

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 des Basophilenaktivierungstests durch  
Bestimmung der Aktivierungsmarker CD63 oder CD203c  
bei Patienten mit Insektengiftallergie**

Rita Varga

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. B. Eberlein
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 28.04.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2009 angenommen.

# **„Ehre, wem Ehre gebührt“**

die Bibel

**Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet**

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

### **Vorträge auf Kongressen:**

Vortrag auf dem 7. Arbeitsgespräch Insektengiftallergie, Regensburg, 23.-24. September 2005  
Eberlein-König B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Rakoski J, Ring J.  
Basophilen-Aktivitätstests mit verschiedenen Aktivitätsmarkern (CD63, CD203c) - Untersuchungen bei Patienten mit Insektengiftallergie.  
Allergo J 2005; 7/1: 511

Vortrag auf dem XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Wien, 10.-14. Juni 2006  
Eberlein-König B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Behrendt H, Ring J.  
Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy.  
Abstract Book, S. 47

### **Publikationen:**

Eberlein-König B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Behrendt H, Ring J.  
Comparison of basophil activation tests using CD63 or CD203c expression in patients with insect venom allergy.  
Allergy 2006; 61: 1084-1085

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1. Die Insektengiftallergie .....	8
1.2. Diagnostik der Insektengiftallergie .....	13
1.2.1. Erhebung der Stichanamnese .....	13
1.2.2. Hauttestung .....	14
1.2.3. In-vitro-Testverfahren .....	14
1.3. Therapie bei Insektengiftallergie .....	16
1.4. Der Basophilenaktivierungstest (BAT) .....	18
1.4.1. Grundlagen des BAT .....	18
1.4.2. Die Oberflächenantigene CD63 und CD203c .....	19
1.5. Zielsetzung der Studie .....	22
<b>2. Patienten, Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1. Patienten und Kontrollpersonen .....	23
2.2. Standarddiagnostik der Hymenoptereingiftallergie .....	24
2.2.1. Schweregrad der anaphylaktischen Stichreaktion .....	24
2.2.2. Hauttestung auf Hymenoptereingift .....	25
2.2.3. Bestimmung insektengiftspezifischer IgE-Antikörper .....	25
2.3. Basophilenaktivierungstests .....	27
2.3.1. Reagenzien, Material und Geräte .....	27
2.3.2. Bestimmung der Basophilenaktivierung mit CD63 .....	29
2.3.3. Detektion der Hochregulation von CD203c .....	30
2.4. Durchflusszytometrische Datenanalyse und Auswertung .....	31
2.5. Statistische Methoden .....	34

---

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1. Patientenkollektiv .....	38
3.1.1. Klinische Charakterisierung .....	38
3.1.2. Auswertung der Standardverfahren und Diagnose .....	39
3.1.3. Testresultate bei Detektion von CD63 und CD203 .....	42
3.1.4. Vergleich der Ergebnisse von BAT und Standarddiagnostik .....	57
3.1.5. Höhe der Basophilenaktivierung im BAT bei spezifischer Immuntherapie .....	61
3.1.6. Expressionshöhe von CD63 und CD203c in Bezug auf den Schweregrad allergischer Stichreaktionen .....	62
3.2. Kontrollpersonen .....	63
3.2.1. Gruppeneinteilung .....	63
3.2.2. Ergebnisse im CD63- und CD203c-BAT .....	63
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>67</b>
4.1. Diagnostische Möglichkeiten der Insektengiftallergie .....	67
4.2. Der CD63- und CD203c-BAT bei Insektengiftallergie .....	70
4.3. Diskussion der BAT-Ergebnisse .....	73
4.4. Der BAT in der Allergiediagnostik .....	75
4.5. Technische Aspekte der BAT-Methodik .....	79
4.6. Auswertung und Interpretation von BAT-Ergebnissen .....	82
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>85</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>101</b>
Danksagung .....	105

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+	positiv
-	negativ
° C	Grad Celsius
a. Tr.	am Trockengewicht
Abb.	Abbildung
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
Ak	Antikörper
B	Biene/ Bienengift
BAT	Basophilenaktivierungstest
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
ca.	circa
CAST	Cellular-Antigen-Stimulation-Test
CD	Cluster of Differentiation
Da	Dalton
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
Fc <sub>ε</sub> RI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
FEIA	Fluoreszenzenzymimmunoassay
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FL1	Fluoreszenz 1
FL2	Fluoreszenz 2
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FSC	Forward Scatter
gp	Glykoprotein
i.c.	intracutan
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
k	Kilo
L	Liter
M	Messbereich

---

MCD-Peptid	Mastzell-degranulierende Peptid
Min	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
nm	Nanometer
N.K.	Negativ-Kontrolle
Pat.	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
P.K.	Positiv-Kontrolle
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
ROC	Receiver-Operating-Characteristic
s.	siehe
S.	Seite
SA	Standardabweichung
SI	Stimulationsindex
SIT	Spezifische Immuntherapie
SSC	Side Scatter
Tab.	Tabelle
TH1	T-Helferzelle vom Typ 1
TH2	T-Helferzelle vom Typ 2
U	Units
W	Wespe/ Wespengift

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Insektengiftallergie

### *Epidemiologische Daten und Risikofaktoren der Insektengiftallergie*

In Deutschland leiden etwa 1,2-4,5% der allgemeinen Bevölkerung an einer systemischen Insektengiftallergie [49, 139]. Sie ist Ausdruck einer Überempfindlichkeit des Immunsystems gegen bestimmte Insektengifte und wird mit einer Prävalenz von 0,8-5% für Europa und die USA angegeben [58, 105]. Die betroffenen Personen reagieren nach einem Stich nicht nur mit einer gewöhnlichen schmerzhaften Schwellung und Rötung der Einstichstelle, sondern können lebensgefährliche Symptome erleiden, die den ganzen Organismus betreffen [104]. Pro Jahr werden in Deutschland rund 10-20 Todesfälle gemeldet, die auf Insektenstiche zurückzuführen sind, wobei allerdings von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen werden muss [119]. Diese Mortalitätsrate von 0,24/ Jahr/ Mio. liegt im Bereich publizierter Angaben anderer europäischer Länder und den USA [104, 139]. Weitaus ungefährlicher, aber wesentlich häufiger sind gesteigerte lokale Reaktionen nach einem Insektenstich, die bei bis zu 19% der Allgemeinbevölkerung auftreten. Daneben können bei etwa 25% der Erwachsenen positive Hauttestreaktionen oder insektengiftspezifische Antikörper (Ak) der Immunglobulinklasse E (IgE) als Ausdruck einer Sensibilisierung gegen Insektengift ermittelt werden, bei Kindern sogar bis zu 50%, ohne dass klinisch relevante Allergiesymptome auftreten [119]. Eine Insektengiftallergie kann in jedem Alter vorkommen und tritt häufig nach mehrfachen unauffälligen Stichereignissen zutage. Bienengiftallergien verlaufen meist dramatischer und treten häufiger bei jüngeren, Wespengiftallergien bei älteren Menschen auf. Das Risiko einer Insektengiftallergie steigt mit der Expositionshäufigkeit. Es ist insbesondere bei Personen mit beruflicher Tätigkeit im Freien (Imker, Landarbeiter, Gärtner) hoch, aber auch bestimmte Freizeitaktivitäten (Wandern, Radfahren) können zu den prädisponierenden Faktoren zählen [11, 104]. Zudem werden kardiovaskuläre Erkrankungen, erhöhte basale Serumtrypasespiegel und das Vorliegen einer Mastozytose zu den Risikofaktoren einer Insektengiftallergie gezählt [118].

### *Klinik der Stichreaktion*

Das klinische Erscheinungsbild allergischer Reaktionen auf Insektenstiche ist sehr vielseitig. Eine Rötung und Schwellung im Bereich der Einstichstelle (Lokalreaktion) ist harmlos und spiegelt die Antwort auf toxische oder allergische Komponenten im Insektengift wieder. Ist diese jedoch größer als 10 cm (teilweise mit Persistenz über 24 Stunden) liegt eine verstärkte Lokalreaktion vor, die IgE bedingt sein kann, aber deren Pathomechanismus im Einzelnen nicht genau geklärt ist [11, 60, 61].

Die systemische Stichreaktion ist in den allermeisten Fällen eine allergische Reaktion vom Soforttyp (Typ I nach Coombs und Gell [24]), die durch insektengiftspezifische IgE-Ak ausgelöst wird und bereits nach einem einzigen Stich auftreten kann. Die ersten Symptome treten meist wenige Minuten, selten später als eine Stunde nach dem Stichereignis auf und werden unterschiedlichen Schweregraden zugeordnet.



Dabei werden milde bis mittelschwere Allgemeinreaktionen, wie z. B. von der Einstichstelle entfernte Hautrötung (Flush), Nesselausschlag (Urtikaria) und Schwellungen (Angioödem), die von leichter Übelkeit und Atemnot begleitet sein können von schweren, sog. anaphylaktischen Allgemeinreaktionen unterschieden. Hier kann es neben starker Atemnot (Bronchokonstriktion, Larynxödem) und gastrointestinalen Störungen (Erbrechen, Diarrhoe) zum anaphylaktischen Schock kommen, der im Extremfall in einem tödlichen Kreislaufversagen endet (s. Tab. 4, S. 24) [11, 104, 127].

### Pathomechanismus bei Insektengiftallergie

Nicht jeder Bienen- oder Wespenstich führt zu einer allergischen Reaktion. Grundvoraussetzung ist eine Sensibilisierung des Patienten, die entsteht, wenn bei Erstkontakt mit Allergenen des Insektengifts (meist höhermolekulare Substanzen wie Proteine) spezifische IgE-Ak gebildet werden (s. Abb. 1). Dies erfolgt, indem es unter Beteiligung von Makrophagen und T-Helferlymphozyten zu einer Zelldifferenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen kommt. Die von Plasmazellen gebildeten spezifischen IgE-Antikörper binden primär an den hochaffinen  $Fc_\epsilon R1$  auf der Oberfläche gewebständiger Mastzellen und basophiler Granulozyten [98]. Sie sind in niedriger Konzentration aber auch frei im Blut nachweisbar. Bei erneutem Allergenkontakt wird über eine Quervernetzung zweier benachbarter zytotroper IgE-Ak mit dem Allergen ein Aktivierungsprozess in Gang gesetzt. Dieser Vorgang bewirkt unter anderem die Freisetzung zahlreicher präformierter und in Granula gespeicherter Mediatoren (vor allem Histamin, Leukotriene und Zytokine) aus Mastzellen und Basophilen und wird als anaphylaktische Degranulation bezeichnet [35, 142]. Die freigesetzten Mediatoren lösen innerhalb von Sekunden bis Minuten über Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung der Gefäße und Kontraktur der glatten Muskulatur die gefürchteten Allergiesymptome aus, die über sekundär angelockte Entzündungszellen (Granulozyten, Monozyten) und Blutplättchen unterhalten werden [104].

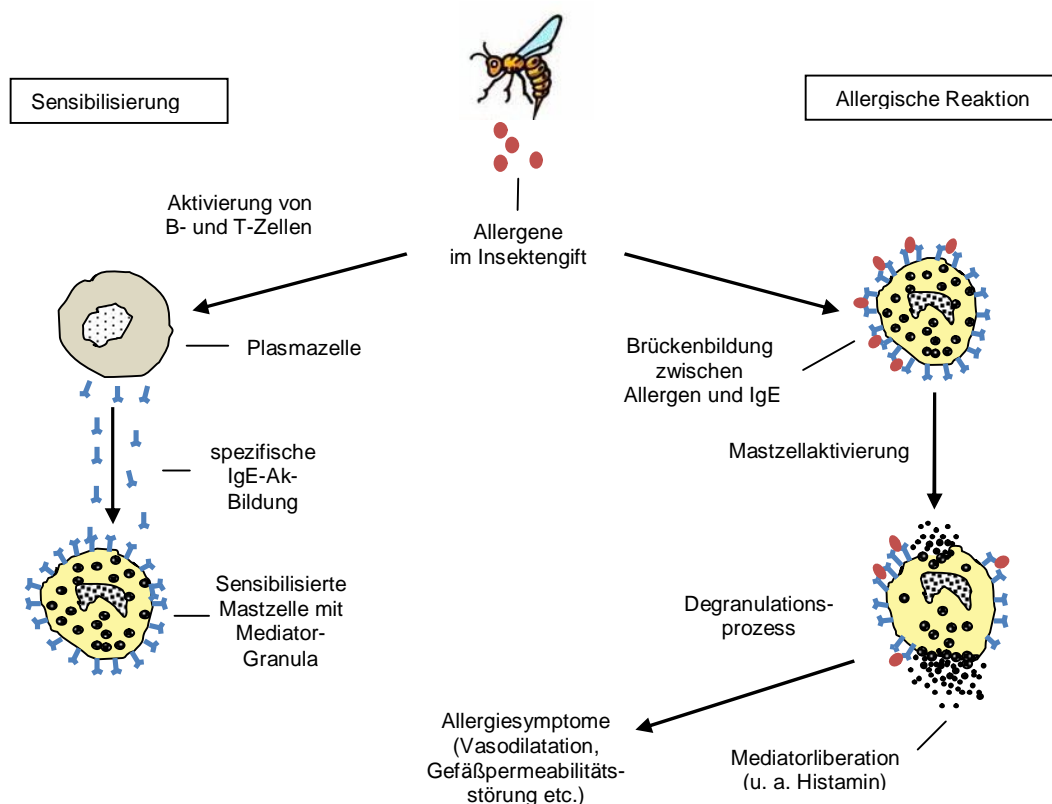
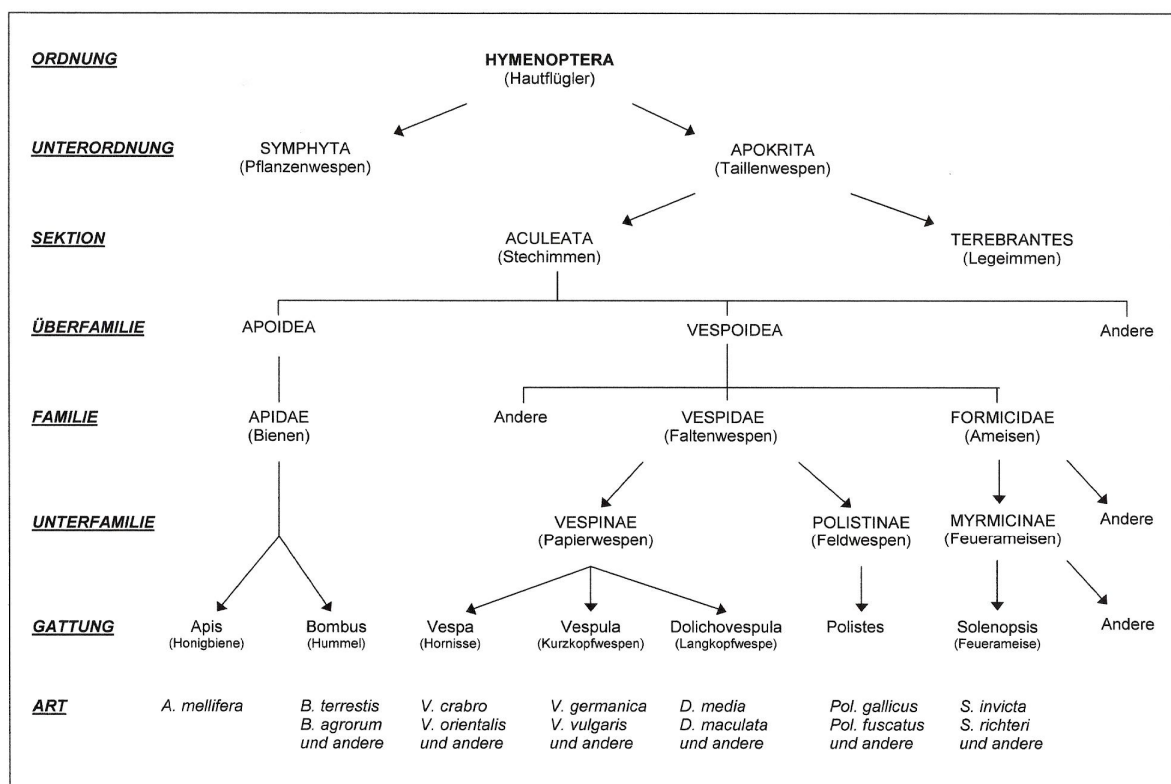


Abb. 1: Pathogenese (vereinfachte Darstellung) der allergischen Soforttyp-Reaktion

*Allergieauslösende Insektenstiche*

Die hauptsächlich für eine Insektenstichallergie verantwortlichen Insekten gehören der Ordnung der Hymenopteren (Hautflügler) an (s. Abb. 2). Die in Mitteleuropa aus allergologischer Sicht relevanten Hymenopteren sind die Honigbiene (*Apis mellifera*, im Folgenden als Biene bezeichnet) und verschiedene soziale Faltenwespen (Vespoidea), wobei vor allem die Gattung der Kurzkopfwespe (*Vespula*, im Folgenden als Wespe bezeichnet) hervorzuheben ist. Diese Wespen, insbesondere die Gemeine Wespe (*Vespula vulgaris*) und die Deutsche Wespe (*Vespula germanica*), stellen aufgrund ihrer enormen Staatsgrößen (bis 10.000 Individuen), ihrer großen Vorliebe für menschliche Nahrungsreste und des häufigen Nestbaus in der Nähe menschlicher Behausungen die Hauptgefahrenquelle für ein Stichereignis dar. Weitaus seltener sind Stiche von Hornissen (Gattung *Vespa*), Langkopfwespen (Gattung *Dolichovespula*) und den in mediterranen Gebieten häufiger vorkommenden Feldwespen (Gattung *Polistes*), da diese Vespiden außerhalb des unmittelbaren Nestbereichs wenig stechfreudig sind und menschliche Nähe meiden. Ebenfalls rar sind Stiche von Hummeln (Gattung *Bombus*), die systematisch der Honigbiene nahe stehen [11, 96, 152]. Den Ameisen, die zum Teil mit einem Wehrstachel versehen sind, wird durch ihr geringes Vorkommen in Mitteleuropa eine bisher nur geringe medizinische Relevanz zugesagt. Sie können aber, wie die in den USA und Australien eingeschleppte Feuerameise (Gattung *Solenopsis*) eine erhebliche Rolle spielen [145].



**Abb.2: Systematische Darstellung verschiedener Hymenopteren [70,104]**

*Bienen- und Wespengift: Zusammensetzung und Kreuzreaktivität*

Beim Stich einer Biene werden etwa 50-100 µg Gift in die Haut injiziert. Da die Wespe ihren Stachel wieder zurückzieht, beträgt die injizierte Giftmenge mit ungefähr 3-10 µg deutlich weniger [72, 117]. Bienen- und Wespengift besteht aus einer komplexen Zusammensetzung an niedermolekularen Verbindungen, Peptiden und großmolekularen Proteinen, die unterschiedliche Anteile (%) am Trockengewicht (Tr.) des Giftes ausmachen (s. Tab. 1). Die Giftbestandteile werden in toxische und allergische Komponenten aufgeteilt [77, 104]. Etliche dieser Komponenten wurden in den letzten Jahren bis Jahrzehnten isoliert, charakterisiert und die dreidimensionale Struktur bestimmt [83]. Hinsichtlich der Allergenität wird des Weiteren zwischen Minor- und Major-Allergenen unterschieden gemäß der Häufigkeit, mit der in Patientenseren IgE-Ak gegen die jeweiligen Allergene zu bestimmen sind [91].

Eine allergische Sensibilisierung bewirken maßgeblich die höher molekularen Proteine, die meist enzymatische Eigenschaften aufweisen. Für die lokale toxische Reaktion und die intensive Schmerzwirkung sind primär Peptide und biogene Amine wie beispielsweise das im Gift vieler Wespen vorkommende Serotonin und Acetylcholin verantwortlich. Den niedermolekularen Verbindungen, vor allem den biogenen Aminen, wird durch ihre vasodilatatorische und permeabilitätssteigernde Wirkung eine Förderung der Giftausbreitung im Gewebe zugesagt [77, 81, 104]. Dabei ist vor allem das Histamin relevant, es macht 1% des Gesamtgewichtes des Bienengiftes und 3-6% des Wespengiftes aus [104]. Die mehr oder weniger stark basischen Peptide Mellitin, Apamin und Kinine bewirken gemeinsam mit den Phospholipasen zytotoxische, hämolytische und neurotoxische Schäden. Das Enzym Hyaluronidase unterstützt diesen Effekt, in dem es interstitielle Hyaluronsäure des Hautbindegewebes abbaut, weshalb es auch als "spreading factor" bezeichnet wird [77]. Für die starke Histaminliberation nach einem Bienenstich hauptverantwortlich ist trotz eines nur geringen Giftanteils (ca. 1% a.Tr.) das Mastzell-degranulierende Peptid (MCD-Peptid) [68].

**Tabelle 1: Zusammensetzung von Bienen- und Wespengift.** Aufgelistet sind wichtige Giftkomponenten und deren Molekulargewicht (MG) in der Einheit Kilo Dalton (kDa).

Molekülklasse	Anteil	Bienengift	Wespengift
<b>Niedermolekulare Substanzen</b> (MG: < 1 kDa)	25-30 %		
Biogene Amine:			
Histamin, Katecholamine		+	+
Serotonin, Acetylcholin		-	+
Kohlenhydrate		+	+
Aminosäuren		+	+
<b>Peptide</b> (MG: 1-5 kDa)	50-60 %	Mellitin Apamin MCD-Peptid Secapin Tertiapin	Kinine Hämolysin Mastoparan Chemotaktisches Peptid
<b>Proteine</b> (MG: > 5 kDa)	15-30 %	Phospholipase A <sub>2</sub> (16-20 kDa) Hyaluronidase (43 kDa) Saure Phosphatase (49 kDa) Api m 6 (8 kDa) Allergen C Esterase α-Glukosidase Proteinase-Inhibitor	Phospholipase A <sub>1</sub> (35 kDa) Hyaluronidase (45 kDa) Antigen 5 (25 kDa) Phosphatasen Protease Cholinesterase DNase Histidindecarboxylase

Das Hauptprotein und gleichzeitig auch Hauptallergen im Bienengift ist das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> (6-12% a.Tr.), wobei auch die Hyaluronidase (1-2%) und die saure Phosphatase (< 1% a.Tr.) Major-Allergene des Bienengifts darstellen [68, 81]. Im Wespengift werden die Phospholipase A<sub>1</sub> (6-14% a.Tr.), die Hyaluronidase (1-3% a.Tr.) und das Antigen 5 (5-10% a.Tr.) zu den Major-Allergenen gerechnet [73, 82, 83, 104]. Ausnahmsweise können auch Peptide wie das Mellitin (40-60% a.Tr.), aufgrund ihrer Tendenz Polymere zu bilden, IgE-Antikörper induzieren, allerdings nur bei einem kleinen Teil der Patienten [81]. Mellitin wird daher zu den Minor-Allergenen gezählt, ebenso wie Allergen C und das Protein Api m 6, sowie das im Wespengift vorkommende Hämolyisin [80, 104].

Die wichtigsten Insektengift-Allergene sind heute geklont und in rekombinanter Form verfügbar (s. Tab. 2). Durch ihre verminderte IgE-Bindung erhofft man sich einerseits eine Optimierung der Diagnostik und andererseits eine protektive zelluläre Immunantwort mit Reduktion der Nebenwirkungen in der Immuntherapie [103, 106].

**Tabelle 2: Rekombinante Insektengiftallergene [106]**

<b>Gift</b>	<b>Allergen</b>		<b>Expression</b>
<b>Biene</b> ( <i>Apis mellifera</i> )	Phospholipase A <sub>2</sub>	(Api m 1)	E. coli
	Hyaluronidase	(Api m 2)	Baculovirus System
	Saure Phosphatase	(Api m 3)	Baculovirus System
<b>Wespe</b> ( <i>Vespula vulgaris</i> )	Phospholipase A <sub>1</sub>	(Ves v 1)	E. coli
	Hyaluronidase	(Ves v 2)	E. coli
	Antigen 5	(Ves v 5)	E. coli

Bei bis zu 50 % der Insektengiftallergiker kann serologisch oder im Hauttest eine Doppelpositivität gegenüber Bienen- und Wespengift nachgewiesen werden. Der Grund hierfür kann eine tatsächliche Doppelsensibilisierung durch Exposition gegenüber verschiedenen Hymenopterengiften sein, oder klinisch irrelevante kreuzreagierende IgE-Ak [62, 65]. Diese Unterscheidung ist für die Wahl des entsprechenden Giftes bei der Immuntherapie entscheidend. Aufgrund großer Ähnlichkeit in der Zusammensetzung und Struktur einzelner Allergene sind vor allem die Vespigifte stark kreuzreaktiv, insbesondere das Gift gleicher und nah verwandter Arten [82]. Des Weiteren kann auch das Gift von Bienen und Hummeln kreuz reagieren. Für eine Kreuzreaktion zwischen Bienen- und Wespengift scheint das Enzym Hyaluronidase hauptverantwortlich zu sein, dessen Aminosäuresequenz in beiden Insektengiften schätzungsweise zu 55 % identisch ist [83]. Hemmversuche (FEIA-Inhibition), bei denen die IgE-Bindung an Bienen- bzw. Wespengift nach Präinkubation des Serums mit jeweils beiden Giften verglichen wird, ermöglichen die Differenzierung zwischen Mehrfachsensibilisierungen und Kreuzreaktionen [121, 146].

