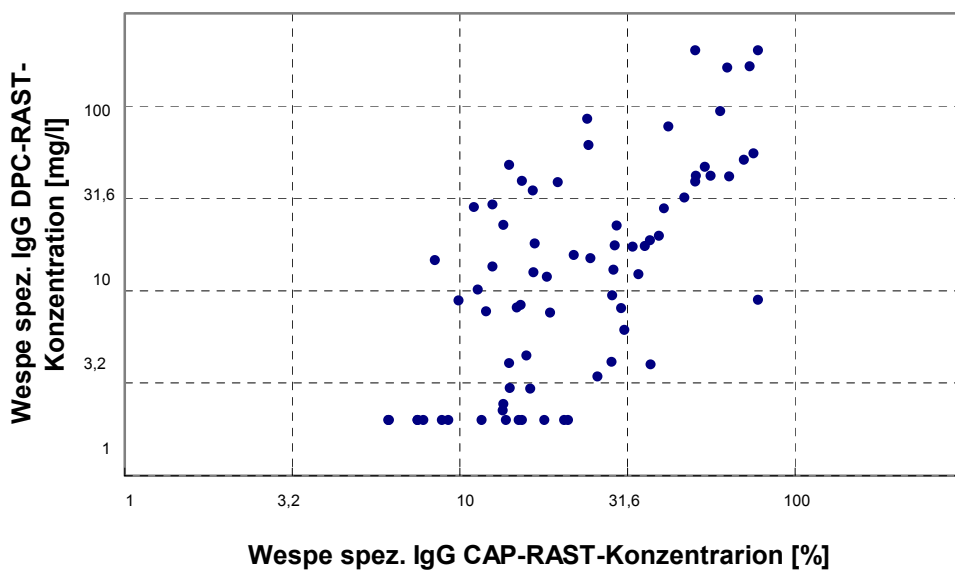


Abb. 14: Bestimmung von spezifischem IgG gegen Wespe (NWG=2,0,  $r=0,67^{**}$ ,  $n=72$ )

Deutlich zu sehen ist, dass der Korrelationskoeffizient für spezifische IgE Konzentrationen gegen Wespengift mit  $r=0,85$  am höchsten liegt; der entsprechende Korrelationskoeffizient für die IgG Konzentration liegt bei  $r=0,67$ . Die Korrelation der spezifischen IgE Konzentration gegen Biene ist mit  $r=0,71$  und beim IgG mit  $r=0,54$  deutlich niedriger.

### 3.5. Vergleich von Sensitivität und Spezifität

Gibt die Sensitivität den Prozentsatz Kranker an, die durch den Test als krank klassifiziert wurden, so drückt die Spezifität den Prozentsatz Nicht-Erkrankter mit negativem Test aus, d.h. die durch den Test folgerichtig als nicht erkrankt klassifiziert wurden.

Als Goldstandard gilt das Ergebnis des Hauttestes. Die Ergebnisse der beiden Testverfahren CAP und AlaSTAT werden in Rastklassen eingeteilt. Die Konzentrationsgrenzen der einzelnen Rastklassen sind in Tabelle 7 und 10 angegeben.

Ein Ergebnis könnte als positiv bewertet werden, wenn die Werte oberhalb der ersten, zweiten,...oder sechsten Rastklasse liegen. Die ROC-Diagramme (Reciever Operating Characteristic) 15 und 16 dienen der Feststellung, für welchen dieser Cutpoints die Übereinstimmung mit dem Hauttest am höchsten ist. Auf der x-Achse werden die Werte 1-Spezifität aufgetragen, auf der y-Achse die Sensitivität. So kann ein grafisch aufsteigender Verlauf von Spezifität und Sensitivität dargestellt werden. Als Cutpoint wird der Wert gewählt, der den maximalen Abstand zur Winkelhalbierenden aufweist. Dieser Grenzwert unterscheidet am besten Erkrankte von Nicht-Erkrankten.

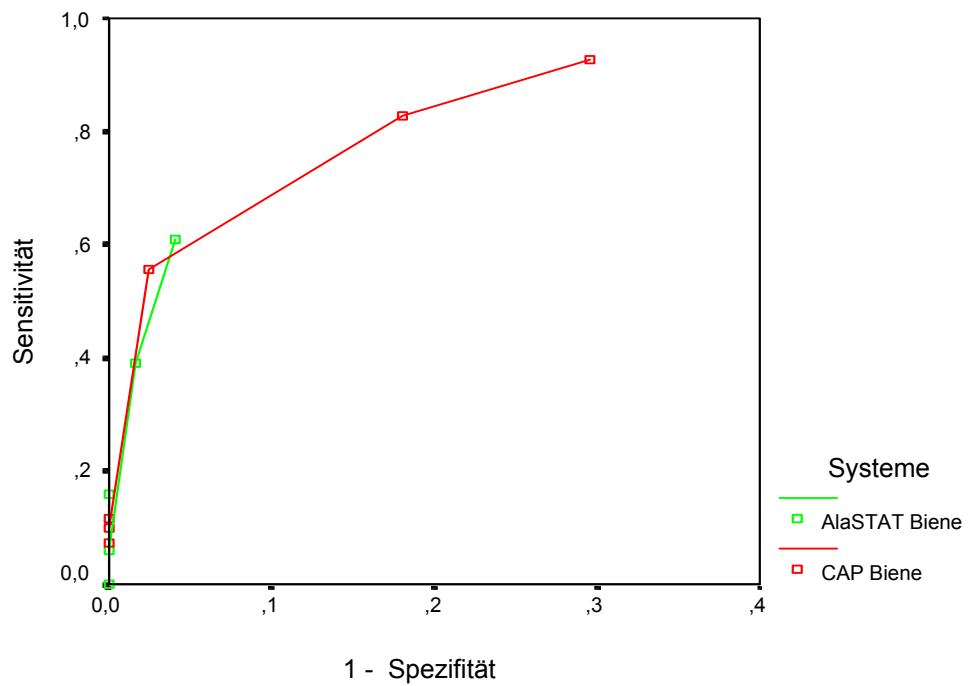


Abbildung 15: ROC-Diagramm zur Darstellung von Spezifität und Sensitivität der beiden Systeme CAP und AlaSTAT bei der Biene

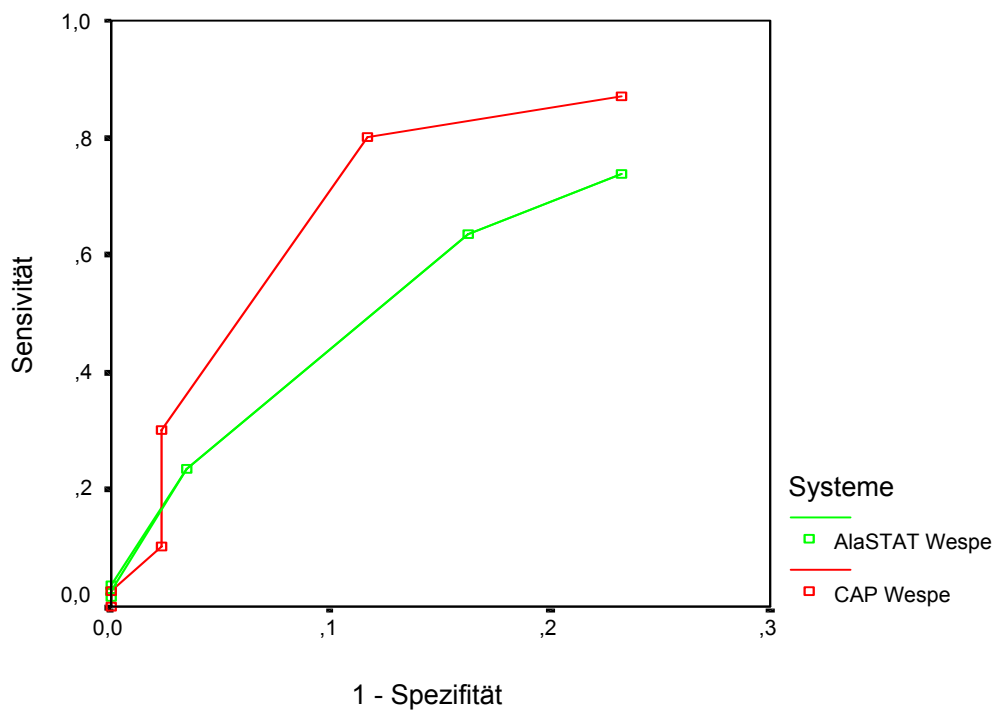


Abbildung 16: ROC-Diagramm zur Darstellung von Spezifität und Sensitivität der beiden Systeme CAP und AlaSTAT bei der Wespe

Danach ergibt sich, dass beim AlaSTAT-System die beste Übereinstimmung mit dem Hauttest dann gegeben ist, wenn Werte bereits oberhalb der Rastklasse 1 als positiv gewertet werden. Beim CAP-System ist ein Cutpoint bei der Rastklasse 2 geringfügig aussagekräftiger. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde für die nachfolgenden Berechnungen der Arbeit auch hier die Rastklasse 1 als Grundlage gewählt. Die Aussage der ROC Diagramme wird auch anhand des Youden-Indexes (Summe aus Spezifität und Sensitivität) deutlich (Tabelle 18). Dieser gibt ein zusammengefasstes Maß für die Testgüte. Je mehr sich der Wert des Youden-Index (Y) an 2 nähert, desto genauer misst der Test. Das zeigt, dass beim CAP-System das beste Ergebnis ab Rastklasse 2 zu erwarten ist (Y=1.65 bzw. Y=1.68), beim AlaSTAT jedoch schon die Rastklasse 1 als genauestes Bewertungskriterium gilt (Y=1.57 bzw. Y=1.51). Die Tabellen 19 bis 22 zeigen die Übereinstimmungen zwischen Hauttest und spezifischen IgE Bestimmungen für die ausgewählten Cutpoints ausführlicher. In den Tabellen 23 und 24 werden Spezifität und Sensitivität der beiden Systeme CAP und AlaSTAT für den ausgewählten Cutpoint gegenübergestellt.

*Tabelle 18: Youden-Index*

Allergietest	Biene/Wespe	Rastklasse	Youden-Index
CAP	Biene	2	1,65
CAP	Wespe	2	1,68
CAP	Biene	1	1,63
CAP	Wespe	1	1,64
AlaSTAT	Biene	1	1,57
AlaSTAT	Wespe	1	1,51

Tabelle 19: CAP bei Bienengiftallergie (Rast pos. >= 1)

CAP Biene pos.	Hauttest positiv		Summe
	ja	nein	
ja	65	38	101
nein	5	86	91
Summe	70	122	192

Tabelle 20: CAP bei Wespengiftallergie (Rast pos. >= 1)

CAP Wespe pos.	Hauttest positiv		Summe
	ja	nein	
ja	101	20	121
nein	15	66	81
Summe	116	86	202

Tabelle 21: AlaSTAT bei Bienengiftallergie (Rast pos. >= 1)

AlaSTAT Biene pos.	Hauttest positiv		Summe
	ja	nein	
ja	42	5	47
Nein	27	117	144
Summe	69	122	191

Tabelle 22: AlaSTAT bei Wespengiftallergie (Rast pos. >= 1)

AlaSTAT Wespe pos.	Hauttest positiv		Summe
	ja	nein	
ja	85	20	105
nein	30	66	96
Summe	115	86	201

Tabelle 23: Spezifität/Sensitivität für Biene ab Rastklasse 1

	Sensitivität	Spezifität
CAP	92,9 %	70,5 %
AlaSTAT	60,9 %	95,9 %

Tabelle 24: Spezifität/Sensitivität für Wespe ab Rastklasse 1

	Sensitivität	Spezifität
CAP	87,1 %	76,7 %
AlaSTAT	73,9 %	76,7 %

Die Spezifität bei der diagnostischen Bestimmung der bienengiftspezifischen Antikörper ist bei AlaSTAT mit 95,9% am höchsten. Beim CAP-System beträgt sie 70,5%. Die Sensitivität ist jedoch beim CAP mit 92,9% deutlich höher als bei AlaSTAT mit nur 60,9%.

Beim Nachweis wespengiftspezifischer Antikörper verhält es sich ähnlich, wenn auch nicht so ausgeprägt. So ist die Spezifität bei AlaSTAT und CAP mit 76,7% identisch. Aber auch hier ist die Sensitivität mit 87,1% beim CAP höher als bei AlaSTAT mit 73,9%.

Würde die Ergebnisse des RAST erst ab Klasse 2 für positiv bewertet werden, so stellen sich Sensitivität und Spezifität wie in Tabelle 25 und 26 abgebildet dar.

Um zu überprüfen, ob die Spezifität und Sensitivität in den einzelnen Altersklassen und bei beiden Geschlechtern dieselbe ist, wurde eine logistische Regression durchgeführt. Abhängige Variable waren die IgE Bestimmungen, unabhängige der Hauttest und Wechselwirkungsterme Hauttest mal Alter und Hauttest mal Geschlecht. Der Zusammenhang zwischen Hauttest und spezifischem IgE (CAP und AlaSTAT) war bei beiden Geschlechtern gleich.

Es zeigte sich jedoch, dass die Übereinstimmungen zwischen Hauttest und IgE-Werten bei der spezifischen Sensibilisierung gegen Wespe mit zunehmendem Alter signifikant schlechter werden. Dies ist bei AlaSTAT ausgeprägter als bei CAP. In Tabelle 27, in der Spezifität und Sensitivität in drei Altersgruppen dargestellt sind, wird dies verdeutlicht. In dieser Tabelle ist als Maß für den Zusammenhang zwischen Hauttest und spezifischen Sensibilisierungen zusätzlich das OddsRatio (OD) angegeben. Das OddsRatio zeigt an, wie sich das Verhältnis der Häufigkeit von Probanden mit positivem Sensibilisierungen zu Probanden mit negativen Sensibilisierungen verändert, wenn man Probanden mit positivem Hauttest (diese sollten möglichst viele positive Sensibilisierungen aufweisen) mit Probanden mit negativem Hauttest (diese sollten möglichst wenige positive Sensibilisierungen aufweisen) vergleicht. Je größer das OddsRatio ist, umso stärker ist der Zusammenhang zwischen Hauttest und IgE Werten.



Deutlich zu sehen ist der Rückgang der Spezifität des wespengiftspezifischen IgE's bei beiden Systemen, wobei AlaSTAT mit einer Spezifität von 50% der über 60-jährigen am niedrigsten liegt.