## 1.2. Diagnostik der Insektengiftallergie

Die Diagnose einer Insektengiftallergie basiert zunächst auf der Anamnese und wird mittels einer Hauttestung bestätigt. Daneben stellen Laboruntersuchungen eine wesentliche Stütze für eine adäquate Diagnostik und Versorgung allergischer Patienten dar, wobei nur die serologische Bestimmung spezifischer IgE-Ak gegen Bienen- und Wespengift routinemäßig durchgeführt wird. Darüber hinaus stehen zahlreiche aufwendigere Laboruntersuchungen, sog. In-vitro-Verfahren zur Verfügung. Diese sind vor allem in unklaren Fällen (systemische Reaktion trotz ausbleibender Hauttestreaktionen und negativer spezifischer IgE-Werte) sowie bei komplizierten Fragestellungen nötig und/oder als Ergänzung der Routinediagnostik möglich. Bei richtiger Indikation, korrekter Durchführung und kritischer Bewertung stellen sie hilfreiche Bausteine der allergologischen Diagnosefindung dar. Mit ihnen lassen sich in den meisten Fällen direkt oder indirekt allergische Sensibilisierungen nachweisen, die allerdings nur bei korrespondierenden Symptomen klinisch relevant sind [84, 122, 124].

### 1.2.1. Erhebung der Stichanamnese

Für den Großteil der Patienten ist es schwierig, das stechende Insekt zweifelsfrei zu identifizieren. Da die Anamnese jedoch häufig als Goldstandard zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität von Testverfahren herangezogen wird, ist eine präzise Erhebung der Stichanamnese mit Beurteilung der geschilderten körperlichen Beschwerden essentiell. Wichtige Differenzierungsmerkmale zwischen Bienen und Wespen stellen neben der Morphologie (Biene behaarter als Wespe und eher braunfarben) der Stechapparat (Biene verliert ihren Stachel aufgrund starker Widerhaken, Wespe kann ihn zurückziehen), das saisonale Vorkommen (nur Bienenpopulation überwintert, Hauptflugzeit für Bienen von Februar bis Oktober, Wespenpopulationsdichte im August/September hoch und sinkt Oktober/November ab) sowie das Verhalten dar. Wespen ernähren sich hauptsächlich von Blütennektar, Früchten und Baumsäften, weichen aber auch auf andere Quellen wie zuckerhaltiger Getränke und Süßwaren aus. Dies erklärt ihr vermehrtes Vorkommen in der Nähe von Abfallbehältern, Konditoreien und Komposthaufen. Für Bienen hingegen stellen Pollen und Nektar der Blütenpflanzen die Hauptnahrungsquelle dar. Normalerweise reagieren Bienen auf Störungen beim Blütenbesuch mit Fluchtverhalten und Stiche sind in den allermeisten Fällen akzidentiell durch unbeabsichtigte mechanische Beeinträchtigung des Tieres bedingt. Demgegenüber sind Wespen eher angriffsmotiviert und reagieren bei Reizung mit aggressivem Verhalten [11, 50, 96].

Diese Aspekte können eine Identifizierung der Insekten erleichtern und sollten bei jeder sorgfältigen Anamneseerhebung mitberücksichtigt werden. Dabei gilt es vor allem eine besondere Insektenexposition (durch Beruf oder Hobby) und das erhöhte Risiko einer schweren anaphylaktischen Reaktion zu erfassen, die durch Einnahme bestimmter Pharmaka ( $\beta$ -Blocker, ACE-Hemmer), Begleiterkrankungen (Asthma, kardiovaskuläre Erkrankung), höherem Alter (ab etwa 40. Lebensjahr) und stattgehabter schwerer Stichreaktionen (Schweregrad III oder IV) in der Anamnese bedingt sein kann [11, 119].

Zu Berücksichtigen gilt ferner, dass die Ursache einer Allgemeinreaktion nach einem Hymenopterenstich nicht zwangsweise Ausdruck einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion ist, sondern auf allergoiden (nicht direkt IgE-vermittelt), toxischen und psychogenen Mechanismen basieren kann [11, 60].

## 1.2.2. Hauttestung

Ein Hauttest wird bei Verdacht auf Insektengiftallergie vorzugsweise mit kommerziell erhältlichen Bienen- und Wespengiftpräparaten (*Apis mellifera* et *Vespula spec.*), notfalls auch mit anderen Insektengift-Zubereitungen durchgeführt. Dabei sollte die Testung frühestens 2 (besser 4) Wochen nach einer allergischen Stichreaktion erfolgen, um den Hautmastzellen eine Regenerationszeit zu gewährleisten. Zudem sollte der Test möglichst innerhalb eines Jahres durchgeführt werden, da die Hauttestempfindlichkeit mit zunehmendem Abstand zum Stichereignis abnimmt. Mit dem Hauttest gelingt es, eine spezifische allergische Sofortreaktion durch sensibilisierte Gewebsmastzellen in der Haut aufzuzeigen. Hierfür wird verdünntes Hymenoptergift schrittweise in ansteigenden Konzentrationsstufen entweder auf die Haut getropft und mit Hilfe einer feinen Lanzette oberflächlich in die Haut eingestochen (Pricktest) oder mit einer Spritze direkt in die Oberhaut injiziert (Intracutantestung, s. S. 25). Kommt es in Folge dessen zum Auftreten einer eindeutigen Sofortreaktion (Quaddelbildung, Rötung, Juckreiz) gilt der Test anhand der Bestimmung dieser Reaktionsschwelle als positiv und wird beendet (Endpunkttitration). Neben dieser Sofortreaktion ist auch eine Spätreaktion nach etwa 2-6 Stunden möglich. Generell zu beachten ist, dass die relativ hohen Giftmengen beim Hauttest (Pricktest: 0,01–100 µg/ml, Intracutantest: 0,001-1 µg/ml) bereits zu nicht-allergischen toxischen Hautreaktionen führen können und es in seltenen Fällen durch die Giftreexposition zu allergischen Systemreaktionen kommt, weshalb nur in Notfallbereitschaft getestet werden darf. Da der Pricktest weniger sensitiv ist im Vergleich zur Intracutantestung, sollte bei Patienten mit negativen Pricktest-Ergebnissen eine Intracutantestung durchgeführt werden [11, 57, 60, 104, 122].

## 1.2.3. In-vitro-Testverfahren

### *Bestimmung von IgE-Antikörpern*

Die Messung giftspezifischer IgE-Antikörper dient seit über drei Jahrzehnten dem Nachweis von Soforttypsensibilisierungen. Sie erfolgt routinemäßig bei allen Personen mit Verdacht auf eine Insektengiftallergie, besonders bei Diskrepanzen zwischen Hauttest und Anamnese oder wenn Hauttests nicht in Frage kommen (Hautveränderungen im Testbereich, Urticaria factitia, Kleinkinder). Durch das fehlende Patientenrisiko gegenüber dem Hauttest und auf Grund der einfachen Handhabung war und ist die spezifische IgE-Bestimmung eines der beliebtesten Standardmessverfahren in der Allergiediagnostik [104, 124].

Der erste Nachweis spezifischer IgE-Antikörper bei Insektengiftallergie gelang Reisman et al. [123] und die bekannteste Methode zur Bestimmung von spezifischem IgE ist der 1973 von Wide [154] entwickelte und früher kommerziell angewandte Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST). Dieser wird heute durch empfindlichere vollautomatisierte Verfahren ersetzt. Die moderneren Systeme (z. B. ImmunoCAP®, Immulite 2000®) unterscheiden sich bezüglich der Antigenbindung und dem Detektionsprinzip (s. 2.2.3., S. 25). Anstelle der im RAST verwendeten Radioisotope kommen Enzyme oder Fluoreszeine als Marker für die im Serum vorhandenen anti-IgE-Ak zum Einsatz [121, 124].

Wie die Hauttestreaktionen sind auch die Serumspiegel an spezifischem IgE zeitabhängig. Bereits innerhalb der ersten beiden Wochen nach einer systemischen Stichreaktion können giftspezifische IgE-Ak detektiert werden [57, 126]. Sie sollten dennoch frühestens zwei Wochen und möglichst noch im ersten Jahr nach einer allergischen Stichreaktion bestimmt werden, da die Titer innerhalb dieses Zeitfensters am höchsten sind und Rückschlüsse auf das kausale Insekt erlauben. Im Falle von kaum oder nicht messbaren IgE-Werten sollten die Messungen zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden, da die Spiegel gewöhnlich binnen einiger Wochen stark ansteigen um im Laufe von Monaten und Jahren langsam wieder absinken, wobei diesbezüglich große individuelle Unterschiede bestehen [104, 119, 128].

### *Mediatorbestimmungen*

Das fast ausschließlich von Mastzellen produzierte Enzym Tryptase wird als zentraler Mediator freigesetzt, seine Serumspiegel korrelieren mit der Gesamtmastzellzahl sowie deren Grad der Aktivierung. Erhöhte Tryptase-Werte sind im Serum von Patienten nach Überempfindlichkeitsreaktionen (durch Insektenstiche, Medikamente, Nahrungsmittel, etc. verursacht) oder bei Patienten mit Mastozytose nachweisbar. Im Gegensatz zum Histamin wird die Tryptase langsamer abgebaut (Serumhalbwertszeit ca. 2 Stunden) und ist noch 3 bis 6 Stunden nach Schockreaktionen nachweisbar, wodurch sie retrospektiv bei der differentialdiagnostischen Abklärung einer Überempfindlichkeit unklarer Genese herangezogen werden kann [125]. Tryptase wird in vitro mit Hilfe eines Enzymimmunoassays im peripheren Blut (Serum) von Patienten bestimmt, wobei der als normal anzusehende obere Grenzwert für Tryptase bei 10 µg/L liegt [129]. Eine erhöhte basale Serumtryptase kann als Risikofaktor für eine Insektengiftallergie angesehen werden (118). Zudem sind erhöhte Werte nach tödlichen anaphylaktischen Reaktionen häufig auch postmortal nachzuweisen und können Aufschluss über die Todesursache geben [120].

Um die Einbindung von eosinophilen Granulozyten bei allergischen Entzündungsprozessen zu erfassen, kann auch die Bestimmung des eosinophilen kationischen Proteins (ECP) eingebracht werden. Dieser Parameter hat jedoch eine weniger bedeutende Relevanz bei Soforttyp-Reaktionen und hat primär bei Spättyp-Reaktionen (24 h nach Allergenprovokation) eine größere Bedeutung. Der obere Normalwert für ECP liegt bei 12,5 µg/L, wobei zu beachten ist, dass für eine korrekte ECP-Bestimmung eine standardisierte Probenvorbereitung essenziell ist [129]. Zu betonen ist weiterhin, dass erhöhte Tryptase- und/oder ECP-Spiegel nur durch Hinzuziehen eines Basalwertes interpretiert werden können, der vor einer geplanten Allergenprovokation ermittelt werden sollte [125].

### *Zelluläre Testmethoden*

Um einen allergischen Status zu bestätigen, wird in ausgewählten Fällen die allergeninduzierte Freisetzung präformierter oder de novo synthetisierter Mediatoren aus Leukozyten bestimmt.

Der Histamin-Freisetzungstest misst die allergeninduzierte Histamin-Ausschüttung aus basophilen Granulozyten. Hierbei wird das Vollblut oder bereits gewaschene periphere Leukozyten von Patienten mit verschiedenen Allergenverdünnungen versetzt und das freigesetzte Histamin fluorometrisch oder mittels Immunoassays bestimmt. Dabei wird das freigesetzte Histamin prozentual auf den durch Lyse im Parallelansatz ermittelten gesamten Histamin-Gehalt der Zellen bezogen. Zur Bestimmung der spontanen Histamin-Freisetzung wird eine Leerprobe (mit Pufferzusatz) mitgeführt, die Inkubation der Zellen mit anti-IgE-Ak dient als Kontrollansatz [104, 116, 124].

Obwohl auch andere Botenstoffe aus Effektorzellen bestimmt werden können, sind neben Histamin bisher primär die Sulfido-Leukotriene zur Allergiediagnostik genutzt worden [124]. Mit dem zellulären Antigen-Stimulationstest (CAST), der auch als Leukotrien-Freisetzungstest bekannt ist, wird die Freisetzung von Sulfidoleukotrien LTC<sub>4</sub> und dessen biologisch weniger aktive Metabolite LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> aus Leukozyten, insbesondere aus Basophilen gemessen. Hierfür werden sedimentierte Leukozyten des Patienten zunächst mit dem Zytokin Interleukin 3 (IL-3) vorstimuliert und anschließend mit Insektengiftallergenen inkubiert. Die resultierende Leukotrien-Liberation wird mit Hilfe eines ELISA-Tests quantitativ bestimmt. Zur Ergebnisbeurteilung werden neben einer Negativkontrolle (z.B. Stimulation mit Puffer) Positivkontrollen (z.B. Stimulation mit Anti-Fc<sub>ε</sub>-RI) für die IgE-vermittelte Freisetzung bzw. weitere Kontrollen (z.B. C5a, fMLP) zur Untersuchung anderer Stimulationsmechanismen mitgeführt [28, 71, 124].

### 1.3. Therapie der Insektengiftallergie

#### Notfalltherapie

Schwere Lokalreaktionen nach einem Insektenstich können durch Hochlagerung und Kühlung der betroffenen Körperteile und gegebenenfalls mit oralen Antihistaminika und Kortikosteroiden behandelt werden [122]. Die Therapie einer anaphylaktischen Reaktion richtet sich neben Allgemeinmaßnahmen (Unterbrechung der Allergenzufuhr, Überwachung der Vitalfunktionen, Lagerung) nach deren Schweregrad, wobei folgende Maßnahmen gemäß Tabelle 3 indiziert sind:

**Tabelle 3: Notfallmaßnahmen zur Behandlung anaphylaktischer Reaktionen nach [3].**

Grad	Klinik	Therapie
I	Leichte Allgemeinreaktionen mit kutanen Reaktionen (Ödem, Erythem, Urtikaria, Pruritus), Kopfschmerzen, Unruhe	Antihistaminika, Sauerstoffzufuhr, Kreislaufüberwachung bis zur Besserung
II	Zusätzlich: leichte Dyspnoe, Puls- und Blutdruckveränderungen, Übelkeit, Erbrechen, Stuhl- und Urindrang	Zusätzlich: Volumensubstitution Glukokortikoide
III	Zusätzlich: Schock (schwere Dyspnoe, Bronchospasmus, Blutdruckabfall, Blässe), Bewusstseinsintrübung	Zusätzlich: Adrenalin, Theophyllin
IV	Kreislauf- und Atemstillstand	Kardiopulmonale Reanimation

Alle Patienten mit allergischen Reaktionen nach einem Insektenstich müssen mit einem Notfallset ausgestattet werden, das während der Flugphase der Insekten stets mit sich zu führen ist. Das Set beinhaltet ein orales Antihistaminikum, ein orales Kortikosteroid sowie einen Adrenalin-Autoinjektor (oder Adrenalinaerosol), wobei die Medikamente direkt nach einem Stich prophylaktisch eingenommen werden sollten und das Adrenalin erst beim Auftreten systemischer Reaktionen zu applizieren ist. Des Weiteren sollten die Patienten einer weiterführenden Diagnostik zugeführt werden und bei gesicherter Insektengiftallergie über die Möglichkeit einer spezifischen Immuntherapie aufgeklärt werden [122, 119].



### *Die Spezifische Immuntherapie (SIT) bei Insektengiftallergie*

Die SIT mit Allergenen, früher Hyposensibilisierung genannt, gilt als einzige kausale Therapieform IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen, indem sie in die grundlegenden immunologischen Mechanismen allergischer Krankheitsbilder eingreift [85]. Durch sie entsteht infolge zahlreicher immunologischer Veränderungen eine über die Therapiedauer anhaltende Toleranz gegen die verwendeten Giftallergene. Dem raschen Anstieg allergenspezifischer und blockierender IgG-Ak unter SIT kommt auch heute noch, wenn auch nicht im selben Maß wie früher, ein wesentlicher Stellenwert zu [25]. Von zentraler Bedeutung ist allerdings eine Verschiebung der Immunantwort: eine dominante T-Helfer-Typ-2-Zellen (TH2)-Antwort wird zugunsten einer stärkeren TH1-Antwort verschoben und das natürliche Überwiegen der TH1-Zellen wird wiederhergestellt. Die Induktion einer IL-10-Produktion scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen [9]. Außerdem werden Effektorzellen wie Mastzellen und basophile bzw. eosinophile Granulozyten in ihrer Funktion gehemmt [114].

Die Indikation zur SIT ergibt sich aus Anamnese und dem gleichzeitigen Nachweis einer IgE-vermittelten Sensibilisierung (positive Hauttests und/oder spezifische IgE-Ak). Klinisch stumme Sensibilisierungen ohne Allergie-Symptome, die mit einem Insektenstich in Verbindung zu bringen sind sowie verstärkte Lokalreaktionen stellen keine Grundlage für eine SIT dar [85, 119].

Die Therapie wird stationär im üblichen Schnellverfahren (konventionelle Rush-SIT) mit wässrigen standardisierten Allergenextrakten oder als Depotformulierung eingeleitet, um den Patienten schnellstmöglich einen Schutz zu gewährleisten. Dabei wird den Patienten täglich das jeweilige Insektengift gemäß diverser Steigerungsempfehlungen subkutan in den Oberarm injiziert, bis nach einigen Tagen die Maximaldosis von 100 µg erreicht ist. Beim Ultra-Rush-Verfahren wird dieses Ziel bereits in zwei Tagen angestrebt, wobei neben dem Vorteil der Zeitersparnis das Risiko allergischer Nebenwirkungen leicht erhöht ist. Anschließend wird die Therapie ambulant mit der Erhaltungsdosis von 100 µg des Giftextrakts fortgesetzt, und der Injektionsabstand wird auf vier Wochen gesteigert. Die Einleitungsphase der SIT kann daneben ambulant erfolgen, bei der die Dosis in wöchentlichen Abständen bis zum Erreichen der Erhaltungsdosis (in etwa 3-4 Monaten) gesteigert wird [85, 122].

Die SIT ist bei der Hymenoptereingiftallergie eine hocheffektive Behandlung und führt mit Bienengift in ca. 80% und mit Wespengift in über 95% der Patienten zu einem vollständigen Impfschutz. Unerwünschte Begleitreaktionen der SIT sind mit bis zu 40% nicht selten und werden häufiger bei Bienen- als bei Wespengiftallergikern beobachtet. Da sie gewöhnlich einmalig auftreten und mild verlaufen ist eine Unterbrechung der Therapie nicht notwendig, da ein rascher Aufbau eines Schutzes für den Patienten unerlässlich ist [105, 122]. Die Dauer der SIT sollte im Regelfall bei Patienten mit Insektengiftallergie 3-5 Jahre betragen, in speziellen Ausnahmefällen (z. B. Mastozytose) kann sogar eine lebenslange Therapie erforderlich sein [118].

Da es derzeit keine allgemein akzeptierten Laborparameter zur Überprüfung des Therapieerfolgs bzw. -versagens der SIT gibt, müssen die Ergebnisse von Stichprovokation und akzidentellem Stich (Feldstich) zu deren Beurteilung herangezogen werden [119, 130]. Da diese jedoch mit einer lebensgefährlichen Anaphylaxie einhergehen können und von vielen Patienten gefürchtet werden, sind weitere in-vitro Verfahren wünschenswert, deren Aussagen genau so zuverlässig sind wie die der zuvor erwähnten in-vivo Testungen.

## 1.4. Der Basophilenaktivierungstest

### 1.4.1. Grundlagen

Ein weiterer in-vitro Test auf zellulärer Ebene ist der in dieser Arbeit näher untersuchte Basophilenaktivierungstest (BAT). Im Zentrum dieses Allergen-Stimulationstests stehen die basophilen Granulozyten, die mit etwa 0-2% einen relativ geringen Anteil der Leukozyten im peripheren Blut ausmachen. Basophile Granulozyten sind multifunktionelle Effektorzellen, die neben den Mastzellen eine primäre Rolle bei IgE-vermittelten allergischen Reaktionen (Asthma, Urtikaria, anaphylaktischer Schock) spielen. Beide Zellarten entstehen aus CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen. Das wichtigste Zytokin für die Differenzierung von Basophilen ist IL-3. Da sie im Gegensatz zu den gewebeständigen Mastzellen frei im Blut zirkulieren, spielen sie im Rahmen der Allergiediagnostik eine zentrale Rolle [49, 150].

Eine Aktivierung basophiler Granulozyten bewirkt neben der Neubildung und Sekretion diverser Mediatoren auch strukturmorphologische Veränderungen in der Basophilen-Plasmamembran, so z.B. eine erhöhte Expression verschiedener Oberflächenmoleküle. Einige dieser so genannten Aktivierungsmarker sind schon auf ruhenden Basophilen deutlich nachweisbar, andere hingegen werden erst im Rahmen der (allergeninduzierten) Aktivierung hochreguliert oder zeigen eine verminderte Oberflächenexpression nach Aktivierung [14, 55]. Die am häufigsten herangezogenen Marker für die Bestimmung einer in-vitro Basophilenaktivierung sind bisher die Oberflächenproteine CD63 und CD203. Beim BAT werden diese Oberflächenantigene, je nach Testverfahren, mit spezifischen fluoreszierenden Ak markiert und durchflusszytometrisch detektiert, nachdem zu untersuchendes Blut mit wichtigen Allergenen versetzt wird [17, 32, 40, 115].

Mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen anhand ihrer Größe, Granularität und ihrer Oberflächenproteine klassifizieren (s. 2.3.4, S. 31). Hierbei gelingt es basophile Granulozyten, trotz ihrer niedrigen Konzentration im Blut durch eine geeignete Antikörpermarkierung zu charakterisieren, phänotypische Veränderungen zu dokumentieren und somit eine allergische Immunantwort zu quantifizieren [54, 86, 108, 131].

## 1.4.2. Die Oberflächenantigene CD63 und CD203c

### CD63

Das CD63-Antigen, das auch als LIMP-1 (lysosome integral membrane protein 1) oder LAMP-3 (lysosomal associated membraneglycoprotein 3) bezeichnet wird [8], ist ein Membranglykoprotein und scheint identisch zu sein mit Granulophysin, welches sich in spezifischen Granula (d-Granula) von Thrombozyten [110] befindet. Zu dem konnte seine Analogie mit den Melanom-assoziierten Antigenen ME491, MLA1 (melanoma-associated antigen) [97] und NGA (neuroglandulare antigen) [27] nachgewiesen werden.

CD63 ist Mitglied der Transmembran-4-Superfamilie (TM4SF), der auch die Moleküle CD9, CD37 und CD53 angehören [74]. Diese integralen Membranproteine, auch Tetraspanine genannt, werden mit Ausnahme von Erythrozyten vermutlich von allen Zellen exprimiert. Sie kommen in der Plasmamembran und/oder in Membranen zytoplasmatischer Organellen vor. Einige Tetraspanine werden von vielen Zellen exprimiert, andere hingegen zeigen ein eingeschränktes Verteilungsmuster in dem sie ausschließlich in bestimmten Zellen oder Kompartimenten gefunden werden [15].

Strukturell zeichnen sich die Tetraspanine durch vier Transmembrandomänen, zwei ungleich große extrazelluläre Schleifen (extracellular loops) ECL1 und ECL2, und den kurzen, jeweils zytoplasmatisch lokalisierten Amino- und Carboxyterminus aus. Dabei wird dem großen extrazellulären Bereich ECL2 eine wesentliche Rolle hinsichtlich der funktionellen Besonderheiten der einzelnen Tetraspanine zugesagt [141].

Hervorzuhebendes Merkmal der Tetraspanine ist ihre Fähigkeit multimolekulare Komplexe, sog. Tetraspanin-Netze auf der Zelloberfläche zu formen [15]. Aufgrund ihrer organisierenden Eigenschaften, werden sie als „molecular facilitators“ angesehen [92]. Dabei scheinen die Tetraspanine funktionell an unterschiedlichen biologischen Prozessen wie Zellaktivierung, Zelladhäsion und Signaltransduktion [52, 92, 88] beteiligt zu sein. Sie beeinflussen maßgeblich die Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen, womit sie unter anderem für die Tumorforschung von besonderem Interesse sind [15, 95].