Tabelle 25: Spezifität/Sensitivität für Biene ab Rastklasse 2

	Sensitivität	Spezifität
CAP	82,8 %	82,0 %
AlaSTAT	39,1 %	98,4 %

Tabelle 26: Spezifität/Sensitivität für Wespe ab Rastklasse 2

	Sensitivität	Spezifität
CAP	80,2 %	88,4 %
AlaSTAT	63,5 %	83,7 %

Tabelle 27: Sensitivität und Spezifität in Bezug auf Altersklassen

	Alter	n*	Sensitivität t	Spezifität	OR	OG	UG
CAP-RAST-Kl. >=1							
Biene spez. IgE	bis 29 J	46	100 %	69,0 %	-	-	-
	30 - 59 J.	115	92,5 %	72,0 %	31,7	8,8	114,1
	ab 60 J.	31	84,6 %	66,7 %	11,0	1,8	66,4
Wespe spez. IgE	bis 29 J.	52	88,0 %	77,8 %	25,7	5,7	116,1
	30 - 59 J.	117	90,0 %	80,8 %	38,0	13,1	110,4
	ab 60 J.	33	76,2 %	58,3 %	4,5	1,0	20,6
AlaSTAT-RAST-Kl. >=1							
Biene spez. IgE	bis 29 J.	46	82,3 %	96,5 %	130,7	12,4	999,0
	30 - 59 J.	113	51,3 %	95,9 %	24,9	6,7	92,8
	ab 60 J.	32	61,5 %	94,7 %	28,8	2,9	288,0
Wespe spez. IgE	bis 29 J.	52	84,0 %	77,8 %	18,4	4,5	74,7
	30 - 59 J.	115	73,5 %	83,0 %	13,5	5,3	34,4
	ab 60 J.	34	63,6 %	50,0 %	1,7	0,4	7,3

\* n = Gruppengröße in der einzelnen Altersklasse

### 3.6. Spezifisches IgG

In vielen Studien wurde gezeigt, dass es zwischen der Hyposensibilisierung und ansteigenden IgG Werten einen Zusammenhang gibt. Im Gegensatz zum IgE, welches im akuten Stadium positiv reagiert, wird das IgG zur Bestimmung über einen längeren Zeitraum verwendet. Insbesondere bei Patienten unter Hyposensibilisierungstherapie wurden hohe s-IgG-Antikörper Titer gegen Insektengifte gefunden [16, 49, 29, 64]. Auch Imker, welche häufiger von Bienen gestochen werden, weisen meist einen höheren IgG-Serumspiegel gegenüber Bienengift auf als eine weniger exponierte Vergleichspopulation [7, 48, 68].

Bei einem Grossteil der Patienten wurde in beiden Systemen zum spezifischen IgE auch das spezifische IgG für Biene und Wespe bestimmt. Um dies neben dem Hauptteil der Arbeit hier auch zu überprüfen, wurde von den Patienten die mit Bienen, bzw. Wespengift hyposensibilisiert wurden die spezifischen IgG Werte und die Zeit in Monaten in einem Korrelationsdiagramm gegenüber gestellt. In dieser Arbeit wurden nicht von allen Patienten die spezifischen IgG Werte mit beiden Systemen gemessen. Darum hier nur der Vergleich mit dem AlaSTAT-System der Firma DPC Biermann.

Da die Stichprobe (N) der Patienten die mit Bienengift hyposensibilisiert wurden sehr gering ist, in diesem Falle konnten nur 6 für die Berechnung herangezogen werden, ist das Ergebnis trotz guter Korrelation mit  $r=0,39$  nicht signifikant. Das gleiche gilt für die mit Wespengift hyposensibilisierten, wenngleich diese mit 20 etwas zahlreicher vertreten sind. Hier beträgt die Korrelation  $r=0,55$ . In den Abbildungen 17 und 18 ist die Korrelation grafisch dargestellt.