Ursprünglich in Melanomgewebe [7] nachgewiesen, konnte das CD63-Antigen desweiteren in verschiedenen Gewebearten zahlreicher Organe wie beispielsweise im Epithel des Gastrointestinaltrakts und Endometriums detektiert werden. Es wird sowohl von gesunden, als auch von tumorös veränderten Zellen exprimiert und soll als Biomarker für das Erkennen von Tumorstadien herangezogen werden können [75, 89, 112].

Das Molekulargewicht von CD63 variiert zwischen 30-60 kD, wobei der Proteinkern ein Gewicht von 25 kD aufweist. Die luminal gelegene ECL2-Domäne besteht aus 95 überwiegend hydrophilen Aminosäuren. Dieser Molekülbereich beinhaltet drei N-Glykosylierungsstellen, die offenbar für die Heterogenität von CD63 verantwortlich sind [75, 97]. Man vermutet, dass diese stark glykosylierte Domäne die intrazellulären Granulamembranen vor enzymatischer Verdauung schützt [52]. CD63 kann mit einer Vielzahl von Bindungspartnern wie beispielsweise  $\beta_1$ -Integrinen sowie anderen Tetraspaninen (CD9, CD81) große Komplexe auf der Plasmamembran formen [10]. Obwohl die exakte physiologische Rolle von CD63 noch ungeklärt ist, nimmt es vermutlich als integrales Adaptermolekül eine besondere Stellung ein. Im Rahmen der Zelladhäsion spielt es unter anderem eine wichtige antimetastatische Rolle und reduziert das Tumorwachstum [138]. Ein Mangel von CD63 soll mit dem Hermansky-Pudlak Syndrom, einer seltenen Erbkrankheit assoziiert sein [6] und bei Patienten mit Mastozytose wird CD63 deutlich höher exprimiert [47].

CD63 wird von verschiedenen Zellen des hämatopoetischen Systems sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Inneren der Zellen exprimiert, jedoch unterschiedlich stark. Hierzu zählen Monozyten [88], Mastzellen [47], Thrombozyten [109] und Granulozyten [143]. Intrazellulär kann CD63 in verschiedenen Zellorganellen, insbesondere in lysosomalen Membranen nachgewiesen werden, für die es ein spezifisches cytoplasmatisches Zielsignal aufweist [97]. Des Weiteren kommt es in Endosomen, Weibel-Palade-Körperchen [153], und in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten vor [64].

In basophilen Granulozyten ist CD63 hauptsächlich in den Granulamembranen verankert und kommt auf der Zellmembran nicht bzw. nur vereinzelt (ca. 5%) vor. Erst bei einer Zellaktivierung kommt es im Zuge der Fusion zwischen Granula- und Zellmembran zu einer bis zu 100-fach erhöhten Expression von CD63 auf der Membranoberfläche (s. Abb. 3) [86]. Das Markieren von CD63 mittels geeigneter monoklonaler Antikörper ermöglicht unter Anderem quantitative Aussagen über eine Expressionszunahme, wodurch CD63 als Aktivierungsmarker für Basophile herangezogen werden kann [1, 24, 33, 86].

### *CD203c*

Ein weiteres phänotypisches Merkmal basophiler Granulozyten ist die Expression von CD203c, das auch unter den Namen PD-I $\beta$ , PDNP3 und gp130<sup>RB13-6</sup> bekannt ist. Dieses Oberflächenantigen ist ein multifunktionales Ektoenzym und gehört als ENPP3 zur Gruppe der Ecto-Nucleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (ENPPs). Ebenfalls zu dieser Familie gehören bisher ENPP1 (plasma cell membrane glykoprotein PC-1) und ENPP2 (PD-Ia), das auch als Autotaxin bekannt ist, sowie die Moleküle ENPP4 und ENPP5 [21, 26, 56].

Bei den Mitgliedern ENPP1-3 handelt es sich um integrale Transmembranproteine vom Typ II. Sie hydrolysieren die Phosphodiester- und Phosphosulfatbindungen von Nucleotiden und Nucleotidderivaten unter der Bildung von Nucleosidmonophosphaten. Zu den Substraten der Enzyme zählen unter anderem cAMP, NAD<sup>+</sup> und Diadenosinpolyphosphate. Die Enzyme ENPP1-3 kennzeichnet ein hoher Homologiegrad hinsichtlich ihrer extrazellulären Struktur, wohingegen die cytosolischen und transmembranen Anteile Unterschiede aufweisen. Jedes Molekül besteht aus einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus, einem transmembranen Bereich dem zwei somatomedinähnliche Domänen folgen, der Region mit katalytischer Funktion und einem nukleaseähnlichen Abschnitt am carboxyterminalen Ende. Dabei liegt der größte Teil der Aminosäuren im extrazellulären Raum vor und beinhaltet das aktive Zentrum des Enzyms [4, 56].

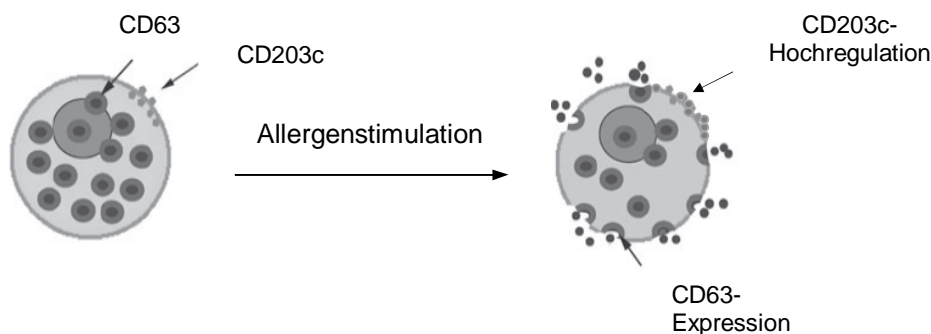
CD203c ist ein aus 875 Aminosäuren aufgebautes und 60 Kilobasen umfassendes Protein, dessen Gen auf Chromosom 6q22 lokalisiert ist [78]. Das erstmals aus neuroektodermalen Rattenzelllinien nachgebildete CD203c Molekül [26] konnte als humanes CD203c sowohl in Uterus und Prostata als auch in Gliomen nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich bei Patienten mit Kolon- und Gallengangskarzinomen [156] eine hohe CD203c-Zellexpression dieser Gewebe. Bei diesen Karzinompatienten konnten erhöhte Serumwerte einer löslichen CD203c-Komponente gemessen werden, weshalb CD203c als möglicher Tumormarker diskutiert wird [156].

Über die biologische Rolle von CD203c ist wenig bekannt. Auf reifen Basophilen hat es möglicherweise eine adhäsive Funktion und es scheint darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung von CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen zu reifen Basophilen und Mastzellen zu spielen [19, 21].

Im hämatopoetischen System wird CD203c ausschließlich von reifen Basophilen und Mastzellen sowie deren CD34<sup>+</sup> Vorläuferpopulation exprimiert. Diese Zellen können durch eine Ak-Markierung von CD203c mit dem monoklonalen Ak 97A6 von allen anderen hämatopoetischen Zellreihen abgegrenzt werden, womit CD203c als linienspezifisches Oberflächenantigen angesehen werden kann. Dabei wird es sowohl in der Plasmamembran als auch in zytoplasmatischen Kompartimenten apikal exprimiert [20, 21, 55]

Darüber hinaus ist CD203c ein Molekül, das an der Aktivierung von basophilen Granulozyten mitbeteiligt ist. Es wird sowohl von ruhenden, als auch von aktivierten Basophilen exprimiert, wobei es im Zuge einer Basophilenaktivierung zu einer deutlichen Erhöhung der CD203c-Expression auf der Zelloberfläche kommt (s. Abb. 3) [12, 21, 115].

Aufgrund dieser Beobachtungen und der zuvor erwähnten Linienspezifität für basophile Granulozyten stellt CD203c einen geeigneten und aussichtsreichen Marker für die Bestimmung einer Basophilenaktivierung dar [12, 16, 63, 115].



**Abbildung 3: Expression von CD63 und CD203c (vereinfachtes Prinzip) [42].** In ruhenden Basophilen ist CD63 an intrazelluläre Granula gebunden, CD203c wird auf der Zelloberfläche exprimiert. Aktivierte Basophile exprimieren CD63 in hoher Dichte auf der Zelloberfläche, CD203c wird ebenfalls hochreguliert.

## 1.5. Zielsetzung der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen, das Ermitteln des Stellenwerts des Basophilenaktivierungstests (BAT) bei Bestimmung von CD63 sowie bei Detektion von CD203 und zum anderen der Vergleich dieser beiden BAT-Methoden bei Patienten mit Hymenopterenengiftallergie.

Das Patientenkollektiv und die Untersuchungsergebnisse sollten dargestellt, analysiert und mit der internationalen Literatur verglichen werden. Dabei standen folgende Aspekte im Vordergrund:

- Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des BAT durch Bestimmung von CD63 bei Patienten mit anaphylaktischer Hymenopterenstichreaktion.
- Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des BAT durch Bestimmung von CD203c bei Patienten mit anaphylaktischer Hymenopterenstichreaktion.
- Vergleichende Darstellung der Höhe einer prozentualen Basophilenaktivierung im CD63- und CD203c-BAT und ermitteln von Korrelation und Übereinstimmung der Ergebnisse in beiden BAT-Ansätzen.
- Vergleich des CD63- und CD203c-BAT mit der Anamnese und den Befundergebnissen herkömmlicher Methoden der Allergiediagnose bei Hymenopterenengiftallergie wie Hauttestung und spezifischer IgE-Bestimmung.
- Beurteilung der Aussagequalität des CD63- und CD203c-BAT in diagnostischen Grenzfällen und deren Bedeutung bei der Indikationsstellung zur spezifischen Immuntherapie.

Zudem sollte in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, in wie weit sich Sensitivität und Spezifität des BAT durch Bestimmung von CD203c anstelle von CD63, speziell bei Insektengiftallergikern, unter den Bedingungen einer nahezu identischen Versuchsdurchführung unterscheiden.

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1. Patienten und Kontrollpersonen

42 Patienten (23 Frauen und 19 Männer) im Alter von 9 bis 77 Jahren der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München wurden untersucht, die anamnestisch den Verdacht auf eine Insektengiftallergie nahe legten. Die Patienten waren im Mittel 45 ( $\pm$  17) Jahre alt.

Als Kontrollgruppe dienten 25 Personen (14 Frauen und 11 Männer) im Alter von 22-66 Jahren, bei denen allergische Symptome nach einem Insektenstich nicht bekannt waren. Das Durchschnittsalter betrug 36 ( $\pm$  13) Jahre.

Neben der Anamneseerhebung dienten die Hauttestung (i.c.-Test) und die Bestimmung der insektengiftspezifischen IgE-Antikörper als Verfahren der Allergie-Standarddiagnostik, deren Ergebnisse zur Diagnosestellung herangezogen wurden. Auf einen Hauttest wurde bei den Kontrollpersonen wegen der Gefahr einer möglichen Sensibilisierung gegen die Insektengifte verzichtet.

Als zusätzliche in-vitro Verfahren wurden bei den Patienten und Personen der Kontrollgruppe im Rahmen des BAT die beiden Testansätze CD63- und CD203c-BAT zur Bestimmung der prozentualen Basophilenaktivierung durchgeführt.

Die Blutentnahme für die Durchführung des BAT erfolgte nach Einwilligung der Patienten und Kontrollpersonen gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München. Hierfür wurde ihnen unmittelbar vor der Durchführung des BAT venöses Blut mittels gerinnungshemmender Lithium-Heparin Monovetten (s. S. 28) entnommen und binnen 4 Stunden weiterverarbeitet.

Keiner der Patienten und Kontrollpersonen hatte mindestens 2 Wochen vor der Blutentnahme für den BAT Glukokortikosteroide eingenommen, Antihistaminika wurden mindestens 48 Stunden vorher abgesetzt. Zudem konnten akute Infekte, chronische Entzündungen oder Typ I Allergiesymptome zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei allen Patienten ausgeschlossen werden.

## 2.2. Standarddiagnostik der Hymenopterenngiftallergie

### 2.2.1. Schweregrad der anaphylaktischen Stichreaktion

Anhand der geschilderten klinischen Symptome der Patienten nach einem Insektenstich und/oder mit Hilfe von Fremdanamnesen wurde der Schweregrad der Stichreaktion ermittelt gemäß der Einteilung nach Ring und Messmer (s. Tab. 4). Bei mehreren und unterschiedlich schwer verlaufenden Stichreaktionen in der Anamnese eines Patienten erfolgte die Zuteilung zum höchsten eruierten Schweregrad.

**Tabelle 4: Schweregradeinteilung der anaphylaktischen Reaktion nach Ring und Messmer [127]**

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

\* eine Beteiligung aller Organsysteme ist nicht obligat



### 2.2.2. Hauttestung auf Hymenopterengift

Die Hauttestung erfolgte ausschließlich in der Allergieambulanz der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein und wurde frühestens 4 Wochen nach einem Stichereignis durchgeführt. Hierfür wurde den Patienten am volaren Unterarm mit einer Tuberkulinspritze intrakutan 0,02 ml Bienen- und Wespengift (Venomil® Bencard, München, Deutschland und Reless® ALK-Scherax, Hamburg, Deutschland) in steigenden Konzentrationen injiziert. Die Anfangskonzentration von 0,0001 µg/ml wurde bei negativem Hautbefund in 15 Minuten Abständen um jeweils eine Zehnerpotenz bis maximal 0,1 µg/ml erhöht. Kam es zum Auftreten einer eindeutigen Sofortreaktion (Quaddelbildung über 3 mm mit umgebendem Erythem von mind. 10 mm) galt der Test als positiv und wurde für das jeweilige Gift beendet (Endpunkttitration). Als Positivkontrolle wurde parallel eine 0,1% Histaminlösung (Allergopharma, Reinbek, Deutschland) und als Negativkontrolle 0,9% Kochsalzlösung (Allergopharma, Reinbek, Deutschland) gespritzt.

Eine Medikation mit Antihistaminika oder Glukokortikosteroiden mindestens 2 Woche vor dem Hauttest wurde von allen Patienten verneint.

### 2.2.3. Bestimmung spezifischer IgE- Antikörper gegen Hymenopterengift

Das Blut der Patienten und Kontrollpersonen wurde auf spezifische IgE-Antikörper gegen Bienen- und Wespengift hin untersucht und diese quantitativ bestimmt. Hierzu diente ein Festphase-Fluoreszenzenzymimmunoassay (FEIA), das ImmunoCAP® FEIA System (Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Schweden) sowie Bestimmungen mit Immulite 2000-Allergie (DPC Bühlmann, Salzburg, Österreich), einem Flüssigphase-Chemilumineszenz-Assay. Ziel und Prinzip beider Testverfahren ist es, die Bindung von im Patientenserum vorhandener IgE-Antikörpern an das jeweilige Allergen nachzuweisen.

Für die Probengewinnung wurde venöses Blut mit Serum Monovetten (7,5 ml Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen und zentrifugiert (4° C, 4000g, 10 Min). Das gewonnene Serum wurde am selben Tag untersucht oder bis zur Aufarbeitung portionsweise (150 µl) bei -20° C tiefgefroren.

- *ImmunoCAP-FEIA*

Das insektengiftspezifische Allergen ist kovalent an Immuno-CAPs (feinporige Celluloseschwämmchen mit großer Oberfläche und hoher Allergenbindungskapazität) gebunden. Die im Patientenserum enthaltenen spezifischen IgE-Antikörper bilden bei Kontakt mit dem Allergen einen Antigen-Antikörper-Komplex. Unspezifische IgE-Antikörper werden nach 30 Minuten abgewaschen und enzymmarkierte (β-Galaktosidase) Antikörper gegen IgE hinzugefügt, die sich an diesen Komplex aus Allergen und spezifischem IgE anlagern. Nach einer Inkubationszeit (150 Min) wird überschüssiges ungebundenes Enzym-Anti-IgE abgewaschen und es folgt die Inkubation mit einem Entwickler-Reagenz (4-Methylumbelliferyl-β-D-Galaktosid als Fluoreszenz) für 10 Minuten. Nach Beendigung der Reaktion mittels Stopp-Lösung (Natriumcarbonat) kann die Fluoreszenz gemessen werden. Je höher die Fluoreszenzintensität, desto mehr spezifisches IgE ist in der Probe enthalten.

- *Immulate 2000-Allergie*

Die Reaktion bei diesem Test findet in einer flüssigen Phase statt: Spezifisches IgE aus der Patientenprobe bindet an Allergene, die kovalent an eine lösliche Polymer/Copolymer-Matrix gebunden sind, die wiederum mit einem Ligand (Biotin) konjugiert ist. Auch die Allergene binden an eine anti-Ligand (Streptavidin) beschichtete Festphase, die zur Trennung dient. Durch Waschen wird ungebundenes Material entfernt. Danach werden mit alkalischer Phosphatase markierte Anti-IgE Sekundäntikörper zugegeben, die während der Inkubationszeit (30 Min) mit den IgE-Molekülen Komplexe bilden. Nach erneutem Waschen wird luminogenes Substrat (Adamantyl-dioxetanphosphat) zugegeben und das Lumineszenzsignal gemessen. Je mehr IgE sich in der Patientenprobe befindet, desto mehr Komplexe entstehen und desto größer die gemessene Lumineszenz.

Mit Hilfe von Eichkurven werden die korrespondierenden Konzentrationen an spezifischem IgE in die Einheit kU/L umgewandelt und die Werte den zugehörigen Testsystem-Klassen zugeteilt (s. Tab. 5 und 6).

**Tabelle 5: Spezifische IgE-Klasseneinteilung gemäß CAP-FEIA-System**

Spezifische IgE- CAP- Klasse	Konzentration in kU/L	Beurteilung
0	< 0.35	negativ
1	0.35 - 0.70	grenzwertig positiv
2	0.70 - 3.50	schwach positiv
3	3.50 - 17.5	positiv
4	17.5 - 50.0	stark positiv
5	50.0 - 100	sehr stark positiv
6	>100	sehr stark positiv

**Tabelle 6: Spezifische IgE-Klasseneinteilung gemäß Immulate2000-Allergie**

Spezifische IgE - Klasse	Konzentration in kU/L	Beurteilung
0	0,00 - 0.34	nicht vorhanden
1	0.35 - 0.69	niedrig
2	0.70 - 3.49	mittel
3	3.50 - 17.49	hoch
4	17.50 - 52.49	sehr hoch
5	52.50 - 99.99	sehr hoch
6	> / = 100	sehr hoch

## 2.3. Basophilenaktivierungstests (BAT)

### 2.3.1. Reagenzien, Material und Geräte

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden eingesetzt:

- Basotest<sup>®</sup>-Testkit der Firma Orpegen Pharma (Heidelberg, Deutschland) mit folgendem Inhalt:
  - 1 Fläschchen (2 ml) Zweifarb-Antikörperreagenz, enthält anti-IgE-PE und anti-gp53-FITC
  - 1 Fläschchen mit lyophilisiertem Stimulationspuffer zur Rekonstitution
  - 1 Fläschchen (20 ml) Lysing Solution zur Lyse der Erythrozyten und gleichzeitigen Fixierung der Leukozyten
  - 1 Fläschchen Instamed-Salze für die Waschlösung zur Rekonstitution (PBS: phosphate buffered saline)
  - 1 Röhrchen (200 µl) mit dem chemotaktischen Peptid N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) 0,4 mM
- weitere Substanzen und Reagenzien
  - 1 Fläschchen (2 ml) Antikörperreagenz anti-CD203c-PE (97A6), Immunotech (Marseille, Frankreich)
  - Bienen- und Wespengift: lyophilisiert, Reless, ALK-Scherax Arzneimittel GmbH (Hamburg, Deutschland)
  - Bidestilliertes Wasser zur Verdünnung der Lysing Solution
  - Steriles, pyrogenfreies Reinstwasser zur Rekonstitution von Stimulationspuffer und Waschlösung
  - Flüssigkeiten für die FACS-Analyse (Flow assisted cell sorting): FACSFlow, FACSRinse, FACSClean, Becton-Dickinson (BD) Biosciences GmbH (Heidelberg, Deutschland)

- Materialien
  - Für die Blutentnahmen: Lithium-Heparin Monovetten (9 ml), Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland)
  - Meßröhrchen (12 x 75 mm, 5 ml): BD Falcon™ Tubes Nr. 352052, BD Biosciences GmbH (Heidelberg, Deutschland)
  - Eppendorfcups (1,5 ml): Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
  - Pipetten: Pipetman Ultra U20 (2-20 µl)+U200 (20-200 µl), Gilson S.A.S. (Villiers le Bel, Frankreich) und Eppendorf Reference variabel (100-1000 µl) Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH (Hamburg, Deutschland)
  - Pipettenspitzen: Biosphere (200 µl+1000 µl), Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland)
  - Dispenserspitzen: Combitips plus, Standard 50 ml, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
  - Laborglasflaschen (200 ml+1000 ml): Biochrom KG, (Berlin, Deutschland)
  - Eisbad mit Deckel
  
- Geräte
  - Durchflusszytometer mit 488 nm Lichtanregung (Argonlaser): FACScan, BD (Heidelberg, Deutschland)
  - Computer: Apple Macintosh mit Cellquest Software BD (Heidelberg, Deutschland)
  - Schwenkmischer: SM1, Desaga GmbH (Wiesloch, Deutschland)
  - Kühlzentrifuge mit freischwingenden Einsätzen für 12 x 75 mm Röhrchen: Universal 32-R, Hettich GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
  - Vortex-Mischer: REAX 2000, Heidolph GmbH & Co KG (Schwabach, Deutschland)
  - Brutschrank: Typ B40, Memmert GmbH (Schwabach, Deutschland)
  - Kühl- und Gefrierschrank: Bosch Cooler (max. -20° C), Bosch GmbH (Gerlingen, Deutschland)

### 2.3.2. Bestimmung der Basophilenaktivierung mit Detektion von CD63

Als Testverfahren für die Bestimmung der Aktivierung basophiler Granulozyten durch Detektion des Oberflächenmarkers CD63 wurde das Protokoll des Basophilenaktivierungstests Basotest® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

#### *Vorbereitungen für die Versuchsdurchführung*

- Die Instamed-Salze für die Waschlösung wurden in 1000 ml pyrogenfreiem Reinstwasser aufgelöst.
- Der lyophilisierte Stimulationspuffer wurde durch Zugabe von 2 ml pyrogenfreiem Reinstwasser rekonstituiert und in Aliquots zu je 180 µl bei -20° C gelagert. Zur Testdurchführung wurde pro Patient ein Aliquot des eingefrorenen Stimulationspuffers aufgetaut.
- Verdünnung der fMLP-Stammlösung: zum Gebrauch wurden 5 µl fMLP in 1 ml Waschlösung vermischt.
- Verdünnung der Lysing Solution mit bidestilliertem Wasser im Verhältnis 1:10.
- Erwärmen des Wasserbades auf 37° C
- Herstellen des Eiswasserbades
- Vorkühlen der Kühlzentrifuge auf 4° C
- Einschalten und Kalibrierung des Durchflusszytometers

#### *Vorbereitung der Hymenoptereingifte*

Als Stammlösung für die Herstellung der Insektengiftverdünnungsstufen wurden Aliquots (200 µl) an lyophilisierten Bienen- und Wespengift der Konzentration 100 µg/ml herangezogen. Diese wurden bei -20° C gelagert, wobei für jede Testreihe ein Aliquot frisch aufgetaut und mit 200 µl Waschlösung rekonstituiert wurde. Pro Testansatz wurden mit Hilfe der Waschlösung jeweils drei Verdünnungsstufen der Insektengifte hergestellt. Dabei betrug die im BAT zugefügte Konzentration zu den Proben je 1 µg/ml, 0,1 µl/ml und 0,01 µl/ml sowohl Bienen- als auch Wespengift.

Die Reagenzien des Basotest-Testkits wurden bei 2-8° C im Dunkeln (Kühlschrank) aufbewahrt, wobei die für jeden Testansatz frisch hergestellten Allergen-, fMLP- und Lysing Solution-Arbeitslösungen nach Gebrauch verworfen wurden.

### *Testprinzip und Durchführung*

Das heparinisierte Vollblut der Patienten und Kontrollpersonen wurde in 5 ml Probenröhrchen zu je 100 µl aliquotiert und mit 20 µl IL-3 enthaltendem Stimulationspuffer (Endkonzentration 2 ng/ml) für zunächst 10 Min bei 37° C inkubiert. Dann folgte die Zugabe von je 100 µl Bienen- und Wespengift in absteigender Konzentration zu den jeweiligen Proben. Das chemotaktische Peptid fMLP diente als Positiv-Kontrolle (Endkonzentration 1 µmol/L), Waschlösung (PBS) als Negativ-Kontrolle. Nach einer Inkubation von 20 Min bei 37° C wurde der Degranulationsprozess der Basophilen durch ein fünfminütiges lichteinfallgeschütztes Eisbad abgestoppt. Die Zellfärbung erfolgte durch die Zugabe von 20 µl Zweifarb-Antikörperreagenz (beinhaltet zwei monoklonale Antikörper) zu jeder Probe und einer anschließenden Eisbad-Inkubation für 20 Min. In diesem Färbeschritt lagert sich der monoklonale Antikörper Anti-IgE-PE, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin konjugiert ist an humanes Immunglobulin E und erkennt daher basophile Granulozyten. Der andere monoklonale Antikörper Anti-gp53 FITC ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein konjugiert und erkennt ein auf aktivierten Basophilen exprimiertes Glykoprotein gp53 (entspricht CD63). Zur Lyse der Erythrozyten und für die Fixierung der Zellen diente eine Inkubation mit Lysing Solution (je 2 ml) bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Zuletzt wurden die verbleibenden Zellen zweimal gewaschen (je 3 ml Waschlösung), abzentrifugiert (4° C, 5 Min, 4000 RPM) und in 300 µl Waschlösung resuspendiert. Der Prozentsatz an aktivierten Basophilen wurde innerhalb von zwei Stunden am FACScan Durchflußzytometer mit Hilfe der Cellquest Software analysiert und ausgewertet.

### **2.3.3. Detektion der Hochregulation von CD203c**

Für die Messung der Basophilenaktivierung mit Detektion des Oberflächenmarkers CD203c wurde ebenfalls das Basotest<sup>®</sup>-Protokoll angewandt mit folgenden Unterschieden im Testablauf:

- die Zugabe von 20 µl Stimulationspuffer (enthält IL-3) zu den heparinisierten Vollblutproben zu Beginn der Testdurchführung entfiel. Stattdessen wurde jeweils 20 µl Waschlösung hinzugegeben.
- Das zur Zellfärbung herangezogene Antikörperreagenz enthielt nur einen monoklonalen Antikörper, nämlich Anti-CD203c-PE, der mit dem Fluorochrom Phycoerythrin konjugiert ist.

Die Probenanalyse und Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem FACScan Gerät und der Cellquest Software am Computer.

Die fertigen Messproben wurden innerhalb von zwei Stunden gemessen und bis zur Messung in einem abgedeckten lichtgeschützten Eisbad aufbewahrt. Zwischen der durchflusszytometrischen Analyse der Teströhrchen des CD63- und derjenigen des CD203c-Protokolls wurde ein Spülprozess (mit FACSRinse- und FACSClean-Flüssigkeit) zur Reinigung des FACScan-Geräts durchgeführt, um Messfehler und Ungenauigkeiten zu verhindern. Letztgenannte können z.B. durch Zellverstopfung der Messkapillare im Gerät zu verfälschten Ergebnissen führen. Der Inhalt der jeweiligen Teströhrchen für beide Protokolle ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: Inhalte der 8 Probenansätze des CD63- und CD203c-Protokolls.

Teströhrchen	Inhalt	Abkürzung
1	Negativ-Kontrolle (PBS)	(N.K.)
2	Positiv-Kontrolle (fMLP)	(P.K.)
3	1 µg/ml Bienengift	(B 1)
4	0,1 µg/ml Bienengift	(B 0,1)
5	0,01 µg/ml Bienengift	(B 0,01)
6	1 µg/ml Wespengift	(W 1)
7	0,1 µg/ml Wespengift	(W 0,1)
8	0,01 µg/ml Wespengift	(W 0,01)

### 2.3.4. Durchflusszytometrische Datenanalyse und Auswertung

#### Grundlagen der Durchflußzytometrie

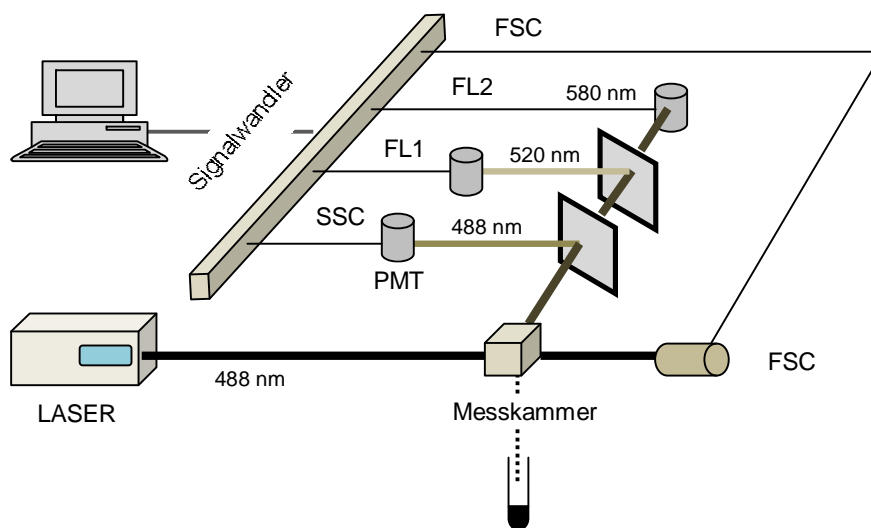
Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es möglich, verschiedene Zellen bzw. Zellpopulationen durch die Analyse ihres Streulicht- und Fluoreszenzverhaltens quantitativ und qualitativ auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Hierfür werden die in Suspension vorliegenden Zellen an einem Messpunkt durch einen Laser beleuchtet und das refraktierte Licht über ein optisches Detektionssystem elektronisch weiterverarbeitet.

Das Durchflußzytometer besteht aus drei Bauteilen: dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System und der Signalverarbeitung. Durch Überdruck wird die Zellsuspension über eine Stahlkapillare in eine Quarzküvette geleitet. Dabei ist sie von einem Hüllstrom umgeben. Der Übergang in die Messkammer verjüngt und beschleunigt die Probenflüssigkeit und gewährleistet, dass die Zellen die Küvette am Messpunkt perlschnurartig passieren. Durch dieses als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnete Prinzip gelingt es, jede Zelle einzeln hintereinander zu beleuchten und zu analysieren.

Das optische System setzt sich aus einem Anregungs- und Detektionsteil zusammen. Als Anregungsquelle dient beim FACScan ein luftgekühlter Argon-Ionen-Laser (488nm), dessen monochromatisches (blaues) Licht fokussiert, kohärent und sehr energiedicht ist. Der Detektionsteil besteht aus zwei Untereinheiten. Zum einen wird die Lichtbeugung als Vorwärtsstreulicht (engl. „forward scatter“, FSC) und zum anderen die Lichtbrechung und Reflexion als Seitwärtsstreulicht (engl. „side scatter“, SCC) und die Fluoreszenz gemessen. Die optischen Signale werden über Lichtteiler von Photodetektoren registriert und in elektrische Impulse umgewandelt, deren Höhe mit der von den Zellen ausgehenden Strahlung korreliert. Verwendung finden Photodioden und Photovervielfacherröhren (PMT= photomultiplier tubes).

### Messung der Lichtstreuung

Jede vom Laserstrahl belichtete Zelle erzeugt eine gewisse Lichtstreuung, die von der Zellgröße, der Membranstruktur und von intrazellulären Bestandteilen (Granula und Vakuolen) abhängt. Der größte Teil des Lichtes wird in einem Winkel von 3-10° gestreut und von einer Photodiode registriert, die dem Laser gegenüber liegt. Sie misst das Vorwärtstreulicht (FSC), das Angaben über die Größe einer Zelle macht. Ein weiterer Detektor im 90° Winkel zum Laserstrahl erfasst das an Intensität deutlich schwächere Seitwärtsstreulicht und liefert Informationen über die interne Zellstruktur, d.h. über die Zelldichte und Granularität.



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (vereinfachte Darstellung):** Markierte Zellen werden in einem laminaren Probenstrom in die Messkammer geleitet, wo die einzelnen Zellen senkrecht vom Laserstrahl getroffen werden. Die erzeugten Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden gefiltert, von den Detektionseinheiten gemessen und an die Signalverarbeitung weitergegeben.

### Messung der Fluoreszenz

Unter Zuhilfenahme von Antikörpern, die mit Fluorochromen konjugiert sind, gelingt es bestimmte Oberflächenantigene, wie z.B. die CD-Antigene zu markieren. Diese fluoreszierenden Verbindungen werden durch einen Laser bestimmter Wellenlänge angeregt und emittieren dabei Licht einer spezifischen Wellenlänge, die länger ist als die der absorbierten Energie. Mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm eignet sich der Argonlaser für die Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und R-Phycoerythrin (PE), die aufgrund verschiedener Emissionsspektren gleichzeitig gemessen werden können. Bei dem CD63 Protokoll kamen bei der Zweifachfärbung der Zellen FITC und PE zum Einsatz, die Zellen beim CD203c-Protokoll wurden einfach mit PE markiert. Die Eigenschaften dieser Fluorochrome gibt Tabelle 7 wieder.



Über die Fluoreszenz-Detektoren FL1 und FL2 (FL1= FITC-Kanal: grünes Licht, FL2= PE-Kanal: gelbes Licht), die nur Licht einer begrenzten Wellenlänge registrieren, können die Fluoreszenzsignale getrennt vom Streulicht gemessen werden. Je mehr farbstoffkonjugierte Antikörper an die Zellen binden, desto höher ist die Fluoreszenzintensität. Hierdurch kann indirekt auf die Höhe der exprimierten Oberflächenantigene geschlossen werden.

**Tabelle 8: Fluoreszenzeigenschaften der im Test verwendeten Fluorochrome**

Fluorochrom	Absorptions- maximum	Emissions- maximum	Hauptemissions- farbe
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495 nm	519	grün
R-Phycoerythrin (PE)	480 nm, 565 nm	578	gelb

#### *Darstellung der Daten und Auswertung*

Die optischen Signale werden in elektrische Impulse transformiert und von einem Computer digitalisiert und als Rohdaten gespeichert. Somit gelingt es die verschiedenen Parameter wie FSC, SSC, FL1 und FL2 mit einander in Bezug zu setzen und man erhält typische ein- oder zweidimensionale Diagrammformen. In der Regel wird nur ein Teil der Messereignisse zur Auswertung herangezogen, wobei diese Vorauswahl bezüglich bestimmter Eigenschaften als sog. „Gating“ bezeichnet wird. Hierbei wird ein Auswertefenster (Gate) um bestimmte Zellwolken gelegt, deren Fluoreszenz- bzw. Antigen-Eigenschaften näher untersucht werden sollen.

Bei der Datenanalyse des CD63-Protokolls mit einer Doppelfärbung der basophilen Granulozyten, wurden die Zellmesswerte zunächst gemäß ihrer SSC- und FL2 (PE-Fluoreszenz)-Signalstärke in ein „Dot Plot“-Diagramm (SSC linear, FL2 logarithmisch) übertragen (s. Abb. 4A). Durch das Setzen eines Schwellenwertes („Threshold“) im FL2-Kanal wurde ein Auswertefenster auf basophile Granulozyten mit sehr hoher anti-IgE-PE-Expression festgelegt (s. Abb. 4A+B). Dieses sog. „Live Gating“ spart Speicherkapazität ein (s. Abb. 4C). Um den Prozentsatz an aktivierten Basophilen zu ermitteln, wurden die Zellen im Analysefenster R1 im „Dot Plot“-Diagramm auf ihre FITC-Fluoreszenz im FL1-Kanal hin untersucht und diejenigen Basophilen detektiert, die das Aktivierungsantigen CD63 exprimierten.

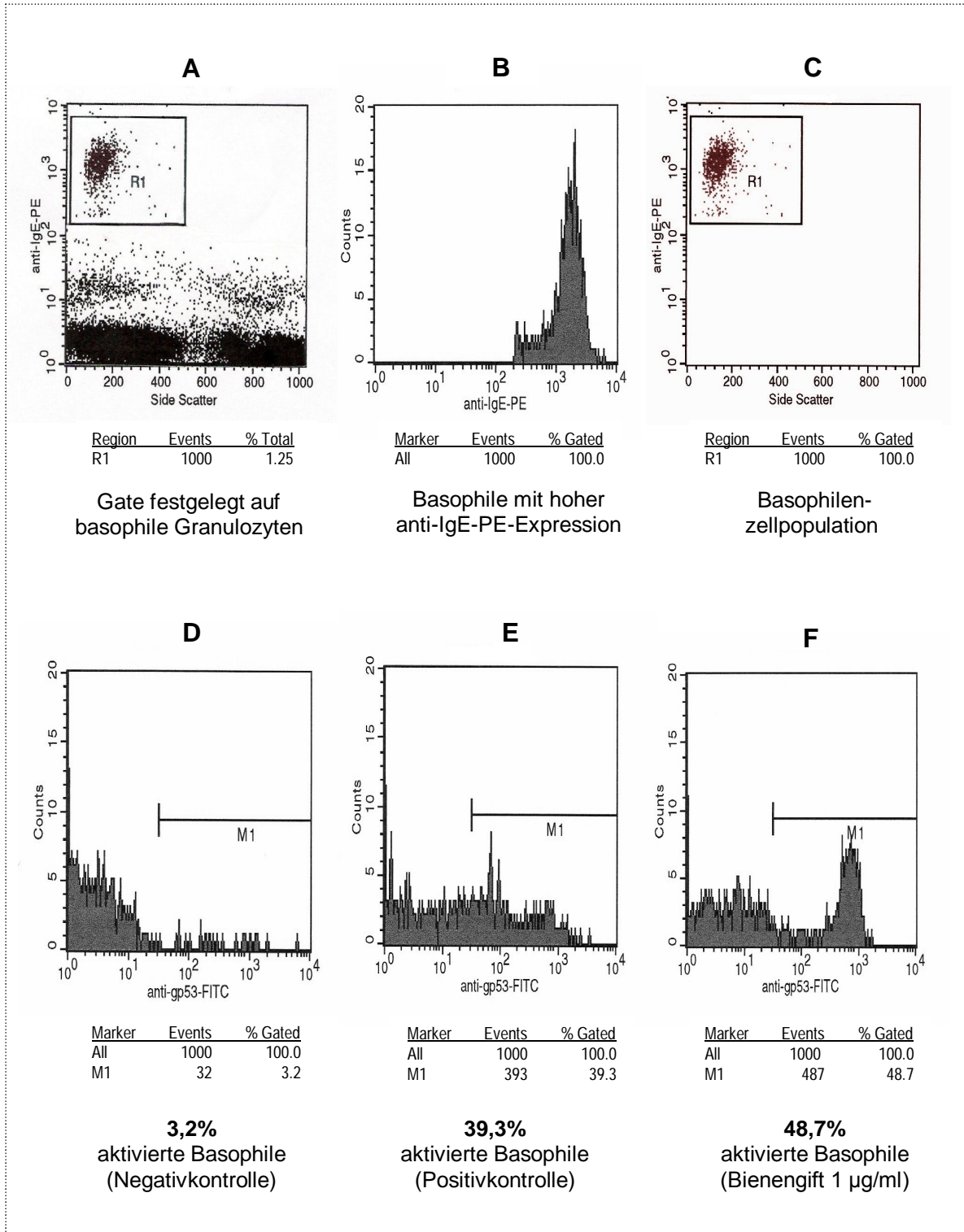
Die Werte wurden anhand eines Histogramms veranschaulicht, auf dessen Abszisse die FITC-Fluoreszenzstärke logarithmisch und die Anzahl an Ereignissen (engl.: Counts) linear auf der Ordinate dargestellt waren. Die Negativ-Kontrolle diente zum Platzieren eines Markers im FL1-Kanal (s. Abb. 4D) und es konnte unter Beibehaltung dieser Markerposition M1 der prozentuale Anteil an aktivierten Basophilen in den jeweiligen Probenansätzen bestimmt werden (s. Abb. 4E+F). Das Erreichen einer Basophilenaktivierung von über 15% in mindestens einer Insektengiftverdünnung wurde im CD63-BAT als positives Testergebnis gewertet. Pro Teströhrchen wurden 1000 basophile Granulozyten akquiriert.

Die im CD203c-Stimmulationsassay mit nur einem Fluoreszenz-Antikörper gefärbten Zellen wurden in Form eines Punktdiagramms (engl. „Dot Plot“) dargestellt (s. Abb. 5). Dabei wurden die Messwerte des Seitwärtsstreulicht (SSC) linear auf die Ordinate und die PE-Floureszenzintensität (FL2-Signale) logarithmisch auf die Abszisse eines Koordinatensystems übertragen und in Korrelation gebracht. Jeder einzelnen Zelle konnte somit ein Punkt im Diagramm zugeordnet werden, die Informationen über die zuvor genannten Eigenschaften lieferte. Sowohl ruhende als auch aktivierte Basophile exprimieren CD203c auf ihrer Oberfläche, aktivierte Zellen aber deutlich mehr. Somit galt der Unterschied in der Fluoreszenzintensität als Maß für eine hohe CD203c Expression und kennzeichnete die aktivierten Basophilen in der Probe. Für jeden Probenansatz wurden 80000 Zellen analysiert und eine Aktivierung über 14% in mindestens einer Giftkonzentrationsstufe wurde als positives Testresultat angesehen.

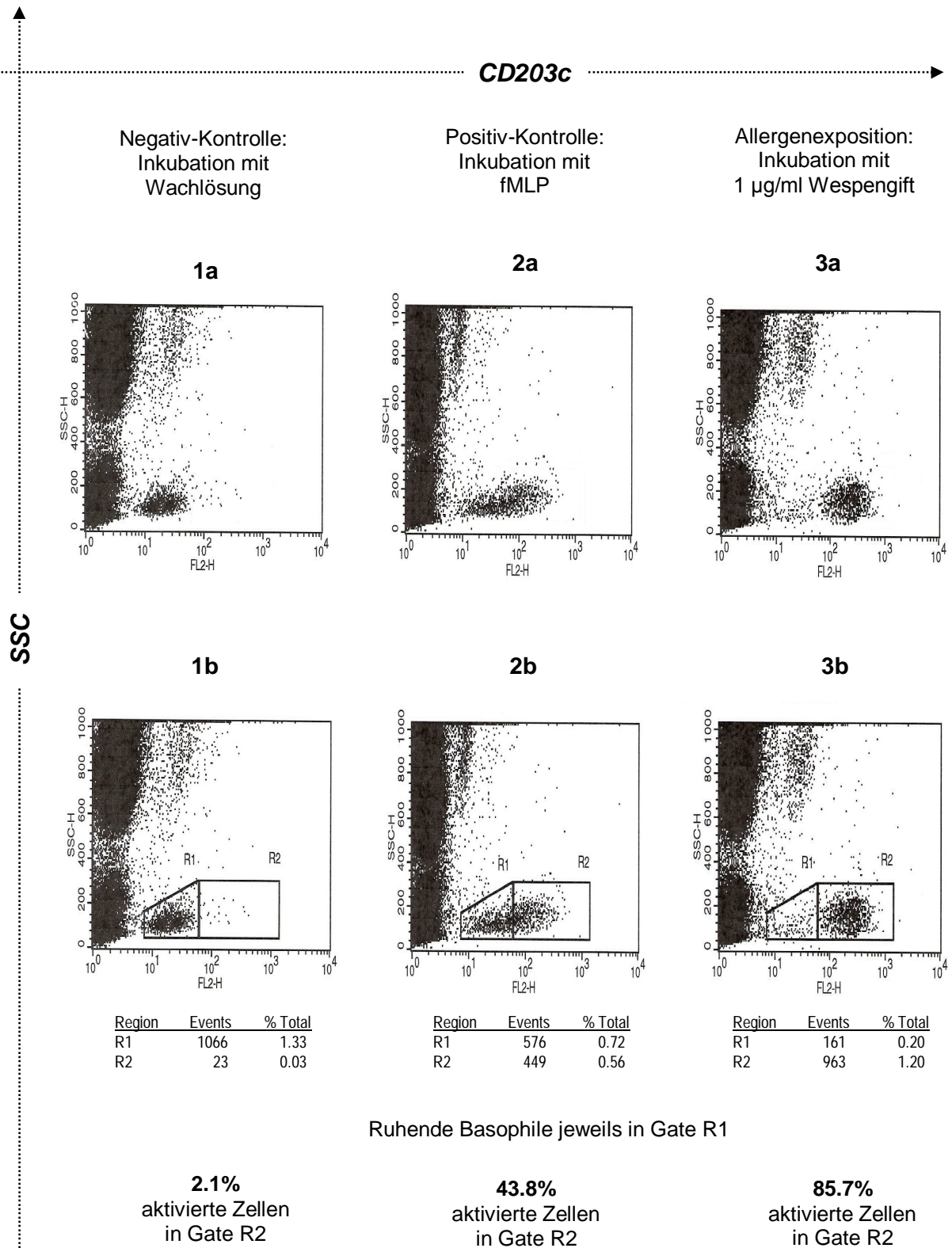
Durch einfaches Setzen polygoner Gates anhand der Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle, konnte ein Messfenster auf Basophile individuell angepasst werden, das für die darauffolgenden Messungen konstant blieb. Mit Hilfe der Cellquest Software wurde die Anzahl der Basophilen in den entsprechenden Gates errechnet (Simple Gating-Strategie). Dabei stellten die Zellen des Gate R1 ruhende und die des Gates R2 aktivierte basophile Granulozyten dar. Durch das Addieren beider Gates und einer einfachen Dreisatz-Rechnung konnte der prozentuale Anteil an aktivierten Basophilen im Gate R2 ermittelt werden.

## 2.4. Statistische Auswertung

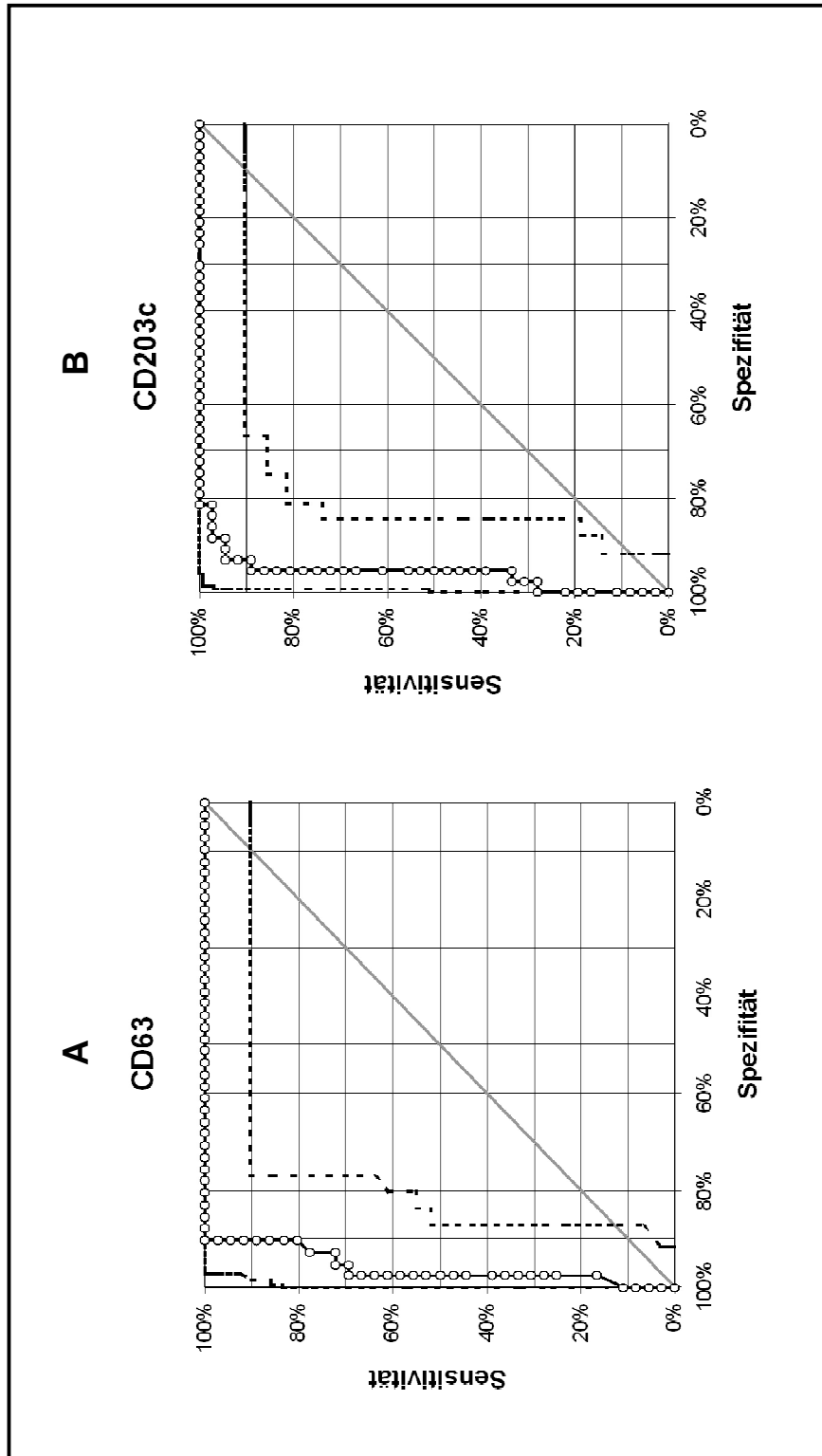
Die Ergebnisse des CD63- und CD203c-BAT sind als prozentuale Werte der Basophilenaktivierung angegeben. Es wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen (SA) und Mediane der Ergebnisse in den BAT-Testansätzen berechnet und verglichen. Unterschiede in den Ergebnissen der BAT-Ansätze wurden zur Auswertung dem Student-t-Test unterzogen. Im Falle von multiplen Vergleichen wurden die Daten entsprechend der Bonferroni-Methode korrigiert. Dabei wurden Wahrscheinlichkeitswerte kleiner als 0,05 ( $p < 0,05$ ) als statistisch signifikant angesehen. Um Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen beider BAT-Protokolle einerseits und den Parametern der Standarddiagnostik (Hauttestergebnis und spezifische IgE-Antikörper-Klasse) andererseits zu ermitteln, wurde für diese Größen der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Des Weiteren wurden die Testgütekriterien Sensitivität und Spezifität bestimmt. Für den CD63- und CD203c-BAT wurden Receiver-Operating-Characteristic (ROC) – Kurven erstellt, um den optimalen Cut-Off-Wert für ein positives Testergebnis im BAT zu ermitteln. Dabei ist die ROC-Analyse eine vielfach angewandte Methode zur Untersuchung und Etablierung neuer Testverfahren mit dem Ziel, optimale Cut-Off-Werte festzulegen, um möglichst hohe Sensitivitäten und Spezifitäten zu erlangen. Anhand der gewonnenen Patientendaten ließ sich für den CD63-BAT ein Grenzwert von 15% Basophilenaktivierung für ein positives Testergebnis festlegen. Für den CD203c-BAT betrug der Schwellenwert 14% (s. Abb.6). Die statistische Datenauswertung erfolgte mit den Statistik-Programmen SPSS (Version 11.0 für Windows) und Microsoft Excel 2003 (Microsoft Office XP für Windows).