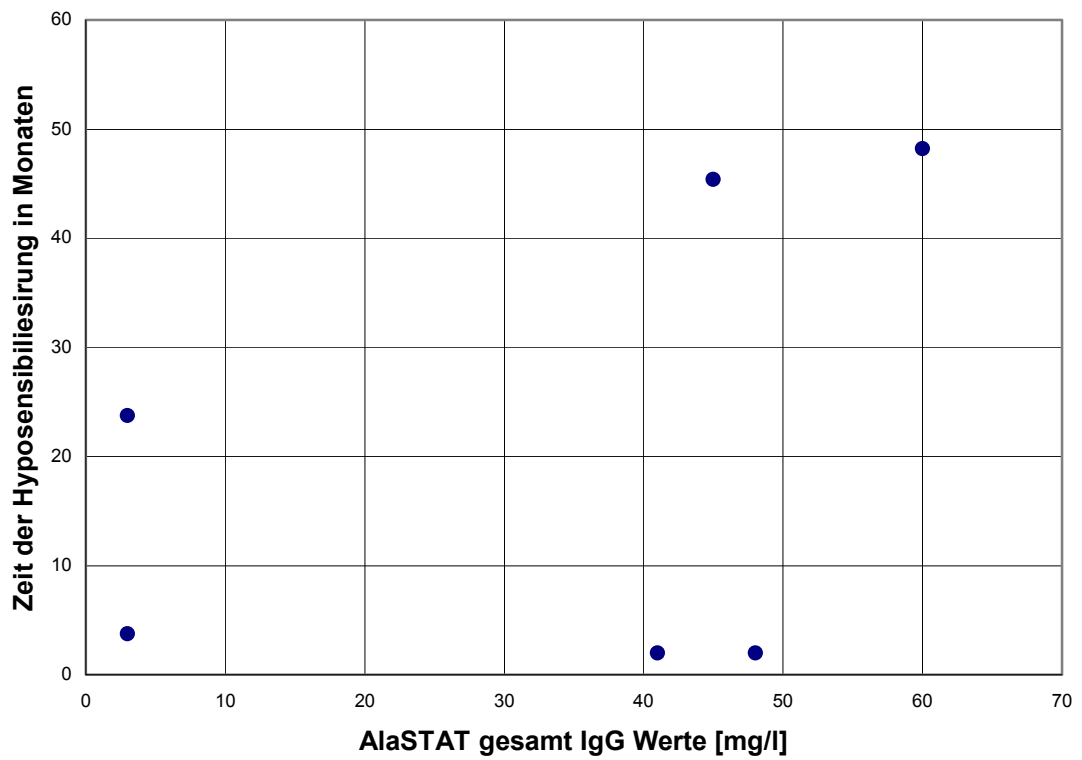


Abbildung 17: IgG Korrelation bei Bienengifthyposensibilisierten

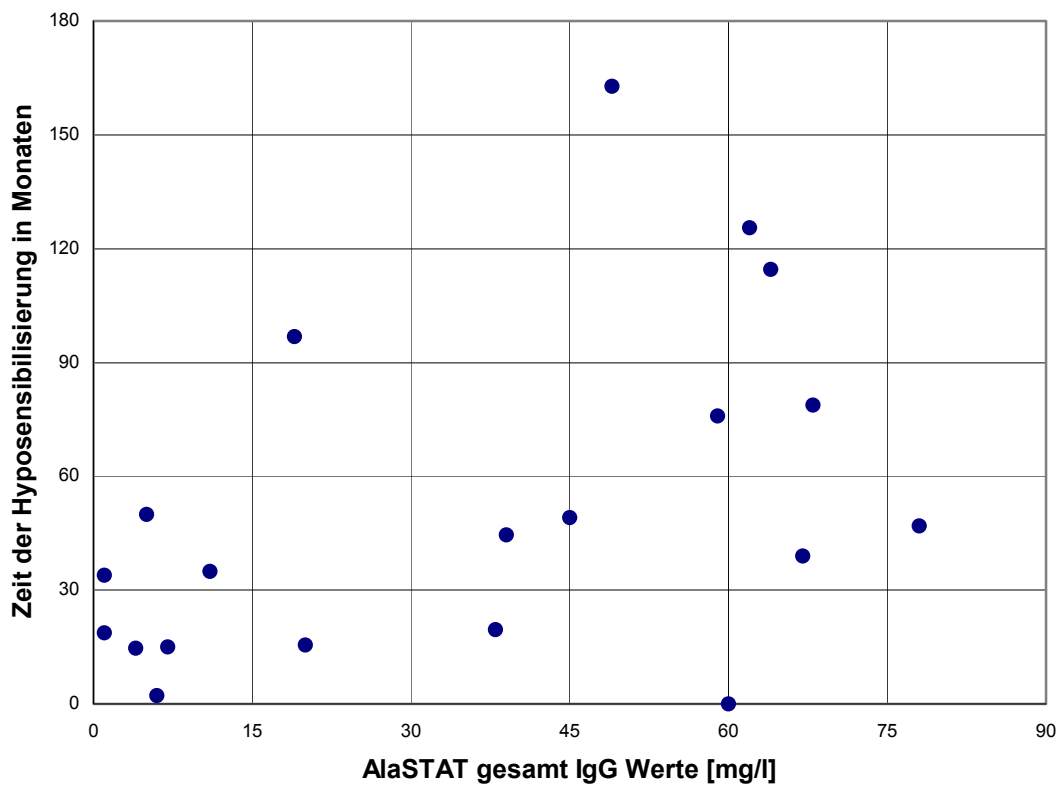


Abbildung 18: IgG Korrelation bei Wespengifthyposensibilisierten

### 3.7. Mittelwertsvergleich spezifisches IgG

Um herauszubekommen, ob Unterschiede in Bezug auf die Serumkonzentration des spezifischen IgG's bestehen zwischen den Patienten, die hyposensibilisiert wurden und denen, die bis zu dem Zeitpunkt noch nicht an einer Therapie teilgenommen haben, wurde der t-Test auf Unterschiede mit den Logarithmen der Einzelwerte, angefertigt.

In den Tabellen 28-31 sind arithmetisches Mittel (AM), Standardabweichung (Std), geometrisches Mittel (**GM**), Streufaktoren, Minimum und Maximum, Median und 5% bzw. 95% Perzentile jeweils für CAP und AlaSTAT in Bezug auf Biene und Wespe angegeben. Die Patienten sind wie folgt unterteilt in: hyposensibilisiert mit Biene und Wespe (Spalte 1 und 2), Patienten bei denen retrospektiv die Daten nicht erhoben werden konnten mit welchem Insekt sie hyposensibilisiert wurden (3), nicht Hyposensibilisierte (4) und der Kontrollgruppe (5) bei der jedoch nur die IgG Werte mit dem AlaSTAT-Systems gemessen wurden. In Spalte Gesamt (6) sind auch die Werte solcher Probanden eingeschlossen, die zwar einen Konzentrationswert für IgG hatten, jedoch keine Angaben zur Hyposensibilisierung gemacht werden konnten.

*Tabelle 28: Mittelwertsvergleich CAP spezifisches IgG Biene*

CAP IgG-Konzentration Biene	Hyposensibilisierung					Gesamt (6)
	mit Biene (1)	mit Wespe (2)	Mit Biene o. Wespe(3)	nicht Hyposen. (4)	Kontrolle (5)	
N	2	7	26	27	0	73
AM	19,91	14,75	25,84	16,35	0	19,37
Std	19,22	5,55	17,38	10,46	0	13,52
<b>GM</b>	<b>14,55</b>	<b>13,58</b>	<b>20,44</b>	<b>13,66</b>	0	15,69
Streuung	3,25	1,61	2,08	1,87	0	1,93
Minimum	6,32	5,36	4,77	3,42	0	3,42
5 % Perzentile	6,32	5,36	5,87	4,16	0	5,36
Median	19,91	15,90	20,40	14,40	0	17,30
95 % Perzentile	33,50	20,40	57,00	29,80	0	44,50
Maximum	33,50	20,40	75,30	54,70	0	75,30

Tabelle 29: Mittelwertsvergleich CAP spezifisches IgG Wespe

CAP IgG-Konzentration Wespe	Hyposensibilisierung					Gesamt (6)
	mit Biene (1)	mit Wespe (2)	Mit Biene o. Wespe(3)	nicht Hyposen. (4)	Kontrolle (5)	
N	2	7	26	27	0	73
AM	23,05	37,67	35,54	18,31	0	28,06
Std	8,98	22,99	21,50	9,99	0	19,57
<b>GM</b>	<b>22,16</b>	<b>30,55</b>	<b>29,57</b>	<b>15,73</b>	0	22,36
Streuung	1,49	2,14	1,87	1,77	0	1,98
Minimum	16,70	8,41	11,00	6,10	0	6,10
5 % Perzentile	16,70	8,41	13,50	6,13	0	7,49
Median	23,05	36,80	26,35	15,80	0	20,50
95 % Perzentile	29,40	73,30	77,50	35,60	0	73,30
Maximum	29,40	73,30	77,50	37,10	0	77,60

Tabelle 30: Mittelwertsvergleich AlaSTAT spezifisches IgG Biene

AlaSTAT IgG-Konzentration Biene	Hyposensibilisierung					Gesamt (6)
	mit Biene (1)	mit Wespe (2)	Mit Biene o. Wespe(3)	nicht Hyposen. (4)	Kontrolle (5)	
N	6	21	108	78	47	298
AM	20,86	30,05	16,87	6,02	2,39	11,61
Std	21,74	59,84	26,80	10,16	1,57	24,74
<b>GM</b>	<b>9,60</b>	<b>8,43</b>	<b>8,03</b>	<b>3,81</b>	<b>2,20</b>	5,05
Streuung	4,60	4,28	3,29	2,21	1,38	3,00
Minimum	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
5 % Perzentile	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Median	13,78	4,48	7,49	2,65	2,00	3,56
95 % Perzentile	48,21	200,00	53,14	16,92	4,71	45,40
Maximum	48,21	200,00	177,12	77,97	11,91	200,00

Tabelle 31: Mittelwertsvergleich AlaSTAT spezifisches IgG Wespe

AlaSTAT IgG-Konzentration Wespe	Hyposensibilisierung					Gesamt (6)
	mit Biene (1)	mit Wespe (2)	Mit Biene o. Wespe(3)	nicht Hyposen. (4)	Kontrolle (5)	
N	6	21	108	78	47	298
AM	13,02	52,22	36,82	12,58	3,84	23,80
Std	8,19	42,23	45,16	27,66	4,76	37,94
<b>GM</b>	<b>9,77</b>	<b>36,67</b>	<b>18,36</b>	<b>5,42</b>	<b>2,78</b>	9,45
Streuung	2,61	2,63	3,60	3,03	1,94	3,88
Minimum	2,00	2,26	2,00	2,00	2,00	2,00
5 % Perzentile	2,00	14,65	2,00	2,00	2,00	2,00
Median	15,26	38,96	21,60	3,77	2,00	9,08
95 % Perzentile	22,42	125,57	144,28	48,87	14,16	100,20
Maximum	22,42	162,74	200,00	200,00	27,46	200,00