**Abbildung 5: Bestimmung der prozentualen Basophilenaktivierung im CD63-BAT.** Im Dot Plot-Diagramm *linSSC /logFL2* wird ein Gate auf Zellen hoher anti-IgE-PE-Expression (=basophile Granulozyten) gesetzt (A+B). In der Basophilenzellpopulation des Gates R1 (C) wird derjenige Anteil an Basophilen aufgrund der FITC-Fluoreszenz im FL1-Kanal detektiert, der das Oberflächenantigen CD63 (=gp53) exprimiert und aktivierte Basophile repräsentiert. Die Höhe dieser FITC-Fluoreszenz wird im Histogramm *linCounts/logFL1* dargestellt. Durch Festsetzen eines geeigneten Messbereichs M1 kann der Prozentsatz an aktivierten Basophilen in den jeweiligen Proben eines Testansatzes bestimmt werden (D-F).



**Abbildung 6: Bestimmung der prozentualen Basophilenaktivierung im CD203c-BAT.** Darstellung von ruhenden und aktivierten CD203c positiven basophilen Granulozyten im „Dot Plot“-Diagramm linSSC/ logFL2. Datenanalyse nach Inkubation mit Negativ-Kontrolle (1a), Positiv-Kontrolle (2a) und Allergen (3a) und nach Setzen der Analysefenster (Gates) R1 und R2 (1b,2b,3b). Die Basophilen mit wenigen CD203c-Molekülen an der Membranoberfläche und niedriger Fluoreszenzstärke (Gate R1) wandeln sich nach Aktivierung um in Zellen hoher Fluoreszenzintensität (Gate R2) durch vermehrte Expression des Oberflächenantigens CD203c. Diese Zellaktivierung wird errechnet und in Prozent angegeben.



**Abbildung 7: ROC-Analyse des CD63-(A) und CD203c-BAT (B) für Insektengift der Konzentration 1 µg/ml.** Dargestellt sind jeweils die ROC-Kurve (Kreise) sowie das obere und untere Konfidenzband (95%) der ROC-Kurve und die Diagonale (graue Linie). Ein Schwellenwert(Cut-Off) von 15% Basophilienaktivierung für den CD63- und von 14% für den CD203c-Testansatz ergibt eine Sensitivität von 91% für den CD63- bzw. von 97% für den CD203c-BAT. Die Spezifität beträgt 100% für den CD63- und 89 % für den CD203c-BAT. Die Wahl eines niedrigeren Cut-Off-Wertes erhöht die Sensitivität geringfügig, senkt die Spezifität hingegen deutlich.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Patientenkollektiv

#### 3.1.1. Klinische Charakterisierung

Die 42 Patienten wurden zunächst auf der Anamnese basierend in 4 Gruppen unterteilt. Der Schweregrad der anaphylaktischen Reaktion nach einem Insektenstich und die Verteilung der Patienten sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Patientendaten sind im Anhang auf S. 103 dargestellt.

##### *Gruppe A: Allergische Reaktion nach Bienenstich*

Zu dieser Gruppe gehörten 8 Patienten (3 Frauen und 5 Männer), die anaphylaktische Reaktionen nach einem Bienenstich in der Anamnese aufwiesen (Pat. Nr. 1-8). Bis auf 2 Patienten waren Wespenstiche ohne nachfolgende Allergiesymptome den Patienten nicht erinnerlich und das mittlere Alter der Gruppe betrug 44 ( $\pm$  18) Jahre.

##### *Gruppe B: Allergische Reaktion nach Wespenstich*

Die 24 Patienten (17 Frauen und 7 Männer) dieser Gruppe konnten sicher eine Wespe für den Insektenstich, der zur anaphylaktischen Reaktion führte, verantwortlich machen (Pat. Nr. 9-32). Über Bienenstiche ohne allergische Reaktion berichteten 5 Patienten und bei 2 Patienten waren neben den Wespenstichen unklare Insektenstiche vorgekommen, die ebenfalls keine systemischen Allergiesymptome mit sich brachten. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 46 ( $\pm$  17) Jahren.

##### *Gruppe C: Allergische Reaktion sowohl nach Bienen- als auch nach Wespenstich*

In dieser Gruppe befanden sich 3 Patienten (3 Männer), die auf Stiche beider Insektenarten mit anaphylaktischen Symptomen reagierten (Pat. Nr. 33-35). Der Altersdurchschnitt der Männer betrug 48 ( $\pm$  6) Jahre.

##### *Gruppe D: Allergische Reaktion nach unklarem Insektenstich*

Bei den 7 Patienten dieser Gruppe (3 Frauen und 4 Männer) war es zu Insektenstichen mit allergischen Folgeerscheinungen gekommen, wobei es den Patienten nicht gelang, das stechende Insekt sicher zu identifizieren (Pat. Nr. 36-42). Neben den unklaren Insektenstichen wies ein Patient Wespenstiche ohne allergische Symptome in der Anamnese auf. Das durchschnittliche Alter der Gruppe lag bei 40 ( $\pm$  21) Jahren.

**Tabelle 9: Einteilung der allergischen Symptome der Patienten in Schweregrade gemäß der Klassifikation nach Ring und Messmer [127].**

allergische Reaktion nach:	Anzahl	Schweregrad der Reaktion			
		I	II	III	IV
<i>Bienenstich</i>	8	1	4	2	1
<i>Wespenstich</i>	24	6	12	5	1
<i>Bienen- und Wespenstich</i>	3	1	1	-	1
<i>Insekt unklar</i>	7	-	5	2	-
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>9</b>	<b>3</b>

### 3.1.2. Auswertung der Standardverfahren und Diagnose

#### *Ergebnisse im Hauttest*

In Gruppe A war der Hauttest bei allen 8 Patienten (100%) positiv gegen Bienengift und in einem Fall auch positiv gegen Wespengift. Die Gruppe B lieferte 24 positive Testergebnisse (100%) gegen Wespengift wobei in 4 Fällen eine positive Reaktion auch auf Bienengift zu erkennen war. Bei den Patienten der Gruppe C hatten alle 3 Personen (100%) positive Resultate bei der Testung gegen beide Insektengifte. Für 3 Patienten der Gruppe D konnte ein positiver Hauttest gegen Wespengift nachgewiesen werden und bei einem Patienten gegen Bienengift. Daneben war das Hauttestergebnis sowohl gegen Bienen- als auch gegen Wespengift bei einer Person positiv. Kein positives Ergebnis bzgl. der Testung auf beide Insektengiftarten boten 2 Patientinnen. In Bezug auf eine Stichanamnese mit bekanntem Insekt ließ sich eine Sensitivität von 100% für den Hauttest ermitteln.

Das Zeitintervall zwischen dem letzten Insektenstich mit anaphylaktischer Reaktion und dem durchgeführten Hauttest betrug im Mittel 12,6 ( $\pm$  19,6) Monate bei den Bienengiftallergikern und 24,5 ( $\pm$  48,3) Monate bei den Patienten mit Wespengiftallergie. In der Gruppe C mit Sensibilisierung auf beide Insektengiftarten lag der Abstand zwischen Stichreaktion und Test durchschnittlich bei 19,3 ( $\pm$  22,9) Monaten und bei den Patienten der Gruppe D waren dies 27,3 ( $\pm$  31,8) Monate.

Hinsichtlich der Zeitspanne seit der letzten allergischen Reaktion auf einen Insektenstich bis zur erfolgten Hauttestung ergab sich für das gesamte Patientenkollektiv eine durchschnittliche Dauer von 21,8 ( $\pm$  39,7) Monaten.

### Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper und Klassenzuteilung

Die Einteilung in Bienengift spezifische IgE-Klassen ergab bei den Patienten von Gruppe A bei 3 Patienten Klasse 2, bei 4 Patienten Klasse 3 und einem Patienten konnte die Klasse 6 zugeteilt werden. Wespengift spezifische IgE-Antikörper der Klasse 2 konnten in dieser Gruppe bei einer Patientin gemessen werden. In Gruppe B konnte ein Wespengiftallergiker der gleichnamigen spezifischen IgE-Klasse 1, 5 der Klasse 2 sowie 11 Patienten der Klasse 3 zugeordnet werden. Die spezifische IgE-Klasse 4 erhielten 2 und die Klasse 5 drei Patienten. Daneben wurde bei 3 Patienten eine Sensibilisierung auch gegen Bienengift mit der Klasse 1, bei 4 Personen mit der Klasse 2 und bei einer Patientin mit der Bienengift-IgE-Klasse 6 festgestellt. Bei den doppelsensibilisierten Patienten der Gruppe C kam die bienengiftspezifische IgE-Klasse 2 zweimal vor und die Klasse 3 einmal. Eine Zuteilung zur IgE-Klasse 1 gegen Bienengift erfolgte in Gruppe D in 2 Fällen und des Weiteren zur Klasse 3 und Klasse 5 bei jeweils einem Patienten. Zudem erreichten 2 Patienten die wespengiftspezifische IgE-Klasse 2 sowie je ein Patient Klasse 1 und Klasse 3. Die Wespengift-IgE-Klasse 5 wurde bei einem Patienten gemessen. (s. Tab. 10) Bei bekannter Stichanamnese ergab der Nachweis von spezifischem IgE eine Sensitivität von 100%.

**Tabelle 10: Einteilung der Patienten in die insektengiftspezifische IgE-Klassen** gemäß der Höhe an bienen- und wespengiftspezifischer Antikörper. Dargestellt ist die Anzahl an Patienten für jede Insektengift-Klasse bei den jeweiligen Allergiegruppen.

Anamnese	Anzahl	Bienengift / Wespengift:						
		Klasse 0	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	Klasse 4	Klasse 5	Klasse 6
Bienengift-allergie	8	0 / 7	0 / 0	3 / 1	4 / 0	0 / 0	0 / 0	1 / 0
Wespengift-allergie	24	16 / 0	3 / 1	4 / 5	0 / 11	0 / 2	0 / 3	1 / 2
Bienen- und Wespengift-allergie	3	0 / 0	0 / 0	2 / 2	1 / 1	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Insekt unklar	7	3 / 2	2 / 1	0 / 2	1 / 1	0 / 0	1 / 1	0 / 0
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>19 / 9</b>	<b>5 / 2</b>	<b>9 / 10</b>	<b>6 / 13</b>	<b>0 / 2</b>	<b>1 / 4</b>	<b>2 / 2</b>

Die Bestimmung der spezifischen Insektengift-Antikörper wurde nach dem letzten Stichereignis durchschnittlich nach 15,4 ( $\pm$  20,0) Monaten bei Gruppe A, innerhalb 23,3 ( $\pm$  48,8) Monate bei Gruppe B, des Weiteren nach 19,0 ( $\pm$  22,3) Monaten bei Gruppe C, sowie nach 27,3 ( $\pm$  31,8) Monaten bei Gruppe D durchgeführt. Das Gesamtintervall aller Gruppen betrug im Schnitt 22,1 ( $\pm$  39,9) Monate.



### *Vergleich der Ergebnisse von Hauttest und spezifischer IgE-Bestimmung*

Alle 8 Patienten, die in der Anamnese über eine Bienengiftallergie berichteten, wiesen sowohl einen positiven Hauttest als auch spezifische IgE-Antikörper gegen Bienengift auf, wobei beide Testverfahren in einem Fall eine Doppelsensibilisierung aufzeigten. Die 24 Patienten mit anamnestischer Wespengiftallergie lieferten in beiden Testverfahren alle übereinstimmend positive Testreaktionen gegen Wespengift, wobei in 4 Fällen durch beide Testverfahren eine Doppelsensibilisierung erkannt wurde. Bei weiteren 4 wespengiftallergischen Patienten war lediglich der Hauttest gegen Wespengift positiv und die spezifische IgE-Bestimmung ermittelte Antikörper gegen beide Insektengifte. Hauttest und spezifische IgE-Bestimmung lieferten bei 3 Patienten mit anamnestisch angegebener Allergie gegen beide Insekten zu 100% übereinstimmende Testergebnisse.

Unabhängig von der Anamnese lieferten beide Testverfahren 7 positive Ergebnisse lediglich bei der Testung gegen Bienen- und 17 positive Ergebnisse ausschließlich gegen Wespengift. Insgesamt konnte bei 9 Patienten eine Doppelsensibilisierung in beiden Testverfahren festgestellt werden. In Bezug auf die Testergebnisse gegen beide Insektengifte zeigten der Hauttest und die spezifische IgE-Bestimmung 35 (83,3%) übereinstimmende Testresultate. Von insgesamt 23 positiven Testresultaten bei der IgE-Antikörper-Testung gegen Bienengift ergab der Hauttest in 17 (73,9%) Fällen ebenfalls positive Reaktionen auf Bienengift. Bei 33 Patienten mit wespengiftspezifischen IgE-Antikörpern fiel der Hauttest bei 32 (97,0%) Personen positiv gegen Wespengift aus (s. Tab. 17, S. 61).

### *Diagnosefindung*

Die Ergebnisse der durchgeführten Standarddiagnostik dienten dazu, den anamnestisch begründeten Verdacht einer Insektengiftallergie zu verifizieren und die Patienten mit unklaren Insektenstichen mit Hinblick auf eine spezifische Immuntherapie dem relevanten Insektengift zuteilen zu können.

Dies gelang in Gruppe A mit dem Nachweis einer Sensibilisierung gegen Bienengift in Hauttest und spezifischer IgE-Bestimmung in allen 8 Fällen. Eine Patientin wies zudem auch eine Sensibilisierung gegen Wespengift in beiden Testverfahren auf. Der Verdacht einer Wespengiftallergie konnte bei den 24 Patienten der Gruppe B mit einem positiven Hauttest sowie spezifischen IgE-Antikörpern bei allen Patienten bestätigt werden. Ferner konnte bei 8 Wespengiftallergikern eine zusätzliche Sensibilisierung gegen Bienengift mit positiven giftspezifischen Antikörpern festgestellt werden, und 4 dieser 8 Personen wiesen auch im Hauttest ein positives Ergebnis gegen Bienengift auf. Eine Doppelsensibilisierung gegen beide Insektengifte konnte bei allen 3 Patienten der Gruppe C in beiden Testverfahren nachgewiesen werden. In der Gruppe mit unklaren Insektenstichen in der Anamnese konnten 3 Patienten der Diagnose Wespengiftallergie zugeordnet werden. Letztgenannte wiesen positive Hauttests und spezifische Antikörper gegen Wespengift auf. Darüber hinaus wurde bei 2 dieser Patienten die bienengiftspezifische-IgE-Klasse 1 bestimmt. Weiterhin zeigte in Gruppe D ein Patient eine Doppelsensibilisierung mit positivem Hauttest und spezifischen Antikörpern (jeweils IgE-Klasse 3) gegen beide Insektengifte. Einem Patienten konnte die Diagnose Bienengiftallergie aufgrund einer positiven Hauttestung und IgE-Bestimmung gegen Bienengift (Klasse 5) zugeteilt werden, wobei auch eine Wespengiftsensibilisierung mit IgE-Klasse 1 festgestellt wurde. Daneben konnte bei 2 Patientinnen (Nr. 39, 42) dieser Gruppe keinerlei Sensibilisierung gegen Bienen- oder Wespengift weder im Hauttest, noch bei der spezifischen Antikörper-Bestimmung nachgewiesen werden.

Von 42 Patienten konnte bei 40 Personen durch Hauttest und spezifische IgE-Bestimmung eine Sensibilisierung gegen Insektengift festgestellt werden. Der Diagnose Bienengiftallergie wurden 9 Patienten zugeteilt (Nr. 1-8, 41), 27 Personen erhielten die Diagnose Wespengiftallergie (Nr. 9-32, 36, 37, 40) und 4 Patienten (Nr. 33-35, 38) wurde eine SIT gegen beide Insektengifte nahegelegt (s. Abb. 8).

Die Sensitivität in Hinsicht auf das gesamte Patientenkollektiv lag für die Hauttestung und für die spezifische IgE-Bestimmung bei jeweils 95,2%. In Bezug auf das jeweils andere Insektengift konnte eine relative Spezifität von 88,9% für Hauttest und 77,8% für den IgE-Nachweis bei Bienengiftallergikern errechnet werden. Bei Patienten mit Wespengiftallergie betrug die relative Spezifität 85,2% für den Hauttest und 63,0% für die spezifische IgE-Bestimmung.

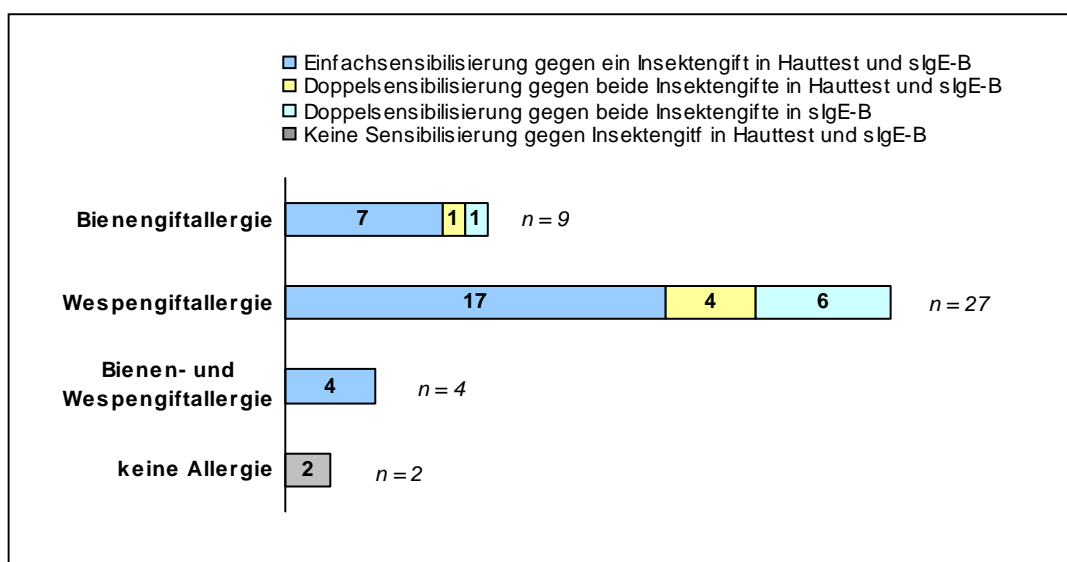


Abbildung 8: Ergebnisse der Hauttestung und spezifischen IgE-Bestimmung (sIgE-B) von 42 Patienten mit anaphylaktischer Reaktion nach einem Insektenstich.

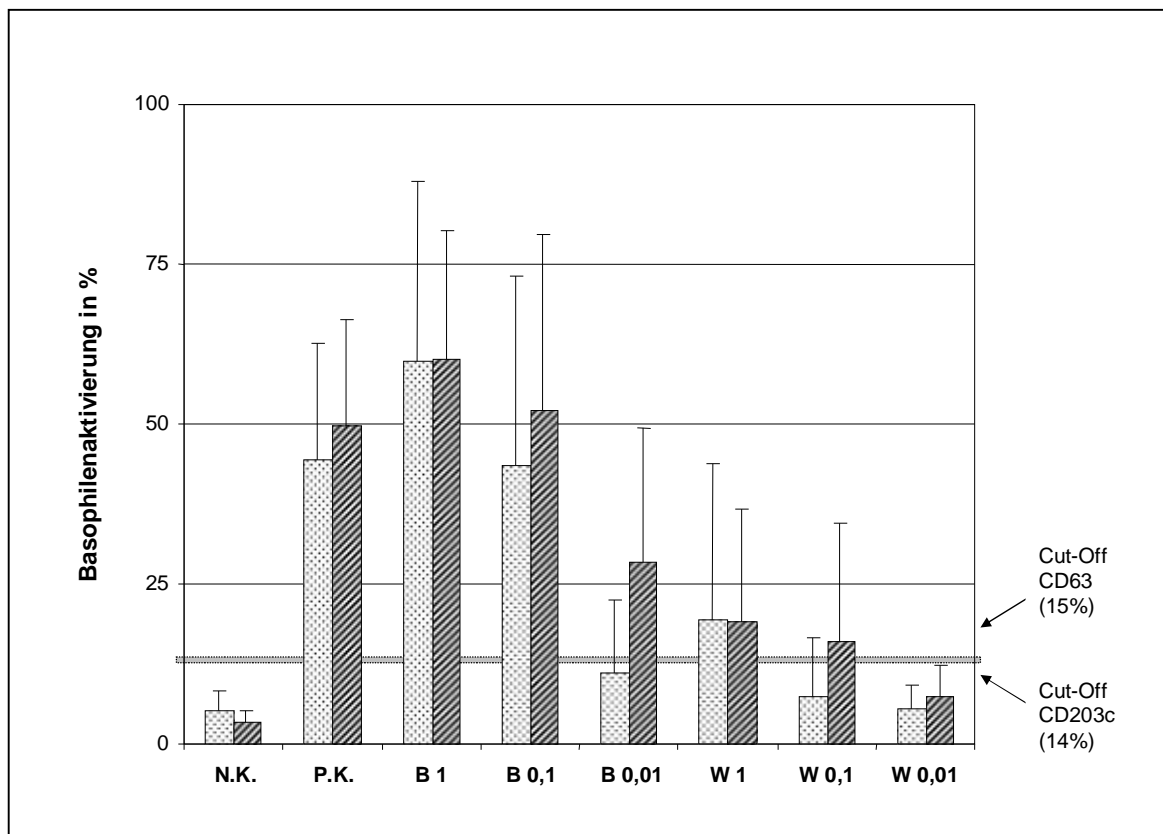
### 3.1.3. Testresultate bei Detektion von CD63 und CD203c

Die Ergebnisse der Basophilenaktivierung der Probenansätze des CD63- und CD203c-BAT wurden für jede Diagnosegruppe getrennt und in Bezug auf das Gesamtkollektiv ermittelt. Die einzelnen Messwerte der Patienten sind im Anhang auf S. 103 dargestellt.

#### Patienten mit Bienengiftallergie

Die Messungen in der Gruppe der Bienengiftallergiker ergaben bzgl. der Testung gegen 1 µg/ml Bienengift bei der Bestimmung des Oberflächenmarkers CD63 8 (88,9%) positive Testergebnisse sowie 9 (100%) positive Ergebnisse bei der Markierung des CD203c-Antigens. Bei der Konzentration 0,1 µg/ml lieferten der CD63- bzw. der CD203c-BAT 7 bzw. 8, und hinsichtlich der Konzentrationsstufe 0,01 µg/ml Gift noch 2 bzw. 6 positive Testresultate. Darüber hinaus wiesen 3 Patienten bei der CD63-Detektion und 5 Patienten bei der CD203c-Bestimmung positive Testresultate auch gegen 1 µg/ml Wespengift auf. Bei der Konzentration 0,1 µg/ml wurde eine Aktivierung über den Cut-Off im CD63- bzw. im CD203c-Testansatz von einer bzw. von 3 Patienten erreicht. Die Testung auf 0,01 µg/ml Wespengift zeigte lediglich im CD203-BAT ein positives Ergebnis.

Die durchschnittliche Aktivierung der Basophilen lag im CD203c-Protokoll bei allen Bienengiftkonzentrationsstufen (B 1: CD63=  $59,9 \pm 27,9$ / CD203c=  $60,1 \pm 20,2$ ; B 0,1: CD63=  $43,4 \pm 29,7$ / CD203c=  $52,1 \pm 27,6$ ; B 0,01: CD63=  $11,2 \pm 11,2$ / CD203c=  $28,3 \pm 21,1$  ) sowie bei den Wespengiftkonzentrationen W 0,1(CD63=  $7,3 \pm 9,4$ / CD203c=  $16,2 \pm 18,5$ ) und W 0,01 (CD63=  $5,7 \pm 3,5$ / CD203c=  $7,3 \pm 5,1$ ) sowie der Positiv-Kontrolle (CD63=  $44,5 \pm 18,2$ / CD203c=  $49,8 \pm 16,6$ ) über der Basophilenaktivierung des CD63-Protokolls. Bei der höchsten Konzentrationsstufe an Wespengift (W 1: CD63=  $19,3 \pm 24,5$ / CD203c=  $19,1 \pm 17,7$ ) und für die Negativ-Kontrolle (CD63=  $5,3 \pm 3,1$ / CD203c=  $3,5 \pm 1,6$ ) lieferte die Detektion von CD63 höhere Werte als bei der CD203c-Bestimmung (s. Abb. 9).

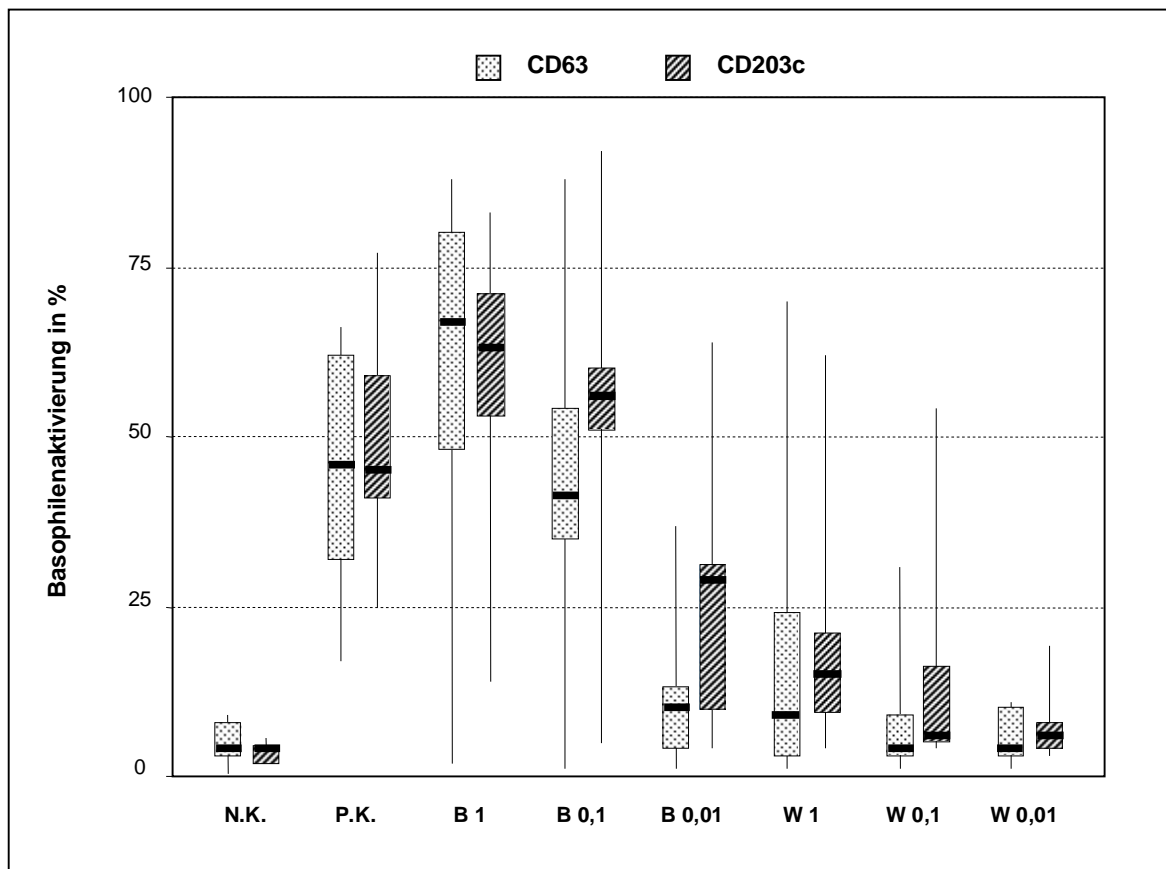


**Abbildung 9: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Patienten mit Bienengiftallergie (n= 9) als Mittelwerte und deren Standardabweichungen.** Ergebnisse der Oberflächenexpression von CD63 und CD203c nach Stimulation der Proben mit einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K) sowie Bienen (B)- und Wespengift (W) unterschiedlicher Konzentrationen in der Einheit  $\mu\text{g/ml}$ . Als Schwellenwert (Cut-Off) für ein positives Testergebnis gilt eine Aktivierung von über 14% im CD203c- und über 15% im CD63-Protokoll.

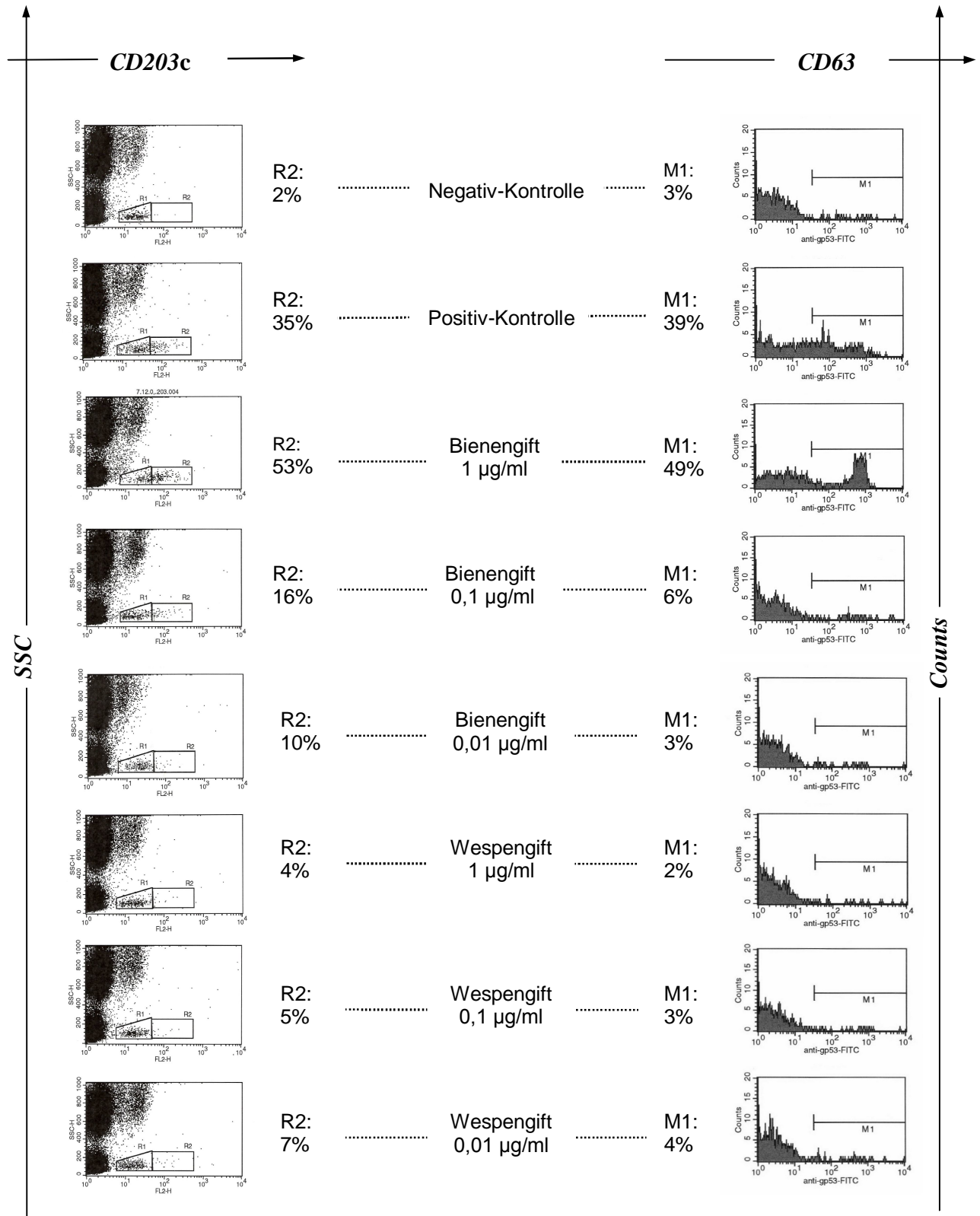
Zum Zeitpunkt der Durchführung des BAT befanden sich die Patienten der Gruppe mit Bienengiftallergie durchschnittlich seit  $9,1 (\pm 14,5)$  Monaten in der spezifischen Immuntherapie gegen Bienengift und der letzte Insektenstich lag im Mittel  $22,4 (\pm 20,6)$  Monate zurück. Die Zeitdifferenz betrug zwischen BAT und Hauttest  $9,9 (\pm 14,1)$  Monate und zwischen BAT und spezifischer Antikörper-Bestimmung  $7,4 (\pm 14,0)$  Monate im Schnitt.

Die Streubreite und Verteilung sowie die Medianwerte der Ergebnisse beider BAT-Ansätze der Patienten mit Bienengiftallergie zeigt Abbildung 10. Dabei wurde im CD63-Ansatz bei der Bienengiftkonzentration B 0,1 mit 0,4% die geringste und bei der Konzentration B 1 mit 88,9% die höchste Basophilenaktivierung gemessen. Im CD203c-Protokoll wurden Werte zwischen 3,7% (B 0,01) und 91,7% (B 0,1) bei der Testung gegen Bienengift gemessen. Hinsichtlich der Testung gegen Wespengift wurden im CD63-BAT Ergebnisse zwischen 0,8% (W 1+W 0,1) und 69,6% (W 1) erreicht. Der CD203c-BAT lieferte diesbezüglich Werte von 2,6% (W 0,01) bis 62,3% (W1).

Die einzelnen Messwerte des CD63- und CD203c-BAT eines Patienten mit Bienengiftallergie sind in Abbildung 11 dargestellt.



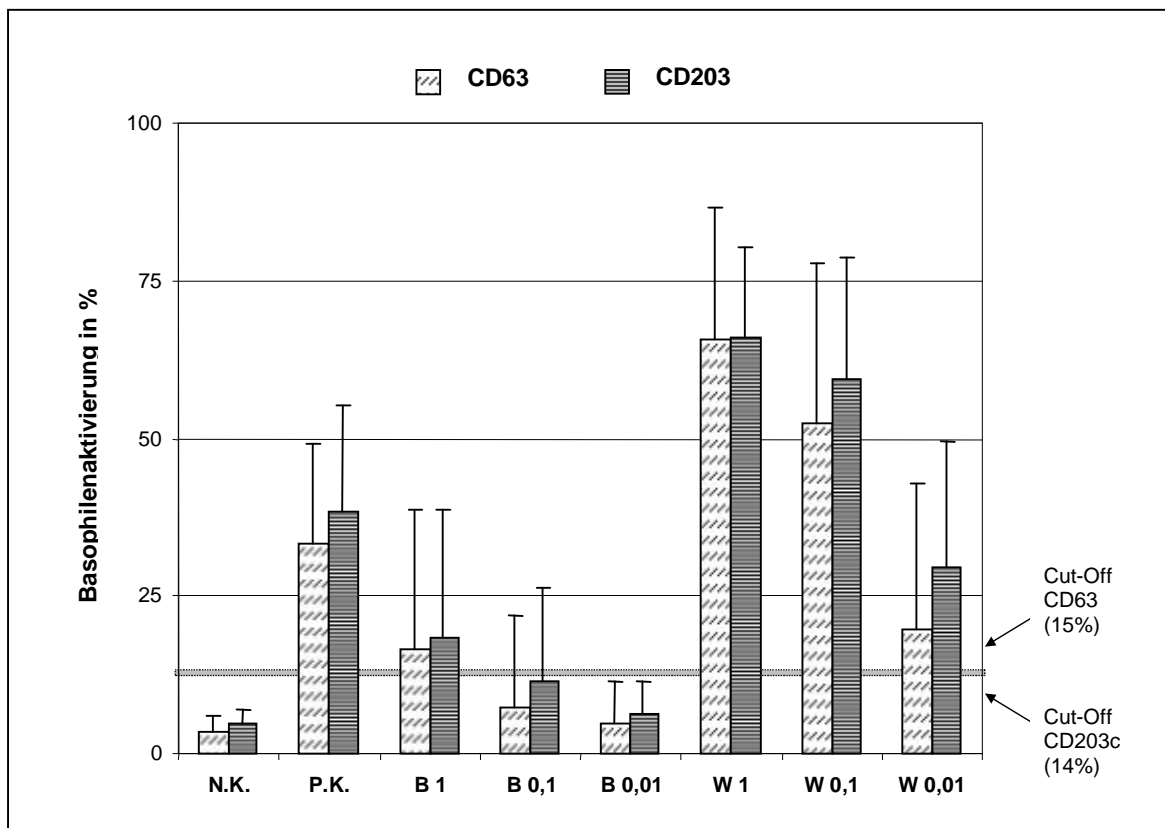
**Abbildung 10: Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT bei Patienten mit Bienengiftallergie (n= 9).** Dargestellt sind die Streubreite der Werte ( | ), der Bereich zwischen 1. und 3. Quartil (senkrechte Balken) und der Median (—) der CD63- und CD203c-Protokolle für die jeweiligen Probenansätze einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K.) sowie verschiedener Konzentrationen an Bienen (B)- und Wespengift (W) in der Einheit µg/ml.



**Abbildung 11: Messergebnisse eines Bienengiftallergikers (Pat. Nr. 2).** Darstellung der SSC/FL2-Dotplot-Diagramme mit den Gates R1 und R2 für die Bestimmung der CD203c-Expression sowie der FL1-Histogramme für die Detektion von CD63. Die errechneten Werte aus R2 und M1 gelten als Maß für die prozentuale Aktivierung basophiler Granulozyten nach Exposition mit Insektengift unterschiedlicher Konzentrationen und einer Negativ- (Waschlösung) und Positiv-Kontrolle (fMLP).

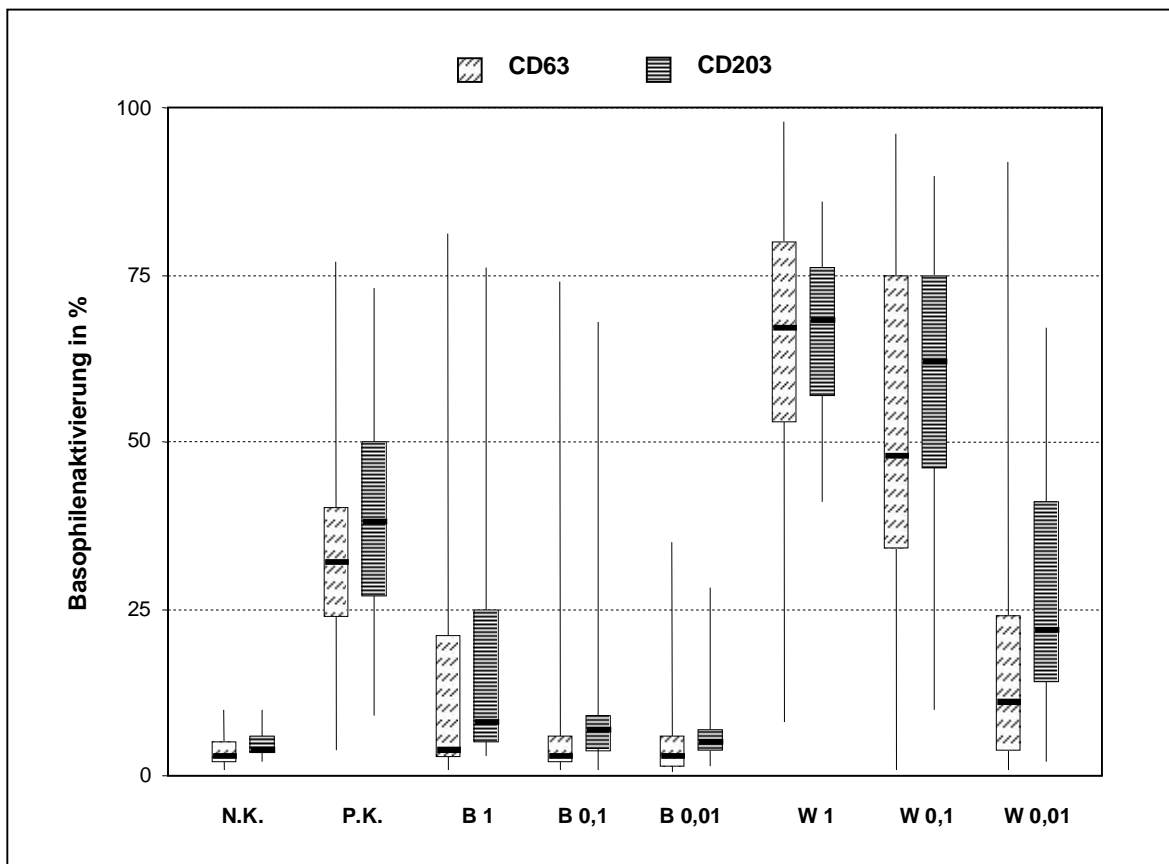
### Patienten mit Wespengiftallergie

Das Resultat der Messungen in der Gruppe der Wespengiftallergiker waren 27 (100%) positive Testergebnisse gegen 1 µg/ml Wespengift im CD203c- und 26 (96,3%) positive Ergebnisse im CD63-Testansatz. Die Testung mit 0,1 bzw. 0,01 µg/ml Wespengift ergab im CD63-BAT 25 bzw. 10 positive Ergebnisse sowie im CD203c-BAT 26 bzw. 20 positive Messungen. Zudem zeigten 7 Personen im CD63- und 9 Personen im CD203c-Protokoll auch positive Testergebnisse gegen 1 µg/ml Bienengift. Die Ergebnisse der Wespengift- sowie der Bienengiftkonzentrationsstufen erreichten dabei im CD203c-BAT durchschnittlich höhere Werte als im CD63-BAT (W 1: CD63= 65,7 ± 21,0/ CD203c= 66,1 ± 14,1; W 0,1: CD63= 52,5 ± 25,2/ CD203c= 59,4 ± 19,4; W 0,01: CD63= 19,7 ± 23,2/ CD203c= 29,4 ± 20,0; B 1: CD63= 16,5 ± 22,2/ CD203c= 18,6 ± 20,1; B 0,1: CD63= 7,4 ± 14,4/ CD203c= 11,4 ± 15,0; B 0,01: CD63= 4,8 ± 6,6/ CD203c= 6,4 ± 5,0). Ebenso die Werte der Negativ- und Positiv-Kontrolle (N.K.: CD63= 3,6 ± 2,5/ CD203c= 4,8 ± 2,1; P.K.: CD63= 33,2 ± 16,0/ CD203c= 38,4 ± 16,9). (siehe Abb. 12)



**Abbildung 12: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Patienten mit Wespengiftallergie (n=27) als Mittelwerte und deren Standardabweichungen.** Ergebnisse der Oberflächenexpression von CD63 und CD203c nach Stimulation der Proben mit einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K) sowie Bienen (B)- und Wespengift (W) unterschiedlicher Konzentrationen in der Einheit µg/ml. Als Schwellenwert (Cut-Off) für ein positives Testergebnis gilt eine Aktivierung von über 14% im CD203c- und über 15% im CD63-Protokoll.

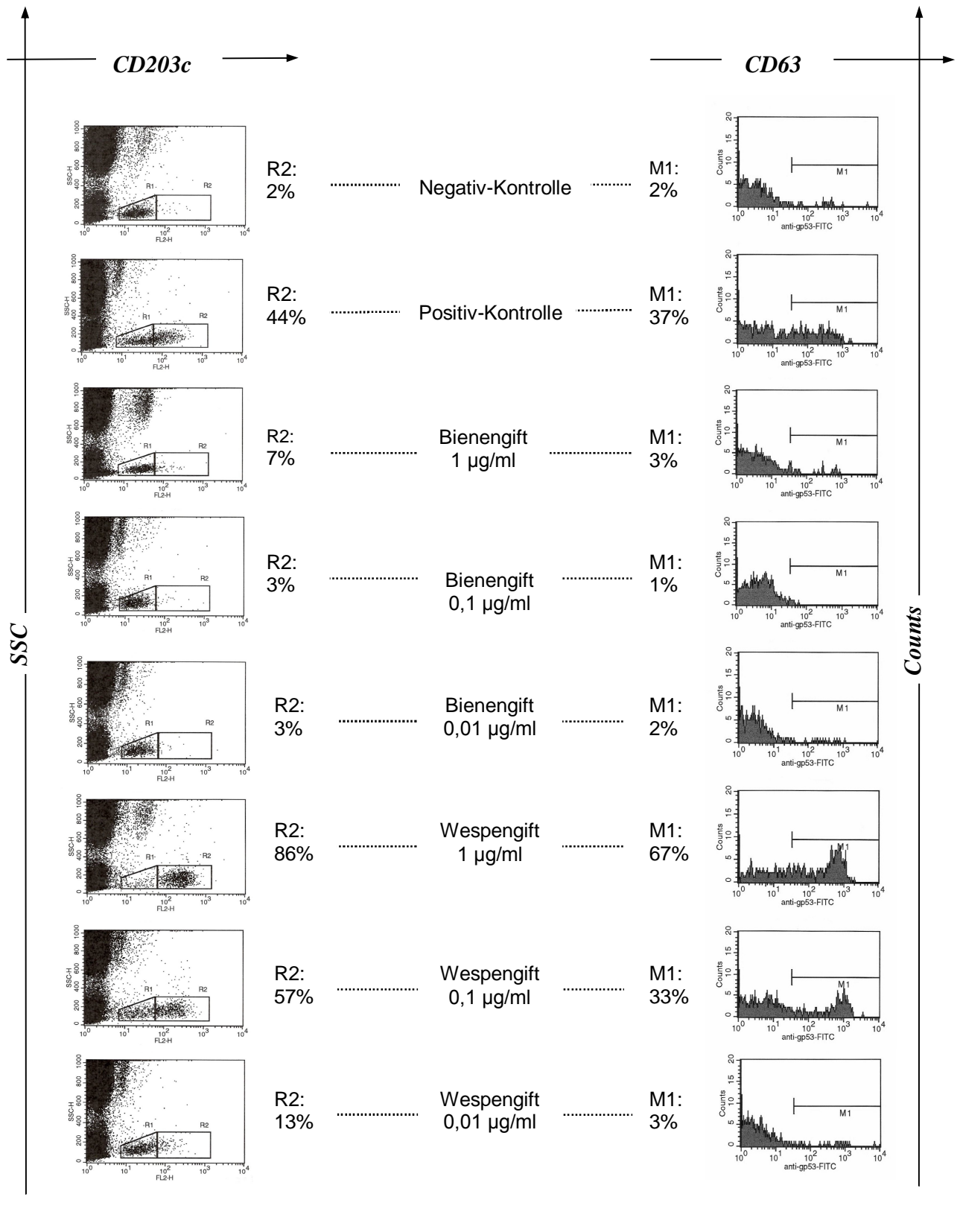
Die Streubreite der Basophilenaktivierung beider BAT-Ansätze sowie die Verteilung und Mediane der Ergebnisse der Patienten mit Wespengiftallergie sind in Abbildung 13 dargestellt. Der niedrigste Aktivierungswert bei der Testung gegen Wespengift wurde mit 1,2% (W 0,01) und der größte Wert mit 98,6% (W 1) im CD63-Ansatz gemessen. Das CD203c-Protokoll lieferte Ergebnisse zwischen 2,3% (W 0,01) und 89,8% (W 0,1). Die Testung gegen Bienengift erbrachte Werte von 0,4% (B 0,1) bis 81,5% (B 1) im CD63- und Werte zwischen 0,9% (B 0,1) und 76,4% (B 1) im CD203c-BAT.



**Abbildung 13:** Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT bei Patienten mit Wespengiftallergie (n=27). Dargestellt sind die Streubreite der Werte ( | ), der Bereich zwischen 1. und 3. Quartil (senkrechte Balken) und der Median (—) der CD63- und CD203c-Protokolle für die jeweiligen Probenansätze einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K.) sowie verschiedener Konzentrationen an Bienen (B)- und Wespengift (W) in der Einheit  $\mu\text{g/ml}$ .