Betrachtet man nun das geometrische Mittel (**GM**, in den Tabellen fett hervorgehoben) so ist zu sehen, dass beim CAP IgG der Biene (Tabelle 28) die Werte in Spalte 1 und 2 fast gleich mit dem in Spalte 4 sind und somit nur knapp signifikant. Die Ergebnisse des t-Test bei dem die Werte der Spalten 1 – 3 gegen die nicht Hyposensibilisierten (Spalte 4) gemessen werden lauten für Spalte 1: 0,90; Spalte 2: 0,98; Spalte 3: 0,34. Erst Werte < 0,5 gelten als signifikant. D. h. nur die Spalte mit den Patienten, von denen nicht bekannt ist, mit welchem Insekt sie Hyposensibilisiert wurden, ist signifikant. In Tabellen 25 in der die CAP-IgG-Konzentrationen der Wespe dargelegt sind, ist deutlicher eine Signifikanz anhand des GM zu sehen. Das belegen auch die Ergebnisse des t-Test: für Spalte 1: 0,45; Spalte 2: 0,01; Spalte 3: 0,0004.

Noch deutlicher ist die Signifikanz beim AlaSTAT-System sowohl bei Biene als auch bei der Wespe (Tabellen 26 und 27). Dies zeigt auch der t-Test.

Für Tabelle 26 AlaSTAT IgG Biene: Spalte 1: 0,0009; Spalte 2 und 3 sind beide < 0,0001. In der Tabelle 27 AlaSTAT IgG Wespe verhält es sich ganz ähnlich: Spalte 1: 0,0095; und auch hier sind die Ergebnisse in Spalte 2 und 3 < 0,0001.

## **4. Diskussion**

Der Vergleich zweier Immunoassays zum Nachweis Bienen- und Wespengiftspezifischer Antikörper zeigt, dass beide Systeme ihre Vorteile haben. Diese gewonnenen Ergebnisse werden in folgender Diskussion näher erläutert.

Betrachtet man als erstes die Resultate der spezifischen IgE Bestimmungen, so zeichnet sich das CAP-System durch seine hohe Sensitivität mit 92,9% insbesondere beim Nachweis bienengiftspezifischer Antikörper aus. Dafür überzeugt das AlaSTAT-System mit einer Spezifität von 95,9% bei Bienengiftsensibilisierten (Tabelle 23). In einer Arbeit von P. Bülow in der vier in-vitro-Testverfahren miteinander verglichen wurden, zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Das CAP-System lag mit einer Sensitivität von 100% für Bienengift und 90% für Wespengift weit vorn, gefolgt vom AlaSTAT mit einer Sensitivität von 95% bzw. 67%. Die Spezifität lag mit 68% für die Biene und 60% für die Wespe beim CAP leicht, beim AlaSTAT-System mit 70% bzw. 66% jedoch weit unter den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen [9].

Würde man bei CAP erst ab Rastklasse 2 das Testergebnis als positiv werten, so würde sich die Sensitivität bienengiftspezifischer Antikörper von 92,9% auf 82,8% verringern, die Spezifität jedoch von 70,5% auf 82% steigen (Tabelle 25). Genauso verhält es sich bei den mit Wespengift sensibilisierten. Die Spezifität steigt von 76,7% auf 88,4%, Sensitivität fällt jedoch von 87,1% auf 80,2% ab (Tabelle 26).

Gleiche Beobachtungen sind beim AlaSTAT-System zu machen, wobei der Anstieg der Spezifität von 95,9% auf 98,4% bei der Biene und von 76,7% auf 83,7% bei der Wespe mit einem viel stärkeren Sensitivitätsverlust in Kauf zu nehmen wäre (Tabellen 23-26).

Die höhere Sensitivität des CAP Systems ist keine neue Erkenntnis, sie ist bereits in einer Reihe von Studien für andere Allergene beschrieben worden [13, 30, 31, 54, 65]. Grund dafür ist unter anderem die hohe Allergenbindungs-kapazität des verwendeten Trägerpolymers [33, 65].

Weitere mögliche Ursachen für das Auftreten falsch oder fraglich positiver Befunde ab der Rastklasse 1 können sehr hohe Gesamt IgE-Werte [1, 2, 3] sein. D. h. es wird bei einem Patienten, ohne den Nachweis einer anamnestischen Reaktion auf einen Stich, ein positives Testergebnis festgestellt. Auch Kreuzreaktionen, wie sie insbesondere zwischen den verschiedenen Wespengiften auftreten, können hier eine Rolle spielen [47, 56, 66]. Zwischen Bienen und Wespen treten sie hingegen viel seltener auf. Sicher kann das jedoch nur durch Rast-Inhibitionstests nachgewiesen werden, so dass auch eine Mehrfachsensibilisierung nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Das relativ große und weitgefächerte Patientenkollektiv mit 252 Probanden (Tabelle 12 und 13) ist im Vergleich zu anderen Studien mit nur 50 bis 100 Patienten repräsentativ. Die schon erwähnte Arbeit von P. Bülow aus Jena hat lediglich 107 Patientenseren für den Vergleich der vier in-vitro-Testverfahren verwendet.

Die Gegenüberstellung der Immunoassayergebnisse mit dem Schweregrad der allergischen Reaktion konnte keine Abhängigkeit oder einen Zusammenhang weidergeben. So zeigt sich, dass IgE-Werte bei Patienten mit Reaktionsgrad 3 und 4 mitunter niedriger liegen als bei einem Reaktionsgrad von 1 oder 2. Diese Beobachtungen wurden schon von anderen Autoren gemacht [35,68].

Werden Spezifität und Sensitivität nun in verschiedenen Altersklassen miteinander verglichen (Tabelle 27), so ist deutlich zu sehen, dass sowohl Sensitivität als auch Spezifität bei beiden Systemen im Alter geringer werden. Dies ist besonders ausgeprägt beim wespengiftspezifischen IgE des AlaSTAT-Systems. Mögliche Ursachen dafür können die mit zunehmendem Alter beobachteten geringeren Antikörperspiegel sein. Grund dafür ist ein mögliches Absinken des spezifischen IgE's gegenüber Insektengiften nach längerem, stichfreien Intervall [46]. Auch Wechselwirkungen mit Medikamenten, deren Bedarf mit steigendem Alter zunimmt, und pseudoallergische Reaktionen kommen in Frage. Wie jedoch die Reaktion bei erneutem Stichereignis aussieht, kann leider wie Studien gezeigt haben, nicht voraus gesagt werden [37, 53].