Zum Zeitpunkt der BAT-Durchführung lag die durchschnittliche Dauer der begonnenen spezifischen Immuntherapie gegen Wespengift bei 3,4 ( $\pm$  7,2) Monaten. Die letzte anaphylaktische Reaktion auf einen Insektenstich lag im Mittel 28,9 ( $\pm$  46,5) Monate zurück, der Abstand zum Hauttest betrug 6,4 ( $\pm$  11,7) Monate und die Zeitspanne zwischen RAST und BAT ergab eine mittlere Dauer von 6,7 ( $\pm$  11,6) Monaten.

Die Ergebnisse der Basophilenaktivierung beider BAT-Ansätze eines Wespengiftallergikers sind in Abbildung 14 zu sehen.

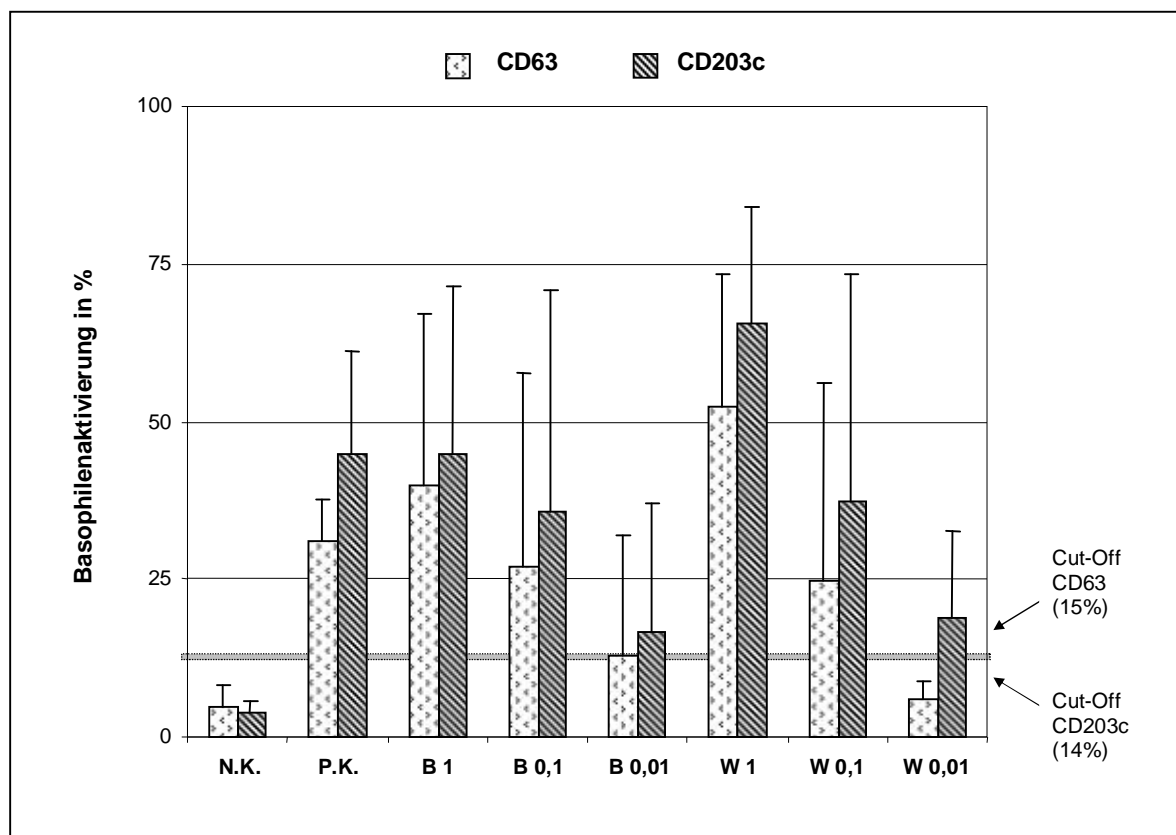


**Abbildung 14: Messergebnisse eines Wespengiftallergikers (Pat. Nr. 17).** Darstellung der SSC/FL2-Dotplot-Diagramme mit den Gates R1 und R2 für die Bestimmung der CD203c-Expression sowie der FL1-Histogramme mit den Messbereichen M1 für die Detektion von CD63. Die errechneten Werte aus R2 und M1 gelten als Maß für die prozentuale Aktivierung basophiler Granulozyten nach Exposition mit Insektengift unterschiedlicher Konzentrationen und einer Negativ (Waschlösung)- und Positivkontrolle (fMLP).



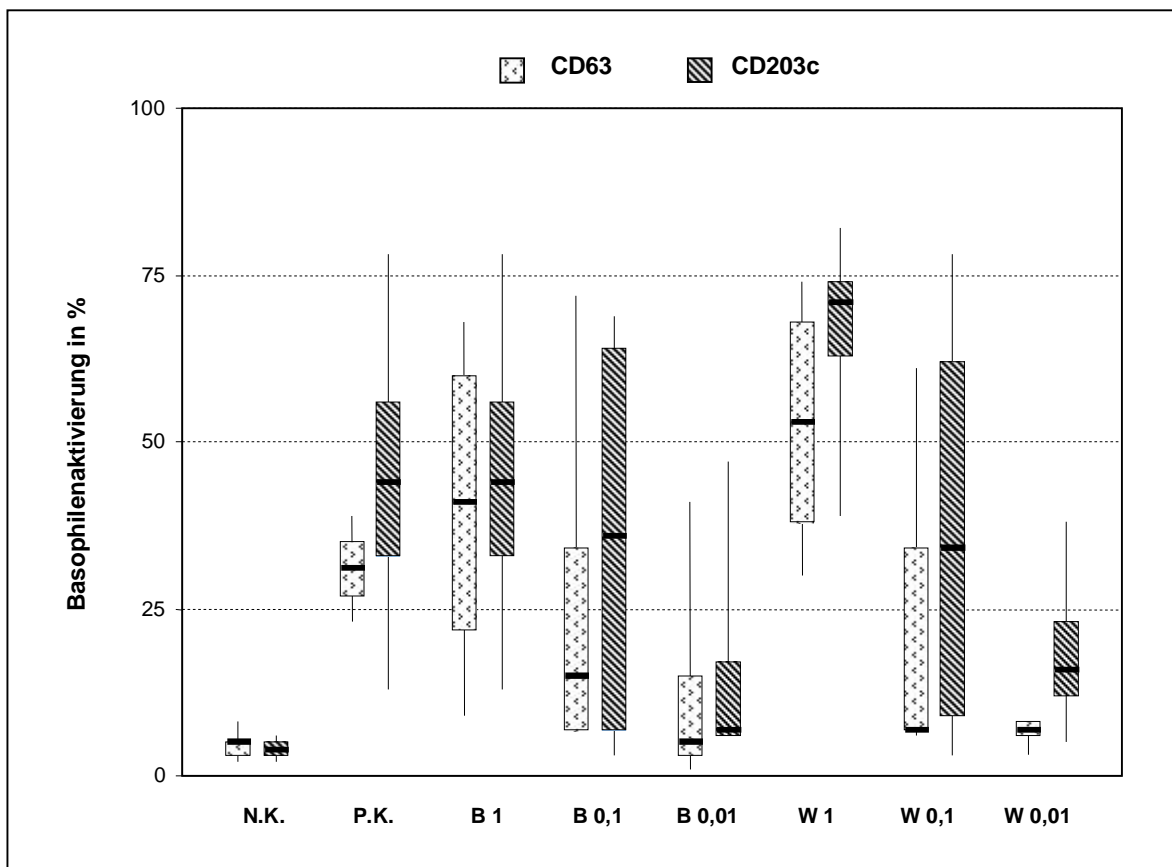
## Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie

In der Gruppe mit allergischen Reaktionen auf beide Insektenarten lieferten sowohl der CD63- als auch der CD203c-BAT bei 3 von 4 Patienten (75%) positive Ergebnisse gegen beide Insektengifte bei der Konzentration 1 µg/ml. Bei einer Person konnte durch beide Testansätze lediglich ein positives Resultat bei der Testung gegen Wespengift, jedoch nicht gegen Bienengift bei dieser Konzentration ermittelt werden. Bei den Giftkonzentrationen 0,1 µg/ml zeigten beide BAT-Ansätze bei 2 Personen eine Doppelsensibilisierung an, die im CD203c-BAT auch noch bei den Konzentrationen 0,01 µg/ml bei diesen Personen bestätigt werden konnte. Im CD63-BAT war das Ergebnis bei der letzten Verdünnung in einem Fall ausschließlich gegen Bienengift positiv. Die mittlere Basophilenaktivierung der Patienten lag im CD63-Protokoll bei allen Konzentrationsstufen der Insektengifte sowie der Positiv-Kontrolle unter derjenigen des CD203c-Ansatzes (B 1: CD63= 39,9 ± 27,3/ CD203c= 44,7 ± 26,9; B 0,1: CD63= 27,1 ± 30,7/ CD203c= 35,9 ± 35,0; B 0,01: CD63= 12,9 ± 19,1/ CD203c= 16,5 ± 20,4; W 1: CD63= 52,4 ± 20,8/ CD203c= 65,5 ± 18,5; W 0,1: CD63= 24,9 ± 31,4/ CD203c= 37,2 ± 36,1; W 0,01: CD63= 6,0 ± 2,7/ CD203c= 18,7 ± 13,9, P.K.: CD63= 30,9 ± 6,8/ CD203c= 44,8 ± 16,3). Lediglich der Mittelwert der Negativ-Kontrollen (CD63= 4,8 ± 3,5/ CD203c= 3,8 ± 1,9) überstieg im CD63-Ansatz den Wert des CD203c-Protokolls (siehe Abb. 15).



**Abbildung 15:** Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie (n= 4) als Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Ergebnisse der Oberflächenexpression von CD63 und CD203c nach Stimulation der Proben mit einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K) sowie Bienen (B)- und Wespengift (W) unterschiedlicher Konzentrationen in der Einheit µg/ml. Als Schwellenwert (Cut-Off) für ein positives Testergebnis gilt eine Aktivierung von über 14% im CD203c- und über 15% im CD63-Protokoll.

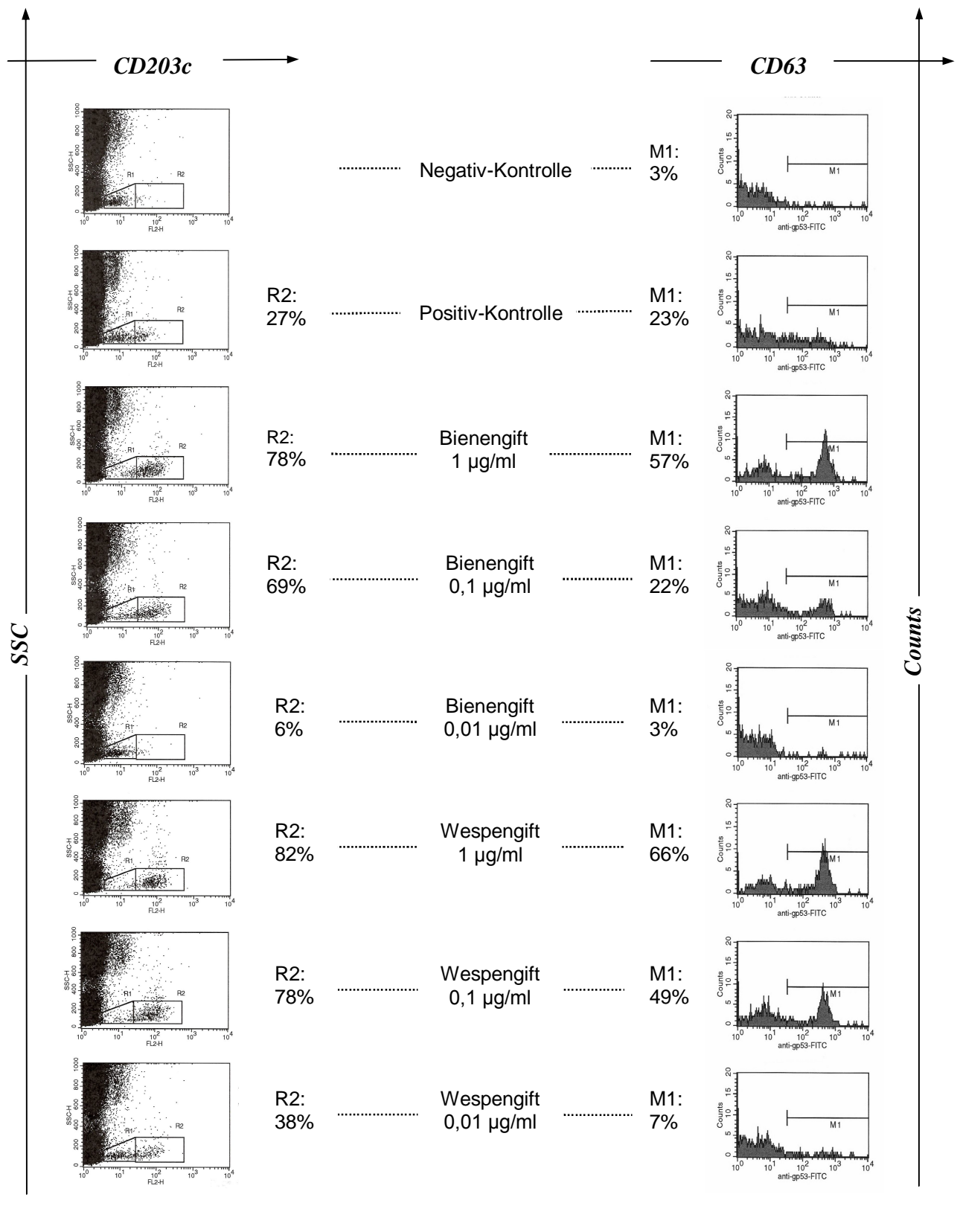
Eine Übersicht über die Streubreite, Verteilung und Mediane aller Messwerte der Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie für die jeweiligen Probenansätze liefert Abbildung 16. Im CD63-BAT wurden bei der Testung gegen Bienengift Aktivierungswerte zwischen 0,9% (B 0,01) und 71,9% (B 0,1) erreicht, im CD203c-BAT reichten die Werte von 3,3% (B 0,1) bis 78,1% (B 1). Die Messungen der Testung gegen Wespengift erbrachten als niedrigsten Wert 1,9% (W 0,01) im CD63- und 3,2% (W 0,1) im CD203c-Ansatz. Den höchsten Aktivierungsgrad lieferte mit 81,8% (W 1) das CD203c-Protokoll, der höchste Wert des CD63-Protokolls war 73,6% (W 1).



**Abbildung 16: Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT bei Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie (n= 4).** Dargestellt sind die Streubreite der Werte ( | ), der Bereich zwischen 1. und 3. Quartil (senkrechte Balken) und der Median (—) der CD63- und CD203c-Protokolle für die jeweiligen Probenansätze einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K.) sowie verschiedener Konzentrationen an Bienen (B)- und Wespengift (W) in der Einheit  $\mu\text{g/ml}$ .

Eine spezifische Immuntherapie wurde in dieser Gruppe durchschnittlich vor 17,5 ( $\pm$  19,3) Monaten begonnen, wobei die letzte Stichreaktion im Mittel 22,3 ( $\pm$  22,8) Monate zurück lag. Die Durchführung von BAT und Hauttest lag 29,3 ( $\pm$  20,4) und diejenige von BAT und spezifischer Antikörperbestimmung 29,0 ( $\pm$  20,1) Monate im Durchschnitt auseinander.

Die einzelnen Messwerte eines Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie im CD63- und CD203c-BAT sind in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Messergebnisse eines Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie (Pat. Nr. 33).** Darstellung der SSC/FL2-Dotplot-Diagramme mit den Gates R1 und R2 für die Bestimmung der CD203c-Expression sowie der FL1-Histogramme mit den Messbereichen M1 für die Detektion von CD63. Die korrelierten Werte aus R2 und M1 gelten als Maß für die prozentuale Aktivierung basophiler Granulozyten nach Exposition mit Insektengift unterschiedlicher Konzentrationen und einer Negativ (Waschlösung)- und Positiv-Kontrolle (fMLP).

### Patienten ohne Sensibilisierungsnachweis durch die Standarddiagnostik

Der CD63-BAT lieferte bei der Untersuchung von 2 Patientinnen ohne Sensibilisierungsnachweis gegen Insektengift im Hauttest und bei der spezifischen IgE-Bestimmung kein positives Testergebnis weder gegen Bienen- noch gegen Wespengift. Im CD203c-BAT zeigte sich hingegen bei einer Patientin (Nr.42) ein positives Testresultat auf Wespengift mit einer Basophilenaktivierung von 24,7% bei der höchsten Wespengiftkonzentrationsstufe. Die Ergebnisse der einzelnen Probenansätze der zwei Patientinnen zeigt Tabelle 11.

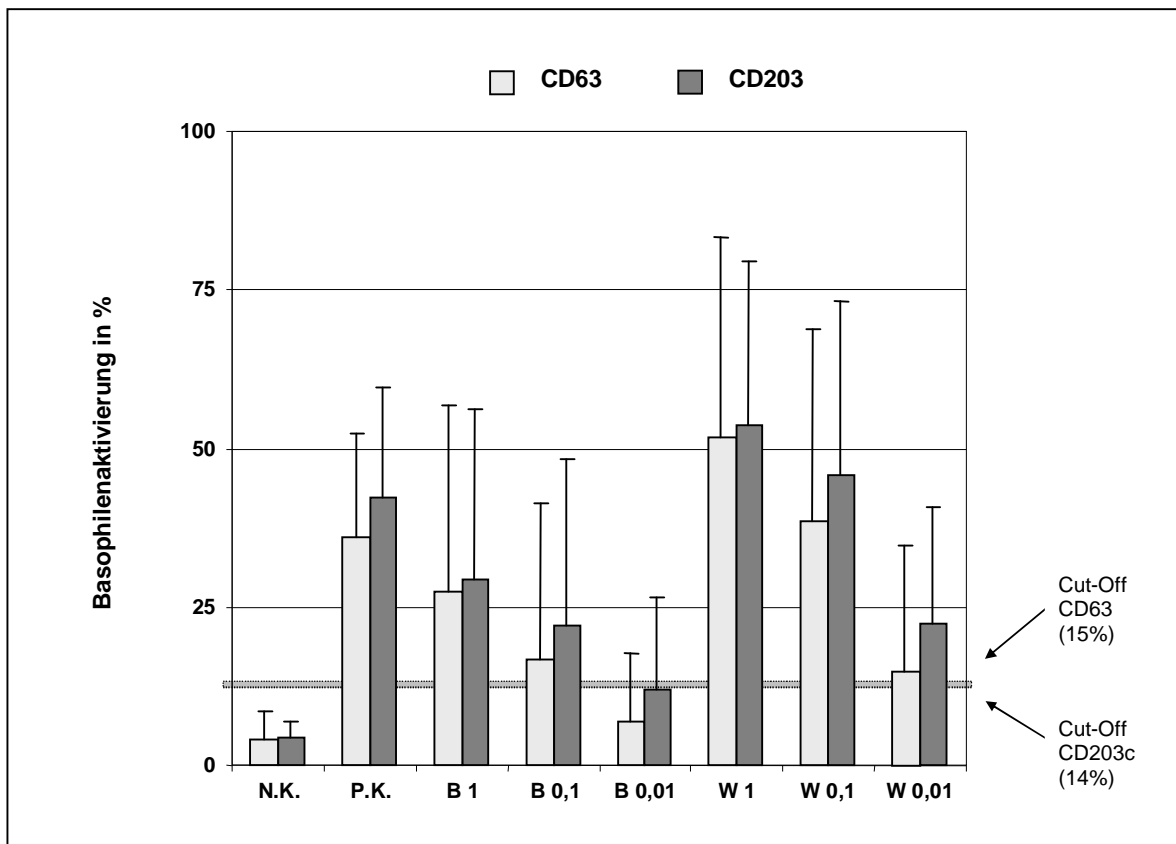
**Tabelle 11: Ergebnisse der prozentualen Basophilenaktivierung im CD63- und CD203c-BAT von 2 Patientinnen mit positiver Stichanamnese und negativen Ergebnissen in Hauttest und spezifischer IgE-Bestimmung.**

Patientin	BAT	N.K.	P.K.	B 1	B 0,1	B 0,01	W 1	W 0,1	W 0,01
<b>Nr.41</b>	CD63	6,7	21,8	5,0	6,3	7,4	3,4	5,3	8,6
	CD203c	3,4	37,7	7,9	7,3	4,3	7,2	5,7	4,2
<b>Nr.42</b>	CD63	1,6	58,2	4,2	1,3	1,3	4,6	1,9	1,4
	CD203c	1,9	68,7	3,4	2,2	2,1	24,7	9,8	1,8

Die Zeitspanne zwischen der letzten allergischen Reaktion auf einen Insektenstich und der Durchführung des BAT betrug 31 Monate bei Patientin Nr. 39 und 96 Monate bei Patientin Nr. 42. Der Hauttest sowie die giftspezifische Antikörper-Bestimmung lagen jeweils 7 Monate bei Patientin Nr. 39 und jeweils 1 Monat bei Patientin Nr. 42 vom Zeitpunkt der BAT-Durchführung auseinander.

### Gesamtkollektiv

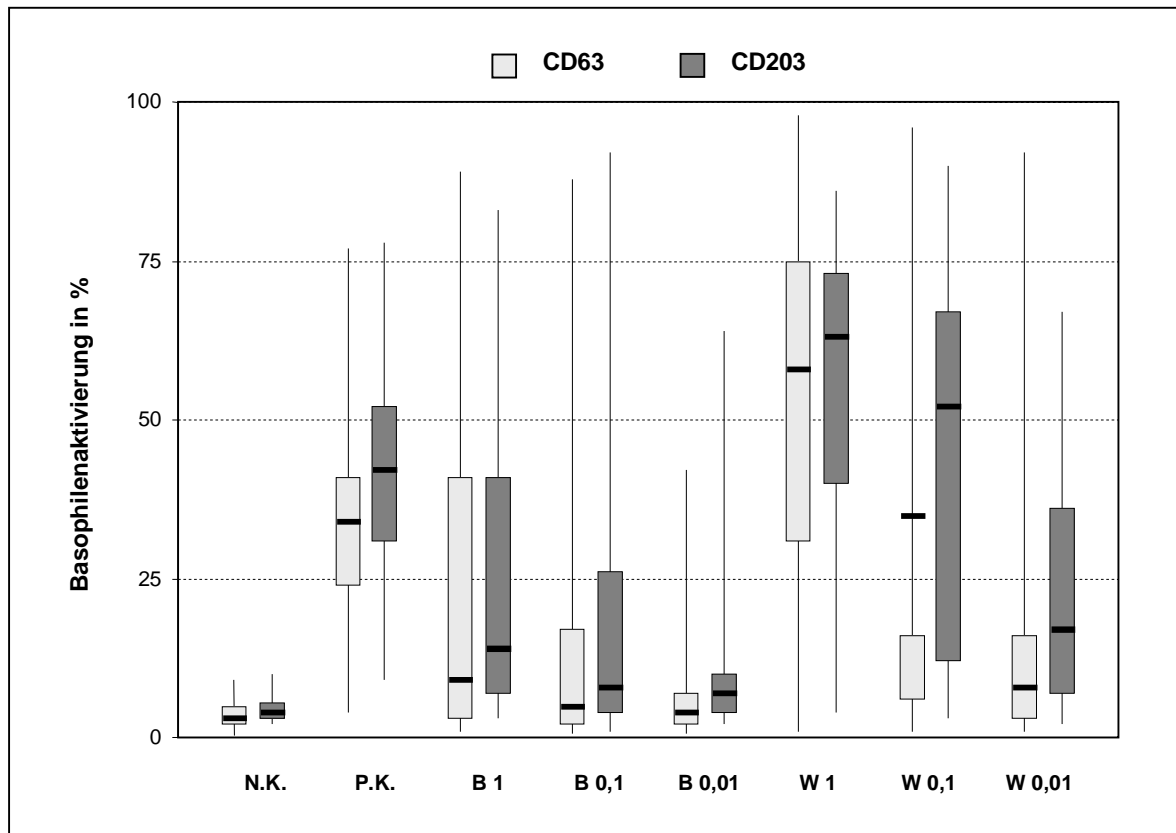
Die Mittelwerte der prozentualen Basophilenaktivierung lagen in Bezug auf das gesamte Patientenkollektiv bei Detektion von CD203c in allen Konzentrationsstufen sowohl für Bienengift als auch für Wespengift (nicht signifikant) über den Werten des CD63-Protokolls (B 1: CD63= 27,5 ± 29,5/ CD203c= 29,3 ± 26,9; B 0,1: CD63=16,8 ± 24,6/ CD203c= 22,1 ± 26,2; B 0,01: CD63= 6,9 ± 9,5/ CD203c= 11,9 ± 14,8; W 0,1: CD63= 38,2 ± 30,1/ CD203c= 45,6 ± 28,1; W 0,01: CD63= 14,7 ± 19,8/ CD203c= 22,4 ± 19,4; W 1: CD63= 54,4 ± 31,7/ CD203c= 52,9 ± 25,8). Darüber hinaus waren die Werte des CD203c-BAT bei der Negativ- (CD63= 4,1 ± 2,7/ CD203c= 4,4 ± 2,0) und Positiv-Kontrolle (CD63= 35,8 ± 16,4/ CD203c= 42,2 ± 17,2) höher als diejenigen des CD63-Ansatzes. (s.Abb.18)



**Abbildung 18:** Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT als Mittelwerte und deren Standardabweichungen von 42 Patienten mit allergischer Reaktion nach einem Insektenstich. Ergebnisse der Oberflächenexpression von CD63 und CD203c nach Stimulation der Proben mit einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K) sowie Bienen (B)- und Wespengift (W) unterschiedlicher Konzentrationen in der Einheit  $\mu\text{g/ml}$ . Als Schwellenwert (Cut-Off) für ein positives Testergebnis gilt eine Aktivierung von über 14% im CD203c- und über 15% im CD63-Protokoll.