Im nun folgenden Abschnitt werden die Berechnungen und Ergebnisse des spezifischen IgG's und seinem positiven Zusammenhang zwischen Titer und Hyposensibilisierung diskutiert. In einer Reihe von Studien ist dieser Zusammenhang bereits nachgewiesen worden [31, 35, 50]. Sehr deutlich ist das beim AlaSTAT-System zu sehen. Nur beim spezifischen IgG-Biene des CAP-Systems bestand beim Mittelwertsvergleich keine Signifikanz. Mögliche Ursache dafür ist die zu geringe Fallzahl. Abgesehen davon besteht eine gute Korrelation zwischen Hyposensibilisierungszeitraum und IgG Titer. Gleiche Beobachtungen wurden auch bei Imkern gemacht, bei denen in Abhängigkeit der Stichhäufigkeit der IgG-Titer anstieg [7, 68]. Ein hoher IgG-Spiegel kann jedoch nicht dafür garantieren, bei Reexposition keine allgemein- oder systemische Reaktionen zu bekommen [5, 50, 55].

Auch wenn sich systemische Reaktionen auf Insektenstiche nicht wiederholen müssen, so tragen sensibilisierte Patienten jedoch ein vielfach höheres Risiko, durch erneuten Stich lebensgefährliche Reaktionen zu entwickeln. Dieses Risiko wird in einer Studie von Albrecht et al. auf 5% geschätzt [4].

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Testung in der Allergiediagnostik, insbesondere wenn es um Insektengiftallergien geht, nicht ausreicht. Eine Mehrstufendiagnostik, in der Anamnese und Hauttest durchgeführt und berücksichtigt werden, ist immer angebracht. Nur so ist ein sicheres Ergebnis zu finden, um die richtige Therapie einzuleiten.

## **5. Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war und ist es, eine optimale Diagnostik für Patienten ambulant oder in der Klinik durchzuführen. Der Vergleich der zwei Immunoassays von denen einer ein Festphase- (Firmen Pharmacia CAP Systeme RAST FEIA) und der andere ein Flüssigphase-Test (DPC Biermann AlaSTAT) ist konnte deutlich machen, dass es nicht einfach ist, ein eindeutiges Urteil und somit eine klare Aussage zu tätigen, welcher Test „besser“, bzw. „schlechter“ ist.

Hierzu wurden im Zeitraum 1997 und 1998 252 Patientenseren mit anamnestischem Verdacht auf Bienen- oder Wespengiftallergie und 47 Kontrollseren mit beiden Testverfahren bestimmt.

Dabei hat sich im Einzelnen gezeigt, dass die Spezifität beim AlaSTAT-System mit 95,9% bei Bienengiftallergikern als besonders gut zu beurteilen ist, wohingegen das CAP-System mit einer sehr guten Sensitivität von 92,9% überzeugt.

Bei der Bestimmung der wespengiftspezifischen Antikörper bieten beide Systeme annähernd gleiche Resultate. Liegt die Sensitivität des CAP mit 87,1% etwas über der des AlaSTAT, so ist die Spezifität mit 76,7% bei beiden Verfahren gleich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das AlaSTAT System dem CAP nicht überlegen ist. Dies gilt zumindest für den Zeitraum 1997 und 1998, in dem diese Studie durchgeführt wurde. Weiterführende Verbesserungen können nun schon wieder ganz neue Ergebnisse darlegen.

Die Anamnese sollte immer Grundlage einer Diagnosesicherung und der daraus folgenden Therapie sein. Der alleinige Verlass auf in vitro Testergebnisse ist derzeit noch nicht möglich, wie die gewonnen Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen. Zur weiteren Diagnosesicherung bieten sich Hauttestungen wie zum Beispiel Prick- und Epicutantest an.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit in besonders fraglichen Fällen weitere Untersuchungsmethoden durchzuführen, wie zum Beispiel Immunoblot, CAST und Histaminrelease. Diese Testverfahren sind jedoch recht aufwendig und

kostenintensiv, da zum Teil mit radioaktiven Materialien gearbeitet werden muss, wie beim Histaminrelease. Sie sind somit für die Routine nur bedingt geeignet und einsetzbar. Die in dieser Arbeit getesteten Systeme überzeugen alleine schon durch ihre einfache Handhabung. Außerdem sind sie für Patienten absolut ungefährlich und somit auch zur Diagnostik für Kinder geeignet.

Diese Arbeit zeigt, dass den Allergien nach wie vor eine hohe Bedeutung zugemessen werden sollte und es immer noch Potential gibt um die Diagnostik der allergischen Erkrankung zu optimieren.

## **6. Literaturliste**

- 1 Adkinson, N.F.  
The radioallergosorbent test. Uses and abuses.  
J. Allergy Clin. Immunol. 65 (1980) 1-4
- 2 Adkinson, N.F.  
The radioallergosorbent test.  
J. Allergy Clin. Immunol. 66 (1980) 173-175
- 3 Adkinson, N.F.  
RAST for diagnosis of IgE-mediated disease.  
J. Allergy Clin. Immunol. 70 (1982) 316
- 4 Albrecht, I., Eichler, G., Müller, U., Hoigne, R.  
On the significance of severe local reactions to hymenoptera stings.  
Clin. Allergy 10/6 (1980) 675-682
- 5 Bäuerle, G., Schwarz, W.  
Hymenopterengift-Allergie.  
Stellenwert des allergenspezifischen IgG bei der Therapie  
Dtsch. Med. Wschr. 108 (1983) 1351-1355
- 6 Björkander, J., Belin, L.  
Diagnostic skin testing in Hymenoptera sensitivity. Advances and applied  
Immunology.  
Ed. A. Oehling. Pergamon Press, New York (1980) 733
- 7 Bousquet, J., Coulomb, J., Robinet-Levy, M.,  
Clinical and immunological surveys in bee keepers  
Clin. Allergy 12 (1982) 331-342
- 8 Bresser, H., Sander, Ch., Rakoski, J.  
Insektenstichnotfälle in München 1992  
Allergo Journal Heft 7 (1995) 373-376
- 9 Bülow, P.  
Vergleich der vier in-vitro-Methoden RAST, MAGIC LITE, AlaSTAT und  
CAP bei der Diagnostik der Insektengiftallergie  
1996 31-32
- 10 Charpin, D., Vervloet, D., Haddi, E., Segalen, C., Tafforeau, M.,  
Birnbaum, J., Lanteuame, A., Charpin, J.  
Prevalence of Allergy to Hymenoptera Stings.  
Allergy Proc, 11/1 (1990) 29-32

- 11 Coombs, R. R. A., Gell, P. G. H.  
The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical aspects of immunology,  
eds. Gell, P. G. H., Coombs, R. R. A., Davis, Philadelphia (1963)
- 12 Ederly, H., Ishay, J., Gitter, S., Joshua, H.  
Venoms of Vespidae. In: Arthropod venoms, handbook exp. Pharmacol.  
Bettini ed., Springer Verlag, New York (1978) 690-771
- 13 Ewan, P. W., Coote, D.  
Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the Immuno CAP)  
for measurement of specific IgE antibodies.  
Allergy 45 (1990) 22-29
- 14 Fischer, P., Külzer, R.  
Zur Prävalenz der Insektengiftallergie in Deutschland.  
Allergo J. 2(Suppl. 2) (1993) 53-56
- 15 Glowania, H. J., Schulz, K. H.  
Die Bienen- und Wespengiftallergie.  
Therapiewoche 31 (1981) 6371-6380
- 16 Golden, D. B. K., Meyers, D. a., Kagey-Sobotka, A., Valentine, M. D.,  
Lichtenstein, L. M.  
Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody  
level during immunotherapy  
J. Allergy Clin. Immunol. 69 (1982) 489-493
- 17 Golden, D. B. W., Valentine, M. D., Kagey-Sobotka, A.,  
Lichtenstein, L. M.  
Prevalence of hymenoptera venom allergy.  
J. Allergy Clin. Immunol. 69 (1982) 124
- 18 Graft, D. F., Schuberth, K. C., Kagey-Sobotka, A. K., Kwite rovich, K. A.,  
Niv Yaffa, B. S. N.  
The development of negative skin test in children treated with venom  
immunotherapy  
J. Allergy Clin. Immunol. 73 (1984) 61-67
- 19 Habermann, E.  
Bee and Wasp venoms.  
Science 177 (1972) 314-322
- 20 Harries, M. G., Kemeny, D. M., Youlten, L. J. F., Mck. Mills, M.,  
Lessof, M. H.  
Skin and radioallergosorbent tests in patients with sensitivity to bee and  
wasp venom.  
Clin. Allergy 14 (1984) 407-412

- 21 Hintermeier, H., Hintermeier M.  
Bienen, Hummeln, Wespen im Garten und in der Landschaft  
Foto von K. Harz  
Obst- und Gartenbauverlag München (1994) 100
- 22 Hintermeier, H., Hintermeier M.  
Bienen, Hummeln, Wespen im Garten und in der Landschaft  
Foto von K. Fiedler (FWU München)  
Obst- und Gartenbauverlag München (1994) 99
- 23 Hintermeier, H., Hintermeier M.  
Bienen, Hummeln, Wespen im Garten und in der Landschaft  
Foto von E. Taube  
Obst- und Gartenbauverlag München (1994) 19
- 24 Hoffman, D. R.  
The use and interpretation of RAST to stinging insect venoms.  
Ann. of Allergy 48 (1982) 12-13
- 25 Hoffmann, D. R., Jacobson, R. S.  
Allergens in Hymenoptera venom XII. How much protein is in a sting?  
Ann. of Allergy 52 (1984) 276-278
- 26 Hunt, K. J., Valentine, M. D., Sobotka, A. K., Lichtenstein, L. M.  
Diagnosis of Allergy to stinging insects by skin testing with hymenoptera  
venoms.  
Ann. Intern. Med. 85 (1976) 56-59
- 27 Husemann  
Handbuch für Toxikologie (Suppl.), 1867, 26.
- 28 Jäger, L.  
Klinische Immunologie und Allergologie Teil 1.  
Gustav Fischer Verlag Jena, 642-653
- 29 Jarisch, R.  
Die Bienengiftallergie  
Wien. Klein. Wschr. 92 (1980) (Suppl.) 1-27
- 30 Kelso, J. M., Sodhi, N., Gosselin, V. A., Yunginger, J. W.  
Diagnostic performance characteristics of the standard Phadebas RAST,  
modified RAST and Pharmacia CAP system versus skin testing  
Ann. Allergy 67 (1991) 511-514
- 31 Kemeny, D. M., Lessof, M. H., Trull, A. K.  
IgE and IgG antibodies to bee venom as measured by a modification of  
the RAST method  
Clinical Allergy 10 (1980) 413-421

- 32 Kleinhaus, D.  
Bientoxin-Allergie – Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) und  
Hauttest-Ergebnisse.  
Akt. Dermatol. 3 (1977) 217-224
- 33 Leimgruber, A., Mosimann, B., Claeys, M., Seppey, M., Jaccard, Y.,  
Aubert, V., Peiterequin, R., Nisoli, M. P.  
Clinical evaluation of a new in-vitro assay for specific IgE, the Immuno  
CAP system  
Clin. And Exp. Allergy 21 (1991) 127-131
- 34 Lichtenstein, L. M., Valentine, M. D., Sobotka, A. K.  
A case for venom treatment in anaphylactic sensitivity to Hymenoptera  
sting.  
New Engl. J. Med. 290 (1974) 1223-1227
- 35 Light, W. C., Reisman, R. E., Shimizu, M., Arbesman, C. E.  
Clinical application of measurements of serum levels of bee venom-  
Specific IgE and IgG  
J. Allergy Clin. Immunol. 59 (1977) 247-253
- 36 Mosbech, H.  
Insect Allergy. A comparative study including case histories  
and immunological parameters.  
Allergy, 39 (1984) 543-549
- 37 Mosbech, H., Christensen, J., Dirksen, A., Söborg, M.  
Insect allergy. Predictive value of diagnostic tests. A three year follow-up  
study  
Clin. Allergy, 16 (1986) 433-440
- 38 Mueller, H. L.  
Diagnosis and treatment of insect sensitivity.  
J. Asthma Res. 3 (1966) 331-333
- 39 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 33-39
- 40 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 33
- 41 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 35-40

- 42 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 6
- 43 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 78-85
- 44 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 1
- 45 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 82-85
- 46 Müller, U.  
Insektenstichallergie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 65, 92
- 47 Müller, U., Elliot, W., Reisman, E., Ishay, J., Walsh, S., Steger, R.,  
Wypych, J., Arbesman, C.  
Comparison of biochemical and immunologic properties of venoms from  
Four hornet species  
J. Allergy Clin. Immunol. 67 (1981) 290-298
- 48 Müller, U., Johansson, S. G. O., Streit, C.  
Hymenoptera sting hypersensitivity: IgE, IgG and haemagglutinating  
antibodies to bee venom constituents in relation to exposure and clinical  
reactions to bee stings.  
Clin. Allergy 8 (1978) 267-272
- 49 Müller, U., Spiess, J., Patrizzi, R., Roth, A., Hoigné, R.  
Die Bedeutung serologischer Untersuchungen für Diagnose und  
Therapie der Insektenstichallergie  
Schweiz. Med. Wschr. 107 (1977) 1747-1750
- 50 Müller, U., Thurnheer, U., Patrizzi, R., Spiess, J., Hoigné, R.  
immunotherapy in bee sting hypersensitivity. Bee venom versus whole  
body extract.  
Allergy 34 (1979) 369-378
- 51 Nakajima, T.  
Biochemistry of Vespid Venoms. In: Handbook of Natural Tox ins. Vol. 2.  
Ed.. Tu, A. T.. Marcel Dekker, Inc.,  
New York (1984) 109-134



- 52 O'Conner, R., Peck, M. L.  
Venoms of apidae. In: Bettini, S.. Arthropod venoms handbook of exp. pharmacol. 48 (1978) Chapter 21 613-659
- 53 Parker, J. L., Santrach, P. J., Dahlberg, M. J. E., Yunginger, J. W.  
Evaluation of hymenoptera-sting sensitivity with deliberate sting challenges Inadequacy of present diagnostic methods.  
J. Allergy Clin. Immunol. 69/2 (1982) 200-207
- 54 Pastorello, E. A., Incorvaia, C., Pravettoni, V., Farioli, L., Ghezzi, M.  
Clinical evaluation of CAP-system and RAST in the measurement of specific IgE.  
Allergy 47 (1992) 463-466
- 55 Reisman, R. E.  
Insect Allergy.  
Allergy, Principles and practice.  
E. Middleton, ed Mosby, St. Louis, (1983) 1361
- 56 Reismann, R. E., Müller, U., Wypych, J., Elliot, W., Arbesman, C. E.  
Comparison of the Allergicity and antigenicity of yellow jacket and hornet venoms  
J. Allergy Clin. Immunol. 69 (1982) 268-274
- 57 Reisman, R. E., Wypych, J. I., Arbesman, C. E.  
Stinging insect allergy. Detection and clinical significance of venom IgE antibodies.  
J. Allergy Clin. Immunol. 56 (1975) 443-449
- 58 Ring, J., Wenning, J.  
Weißbuch Allergie in Deutschland 2000  
Urban & Vogel (2000) 19-24
- 59 Schäfer, T., Vieluf, D., Berger, J., Ring, J.  
Epidemiologie von Insektengiftallergien  
Allergo J. 6 (1997) Suppl 1 4-6
- 60 Settipane, G. A., Boyd, G. K.  
Prevalence of bee sting allergy in 4992 boy scouts.  
Acta Allergol. 25 (1970) 286-291
- 61 Settipane, G. A., Newstead, G. J., Boyd, G. K.  
Frequency of hymenoptera allergy in an atopic and normal population.  
J. Allergy Clin. Immunol. 50 (1972) 146-150
- 62 Shipolini, R. A.  
Biochemistry of Bee Venom. In: Handbook of Natural Toxins  
Vol. 2 Ed..Tu, A.T. Marcel Dekker Inc., New York (1984) 49-86

- 63 Thurnheer, U., Müller, U., Stoller, R., Lanner, A., Hoigné, R.  
Venom immunotherapy in Hymenoptera sting allergy  
*Allergy* 38 (1983) 465-475
- 64 Urbanek, R., Forster, J., Karitzky, D., Ziupa, J.  
The prognostic significance of specific IgG-antibodies in insect sting allergy  
*Eur. J. Pediatr.* 136 (1981) 31-34
- 65 van Houte, A. J., Bartels, P. C. M.,  
Comparative evaluation of the Pharmacia CAP system and the DPC AlaSTAT system for in vitro detection of allergen-specific IgE with the skin prick test  
*Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30 (1992) 101-105
- 66 Wicher, K., Reisman, R. E., Wypych, J., Elliot, W., Steger, R., Mathews, R. S., Arbesman, C. E.  
Comparison of the venom immunogenicity of various species of yellow jackets (genus *vespula*)  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 66 (1980) 244-249
- 67 Wide, L., Bennich, H., Joansson, S. G. O.  
Diagnosis of Allergy by an in-vitro test for allergen antibodies.  
*Lancet* ii. (1967) 1105-1107.
- 68 Yunginger, J. W., Jones, R. T., Leiferman, K. M., Paull, B. R., Welsh, P. W., Gleich, G. J.  
Immunological and biochemical studies in beekeepers and their family members  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 61 (1978) 93-101
- 69 Allergen Pannel Pharmacia  
Insektengifte und Insekten  
72

## **7. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen**

### Tabellen

- 1 Einteilung der Allergien nach Coombs und Gell
- 2 Inhaltsstoffe von Bienengift (nach Habermann, O'Conner, Shipolini)
- 3 Inhaltsstoffe von Wespengift (nach Edery, Nakajama)
- 4 Einteilung der allergischen Reaktionen auf Hymenopterenstiche nach Müller mit Modifikation
- 5 Dosierungsschema für die Schnell-Hyposensibilisierung
- 6 Materialien s-IgE CAP-System
- 7 Konzentrationsgrenzen bei CAP IgE
- 8 Materialien s-IgG CAP-System
- 9 Materialien s-IgE AlaSTAT-System
- 10 Konzentrationsgrenzen bei AlaSTAT IgE
- 11 Materialien s-IgG AlaSTAT-System
- 12 Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Verdacht auf Bienen- oder Wespengiftallergie
- 13 Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten ohne Verdacht auf Bienen- oder Wespengiftallergie
- 14 Zuordnung Patienten – Reaktionsgrad bei systemischer Reaktion auf Bienen
- 15 Zuordnung Patienten – Reaktionsgrad bei systemischer Reaktion auf Wespen
- 16 CAP und AlaSTAT bei Anamnese mit pos. systemischer Reaktion
- 17 Verhältnis von Hauttest und ELISA-Tests in Bezug auf pos. und neg. Reaktion
- 18 Youden-Index
- 19 CAP bei Bienengiftallergie (Rast pos.  $\geq 1$ )
- 20 CAP bei Wespengiftallergie (Rast pos.  $\geq 1$ )
- 21 AlaSTAT bei Bienengiftallergie (Rast pos.  $\geq 1$ )

- 22 AlaSTAT bei Wespengiftallergie (Rast pos.  $\geq 1$ )
- 23 Spezifität/Sensitivität für Biene ab Rastklasse 1
- 24 Spezifität/Sensitivität für Wespe ab Rastklasse 1
- 25 Spezifität/Sensitivität für Biene ab Rastklasse 2
- 26 Spezifität/Sensitivität für Wespe ab Rastklasse 2
- 27 Sensitivität und Spezifität in Bezug auf Altersklassen
- 28 Mittelwertsvergleich CAP spezifisches IgG Biene
- 29 Mittelwertsvergleich CAP spezifisches IgG Wespe
- 30 Mittelwertsvergleich AlaSTAT spezifisches IgG Biene
- 31 Mittelwertsvergleich AlaSTAT spezifisches IgG Wespe

## Abbildungen

- 1 Taxonomie der Hymenopteren (Adaptiert von Müller)
- 2 Wespe (*Paravespula germanica*)
- 3 Biene (*Apis mellifera*)
- 4 Wespenstachel
- 5 Testablauf s-IgE Pharmacia CAP System
- 6 Testablauf s-IgG Pharmacia CAP System
- 7 Testablauf s-IgE DPC Biermann AlaSTAT
- 8 Testablauf s-IgG DPC Biermann AlaSTAT
- 9 Positive und negative Hauttestreaktionen, gegenüber CAP und AlaSTAT bei Biene und Wespe
- 10 Darstellung des Zusammenhangs von Hauttest und Immunoassays in Bezug auf pos. und neg. Reaktion
- 11 Diagramm: Bestimmung von spezifischem IgE gegen Biene
- 12 Diagramm: Bestimmung von spezifischem IgE gegen Wespe
- 13 Diagramm: Bestimmung von spezifischem IgG gegen Biene
- 14 Diagramm: Bestimmung von spezifischem IgG gegen Wespe
- 15 ROC-Diagramm zur Darstellung von Spezifität und Sensitivität der beiden Systeme CAP und AlaSTAT bei der Biene
- 16 ROC-Diagramm zur Darstellung von Spezifität und Sensitivität der beiden Systeme CAP und AlaSTAT bei der Wespe
- 17 Diagramm: IgG Korrelation bei Bienengifthyposensibilisierten
- 18 Diagramm: IgG Korrelation bei Wespengifthyposensibilisierten

Fotos mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. H. Hintermeier et al.

## **9. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. J. Rakoski und Herrn Prof. Dr. M. Ollert danke ich für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung sowie ihre Geduld.

Mein ganz besonderer Dank gilt Johanna Grosch, die mir bei vielen Fragen und Problemen hilfreich zur Seite stand. Sie führte den Großteil der Tests durch und war mir behilflich beim Beschaffen der notwendigen Literatur sowie beim Korrekturlesen.

Für die statistische Auswertung danke ich Frau Dr. U. Krämer und Frau E. Link aus Düsseldorf und Dr. M. Wiseman vom LRZ-München.

Außerdem danke ich meiner Familie, die immer da ist, wenn ich sie brauche.