Einen Gesamtüberblick über die Streubreite, Verteilung und Mediane der Messwerte aller Patienten liefert Abbildung 19. Im CD63-BAT wurden insgesamt bei der Testung gegen Bienengift Aktivierungswerte zwischen 0,4% (B 0,1) und 88,9% (B 1) erreicht, im CD203c-BAT reichten die Werte von 0,9% (B 0,1) bis 91,7% (B 0,1). Die Messungen der Testung gegen Wespengift erbrachten als niedrigsten Wert 0,8% (W 0,1) im CD63- und 3,2% (W 0,1) im CD203c-Ansatz. Den höchsten Aktivierungsgrad zeigte mit 98,6% (W 1) der CD63-BAT und der höchste Wert des CD203c-BAT lag bei 89,8% (W 1) bei den Testergebnissen gegen Wespengift.

Zum Zeitpunkt der BAT-Messungen lag der Beginn einer SIT durchschnittlich 6,1 Monate zurück und die letzte allergische Stichreaktion ereignete sich im Mittel vor 28,5 ( $\pm 40,2$ ) Monaten. Beide BAT-Ansätze wurden im Schnitt 9,2 ( $\pm 14,2$ ) nach der Hauttestung und 8,9 ( $\pm 14,0$ ) Monate nach der Bestimmung giftspezifischer IgE-Antikörper durchgeführt.



**Abbildung 19: Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT von 42 Patienten mit allergischen Stichreaktionen.** Dargestellt sind die Streubreite der Werte ( | ), der Bereich zwischen 1. und 3. Quartil (senkrechte Balken) und der Median (—) der CD63- und CD203c-Protokolle für die jeweiligen Probenansätze einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K.) sowie verschiedener Konzentrationen an Bienen (B)- und Wespengift (W) in der Einheit  $\mu\text{g/ml}$ .

#### Korrelation der Ergebnisse des CD63- und CD203c-BAT

Des Weiteren wurde die Korrelation ( $r$ ) der prozentualen Basophilenaktivierung zwischen dem CD63- und dem CD203c-BAT für die 8 Probenansätze aller Patienten errechnet. Dabei konnte in Bezug auf die Insektengifte bei der höchsten Bienengiftkonzentration die größte ( $r = 0,89$ ) und bei der niedrigsten Wespengiftkonzentration die geringste ( $r = 0,48$ ) Wechselbeziehung beider Testansätze ermittelt werden (s. Tab. 12). Den niedrigsten Korrelationskoeffizienten lieferte der Vergleich der Negativkontrollen.

**Tabelle 12: Korrelation ( $r$ ) der Ergebnisse des CD63- und CD203c-BAT der 8 Probenansätze des gesamten Patientenkollektivs.**

	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Bienengift 1 $\mu\text{g/ml}$	Bienengift 0,1 $\mu\text{g/ml}$	Bienengift 0,01 $\mu\text{g/ml}$	Wespengift 1 $\mu\text{g/ml}$	Wespengift 0,1 $\mu\text{g/ml}$	Wespengift 0,01 $\mu\text{g/ml}$
<b>r</b>	0,16	0,64	0,89	0,84	0,63	0,73	0,81	0,48

Zudem wurden die Korrelationen beider BAT-Ansätze in den einzelnen Allergieguppen hinsichtlich der Ergebnisse bei Testung gegen Bienen- und Wespengift untersucht. Dabei zeigte sich eine stärkere Korrelation der prozentualen Basophilenaktivierung zwischen beiden BAT-Protokollen bei der Reaktion auf Bienen- als auf Wespengift (s. Tabelle 13).

**Tabelle 13: Korrelation der Ergebnisse des CD63- und CD203c-BAT bei Patienten mit Insektengiftallergie.**

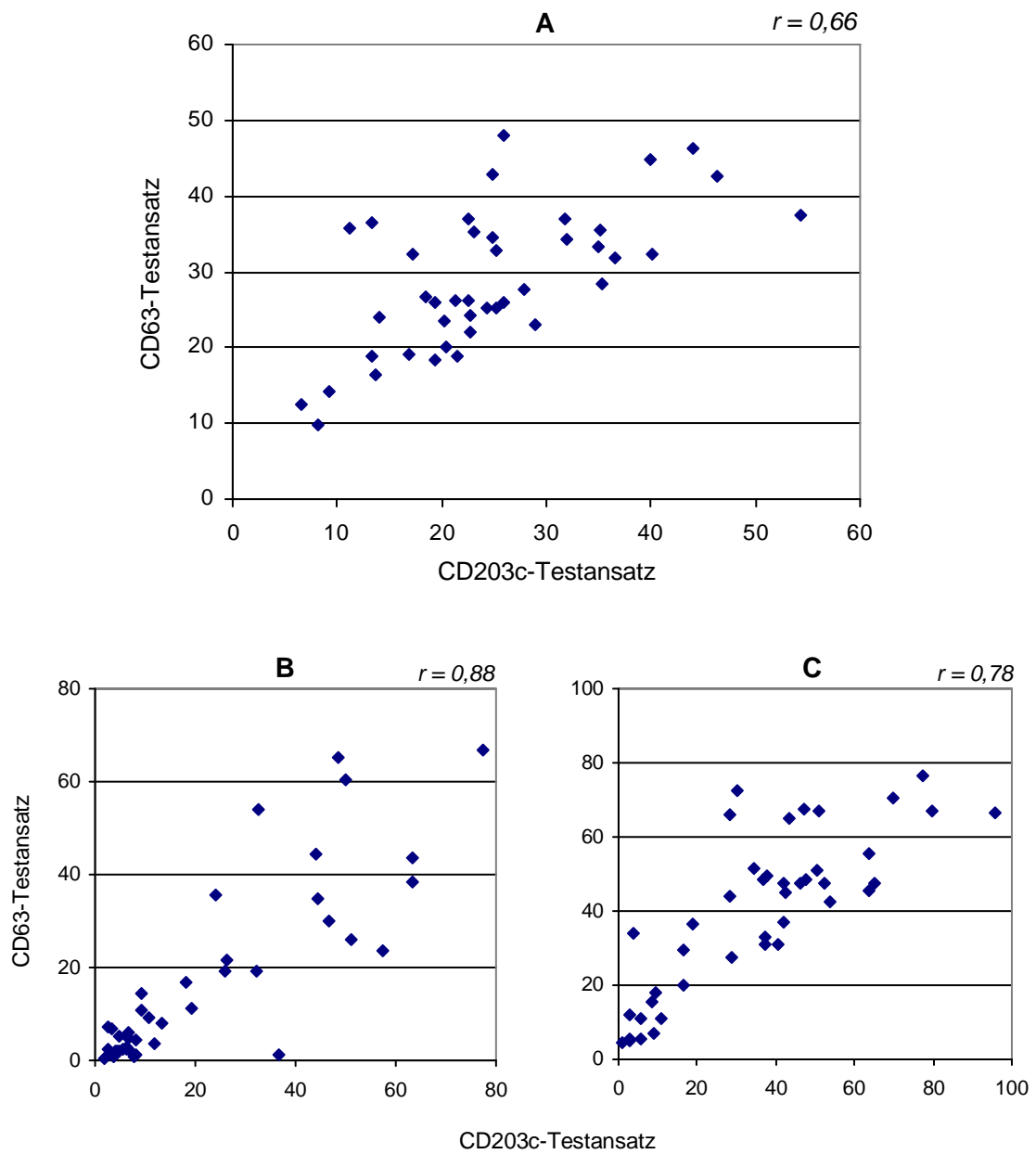
<b>Allergie gegen</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Korrelation</b>	
		Bienengift	Wespengift
<i>Bienengift</i>	9	0,82	0,60
<i>Wespengift</i>	27	0,78	0,67
<i>Bienen- und Wespengift</i>	4	0,77	0,90
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>0,85</b>	<b>0,77</b>

Für jeden Patienten wurde die durchschnittliche Basophilenaktivierung der 3 Bienen- und der 3 Wespengiftkonzentrationsstufen berechnet und darüber hinaus der Mittelwert aller Probenansätze für beide BAT-Ansätze bestimmt.

Der Vergleich dieser Mittelwerte zeigte eine durchschnittlich höhere Basophilenaktivierung im CD203c-BAT als im CD63-BAT bei beiden Insektengifttestungen in der Gruppe der Bienengiftallergiker (Bienengift: CD63=  $38,2 \pm 20,8$ / CD203c=  $46,8 \pm 20,8$ ; Wespengift: CD63=  $10,8 \pm 11,4$ / CD203c=  $14,8 \pm 11,7$ ) wie auch bei den Wespengiftallergikern (Wespengift: CD63=  $47,5 \pm 19,8$ / CD203c=  $51,3 \pm 15,2$ ; Bienengift: CD63=  $9,6 \pm 12,5$ / CD203c=  $12,1 \pm 12,5$ ) und den Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie (Bienengift: CD63=  $26,6 \pm 24,1$ / CD203c=  $32,4 \pm 21,4$ ; Wespengift: CD63=  $28,8 \pm 16,1$ / CD203c=  $40,5 \pm 21,4$ ), die jedoch nicht signifikant ist.

Die Korrelation der Mittelwerte beider BAT-Ansätze lag für Bienengift mit  $r = 0,88$  über dem Wert von  $r = 0,78$  für Wespengift. Der Vergleich der Mittelwerte aus allen Probenansätzen ergab einen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,66$  (s. Abb. 20).

### Prozentuale Basophilenaktivierung



**Abbildung 20: Korrelationen ( $r$ ) der prozentualen Basophilenaktivierung zwischen dem CD63- und dem CD203c-BAT. Dargestellt sind die Ergebnisse (Mittelwerte) aller 8 Probenansätze (A), sowie der 3 Bienengift- (B) und Wespengiftkonzentrationsstufen (C) des gesamten Patientenkollektivs im jeweiligen Testansatz.**



### 3.1.4. Vergleich der Ergebnisse von BAT und Standarddiagnostik

Für den in dieser Arbeit durchgeführten CD63- und CD203c-BAT wurde die jeweilige Testsensitivität in Bezug auf Anamnese, Hauttestung und Bestimmung giftspezifischer IgE-Antikörper bestimmt (s.Tab.14).

#### *BAT und Anamnese*

Bei 7 (87,5%) von 8 Patienten, die allergische Reaktionen nach einem Bienenstich angaben, fiel der CD63-BAT positiv aus bei der Testung gegen Bienengift. Im CD203c-BAT war das Testergebnis diesbezüglich bei allen Patienten positiv (100%).

In der Gruppe mit allergischer Reaktion nach einem Wespenstich zeigte der CD63-BAT 23 (95,8%) positive Ergebnisse gegen Wespengift. Das Resultat im CD203c-Ansatz waren 24 (100%) positive Testergebnisse gegen Wespengift. Die Patienten mit anamnestisch angegebener Allergie gegen beide Insekten lieferten in beiden BAT-Ansätzen in 2 (66,7%) Fällen positive Testergebnisse gegen beide Insektengifte. Von den 35 Patienten, die das Insekt von dem sie gestochen wurden identifizieren konnten, stimmten die Testergebnisse des CD63-BAT in 32 (91,4%) Fällen und diejenigen des CD203c-BAT bei 34 (97,1%) Patienten positiv mit der Anamnese überein.

#### *BAT und Hauttest*

In der Gruppe der Bienengiftallergiker konnte mit dem CD203-BAT in allen 9 (100%) Fällen ein übereinstimmend positives Ergebnis mit dem Hauttest bezüglich der Bienengift-Testung ermittelt werden. Im CD63-BAT waren es 8 (88,9%) Übereinstimmungen mit der Hauttestung gegen Bienengift. Bei den 27 Wespengiftallergikern, die alle ein positives Hauttestergebnis gegen Wespengift aufwiesen, konnte eine Allergie gegen Wespengift in 27 Fällen (100%) bei der Detektion von CD203c und in 26 (96,3%) Fällen bei der CD63-Bestimmung bekräftigt werden. Die vier Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie hatten alle positive Hauttestergebnisse gegen beide Insektengifte. Beide BAT-Ansätze lieferten diesbezüglich bei 3 Patienten (75%) übereinstimmende Testergebnisse. In einem Fall konnte durch beide Protokolle lediglich eine Wespengiftsensibilisierung festgestellt werden. Das CD63-BAT-Ergebnis für Bienen- sowie für Wespengift fiel bei den 2 Patientinnen mit negativen Hauttests gegen beide Insektengifte übereinstimmend negativ aus. Der CD203c-Ansatz ergab bei einer Patientin ein positives Testergebnis gegen Wespengift.

Ohne Rücksicht auf die Gruppenzuteilung sind die Hauttest- und BAT-Ergebnisse der 42 Patienten hinsichtlich der Testung gegen beide Insektengifte in Tabelle 14 zusammengefasst. Ein positives Hauttestresultat nur gegen Bienengift hatten 8 Patienten. Ein gleichnamiges positives Ergebnis gegen Bienen- und negatives Ergebnis gegen Wespengift zeigten im CD63-BAT 5 und im CD203c-BAT 4 dieser Personen. Von 23 Patienten, deren Hauttest lediglich bei der Testung gegen Wespen-, jedoch nicht gegen Bienengift positiv ausfiel, konnten beide BAT-Ansätze bei 20 Personen ein entsprechend positives Ergebnis gegen Wespengift sowie eine negative Testung gegen Bienengift aufzeigen. Ein positiver Hauttest gegen beide Insektengifte wurde bei 9 Patienten ermittelt. Identische Testresultate hinsichtlich eines positiven Ergebnisses sowohl gegen Bienen- als auch gegen Wespengift lieferten der CD63-Ansatz in 7 und der CD203c-Ansatz in 8 Fällen.

Unabhängig der Testergebnisse auf das jeweils andere Insektengift wiesen von 42 Patienten insgesamt 17 Patienten einen positiven Hauttest gegen Bienen- und 32 Patienten ein positives Hauttestergebnis gegen Wespengift auf. Der CD63-BAT ergab bei zuerst genannten Personen in 15 und der CD203c-BAT in 16 Fällen ebenfalls positive Ergebnisse gegen Bienengift. Fiel die Wespengift-Hauttestung positiv aus, lieferten der CD63-BAT bei 31 und der CD203c-BAT bei 32 Personen ein hierin übereinstimmendes Testergebnis (s. Tab. 14).

**Tabelle 14: Vergleich der BAT-Ergebnisse mit den Ergebnissen aus Hauttest und spezifischer IgE-Bestimmung bei Testung gegen Bienen- (B) und Wespengift (W).**

Hauttest / <i>slgE</i> -Bestimmung		Übereinstimmung mit	
		B A T	
Testergebnis	Anzahl	CD63	CD203c
B : positiv W : negativ	8 / 7	5 (62,5%) / 4 (57,1%)	4 (50%) / 4 (57,1%)
B : negativ W : positiv	23 / 17	19 (82,6%) / 17 (100%)	19 (82,6%) / 16 (94,1%)
B : positiv W : positiv	9 / 16	7 (77,8%) / 10 (62,5%)	8 (88,9%) / 12 (75,0%)
B : negativ W : negativ	2 / 2	2 (100%) / 2 (100%)	1 (50%) / 1 (50%)
<b>Total</b>	<b>42 / 42</b>	<b>33 (78,6%) / 33 (78,6%)</b>	<b>32 (76,2%) / 33 (78,6%)</b>

#### *BAT und spezifische Antikörper-Bestimmung*

Bei allen 9 Patienten mit Bienengiftallergie konnten bienengiftspezifische Antikörper gemessen werden. Ein übereinstimmendes Ergebnis erbrachten der CD63-BAT in 8 (88,9%) und der CD203c-BAT in 9 (100%) Fällen. In der Patientengruppe mit Wespengiftallergie waren es im CD63-BAT 26 (96,3%) und im CD203c-BAT 27 (100%) Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der wespengiftspezifischen IgE-Bestimmung. Die 4 Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie wiesen alle IgE-Antikörper gegen beide Insektengifte auf. Diesbezüglich lieferten beide BAT-Ansätze in 3 (75%) Fällen übereinstimmende Testergebnisse. Bei 2 Patientinnen konnte bei der spezifischen IgE-Bestimmung keine Sensibilisierung gegen Insektengift festgestellt werden. Übereinstimmend negativ fielen beide BAT-Ansätze nur bezüglich der Bienengifttestung aus, da der CD203c-BAT bei einer Patientin ein positives Ergebnis gegen Wespengift zeigte.

Spezifische Antikörper gegen Bienen-, nicht jedoch gegen Wespengift war das Ergebnis bei 7 Patienten. Ein entsprechend positives Resultat lediglich bei der Bienengifttestung zeigten beide BAT-Verfahren bei 4 dieser Personen. Daneben wiesen 17 Patienten ausschließlich wespengiftspezifische Antikörper auf. Dasselbe Testresultat erbrachte bei diesen Patienten der CD63-BAT in allen 17, der CD203c-BAT in 16 Fällen. Bei 16 Patienten konnten spezifische Antikörper gegen beide Insektengifte detektiert werden. Mit positiven Ergebnissen hinsichtlich der Testung gegen beide Giftarten bestätigte der CD63-Ansatz dieses Ergebnis in 10 und der CD203c-BAT in 12 Fällen (s. Tab. 14).

Von insgesamt 23 positiven Testresultaten bei der IgE-Antikörper-Testung gegen Bienengift ergab der CD63-Testansatz 18 und der CD203c-Ansatz 19 Übereinstimmungen, unabhängig von der Gruppenzuteilung. Bei 33 Patienten konnten wespengiftspezifische IgE-Antikörper gemessen werden. Eine Sensibilisierung gegen Wespengift konnte bei diesen Personen durch den CD63-BAT in 31 und durch den CD203c-BAT in 33 Fällen bestätigt werden (s. Tab. 15).

**Tabelle 15: Übereinstimmung von Hauttestung, spezifischer IgE-Bestimmung (slgE-B) und der BAT-Ansätze hinsichtlich der Ergebnisse bei Testung gegen Bienengift (B), Wespengift (W) und beide Insektengifte(B-W).**

Testverfahren			Übereinstimmung			
			B	W	B-W	
Hauttest	-	BAT	-CD63	88,2%	96,9%	78,6%
			-CD203c	94,1%	100%	76,2%
slgE-B	-	BAT	-CD63	78,3%	93,9%	78,6%
			-CD203c	82,6%	100%	78,6%
BAT-CD63	-	BAT-CD203c		92,9%	90,5%	85,7%

#### Sensitivität des CD63- und CD203c-BAT

Für den CD63-BAT lässt sich somit eine Sensitivität von 91,4% und für den CD203c-BAT eine Sensitivität von 97,1% in Bezug auf die Anamnese angeben. Wurden die Patienten der Anamnese entsprechend und/ oder aufgrund eines positiven Hauttests den jeweiligen Insektengiftallergie-Diagnosen zugeteilt, ergibt sich für den CD63-BAT eine Sensitivität von 92,5% sowie für den CD203c-BAT eine Sensitivität von 97,5%. Dementsprechend kann für den CD63- und den CD203c-BAT hinsichtlich einer Diagnosezuteilung aufgrund einer positiven Anamnese und/ oder positiver giftspezifischer Antikörper ebenfalls eine Sensitivität von 92,5% bzw. von 97,5% angegeben werden (s. Tab. 16).

**Tabelle 16: Positive Ergebnisse im BAT auf das jeweilige Insektengift bei Patienten mit Insektengiftallergie.**

Allergie gegen:	Anzahl	CD63-BAT	CD203c-BAT
Bienengift	9	8 ( 87,5%)	9 (100%)
Wespengift	27	26 (95,8%)	27 (100%)
Bienen- und Wespengift	4	3 (75,0%)	3 (75,0%)
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>37 (92,5%)</b>	<b>39 (97,5%)</b>

Bei 32 (91,4%) von 35 Patienten stimmten beide BAT-Testverfahren positiv mit der Anamnese und den Ergebnissen der Standarddiagnostik überein.

Unabhängig von der Anamnese sowie den Resultaten der Hauttestung und der spezifischen IgE-Bestimmung lieferten beide BAT-Protokolle in 39 Fällen identische Ergebnisse bei einer Testung auf Bienengift und in 38 Fällen bei einer Bestimmung gegen Wespengift. Auf beide Insektengifte bezogen waren es 36 Übereinstimmungen in den BAT-Ergebnissen (s. Tab. 15).

#### *BAT-Ergebnisse hinsichtlich der Giftkonzentrationsstufen*

Unabhängig von der Anamnese ergab die Inkubation bei 42 Patienten mit 1 µg/ml Bienen- bzw. Wespengift im CD63-BAT 18 bzw. 33 sowie im CD203c-BAT 21 bzw. 37 positive Testresultate (s. Tab. 17). Eine Aktivierung über die entsprechenden Cut-Offs hinaus zeigten mit 0,1 µg/ml Bienen- bzw. Wespengift im CD63-BAT noch 12 (28,6%) bzw. 28 (66,7%) Personen und im CD203c-BAT 15 (35,7%) bzw. 31 (73,8%) Personen. Bei der geringsten Konzentration mit 0,01 µg/ml Bienen- bzw. Wespengift ermittelte der CD63-Testansatz 4 (9,5%) bzw. 10 (23,8%) und der CD203c-Testansatz 7 (16,7%) bzw. 24 (57,1%) positive Ergebnisse. Je höher die Konzentration an Insektengift, desto höher war auch die durchschnittliche prozentuale Basophilenaktivierung in beiden BAT-Ansätzen ohne signifikante Unterschiede zwischen dem CD63- und CD2003c-BAT. Die Aktivierungswerte unterschieden sich bei den Bienengiftallergikern in beiden BAT-Ansätzen bei Bienengift der Konzentration 0,01 µg/ml signifikant von den Werten der Konzentrationsstufen 0,1 und 1 µg/ml. Eine gleichnamige signifikante Minderung der Basophilenaktivierungshöhe bei der Wespengiftkonzentration 0,01 µg/ml im Vergleich zu den Konzentrationen 0,1 und 1 µg/ml zeigte sich bei Patienten mit Wespengiftallergie ebenfalls in beiden BAT-Protokollen. Darüber hinaus konnte im CD63-BAT ein statistisch bedeutsamer Unterschied zwischen den Wespengiftkonzentrationen 1 und 0,1 µg/ml ermittelt werden. Bei Erreichen des jeweiligen Cut-Offs in einer Giftkonzentrationsstufe nahm die Sensitivität in Bezug auf die Basis-Diagnostik und hinsichtlich des gesamten Patientenkollektivs sowohl im CD63-BAT (92,9%/ 85,7%/ 33,3%) als auch im CD203c-Ansatz mit sinkender Insektengiftkonzentration ab (95,2%/ 90,5%/ 69,0%). Bei Festlegung eines positiven Testergebnisses bei Aktivierungswerten über die entsprechenden Grenzwerte hinaus in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Konzentrationsstufen konnte eine BAT-Sensitivität von 85,7% für den CD63- und von 90,5% für den CD203c-BAT eruiert werden.

#### *Doppelsensibilisierungen und kontroverse Testresultate*

Die positiven Testresultate hinsichtlich der Insektengifttestungen in den verschiedenen Testverfahren zeigt Tabelle 17. Von der Stichanamnese unabhängig, wiesen insgesamt 9 Personen im Patientenkollektiv eine Doppelsensitivität im Hauttest auf. Diese konnte durch positive spezifische IgE-Ak gegen beide Insektengifte bei allen 9 Patienten bekräftigt werden. Sieben dieser 9 Personen zeigten im CD63-BAT und 8 Personen im CD203-c-BAT ebenfalls eine Doppelsensibilisierung auf. In 7 Fällen stimmten die Ergebnisse von Hauttest und spezifischer IgE-Bestimmung nicht überein. Bei einem Patienten lieferte der Hauttest ein positives Ergebnis nur auf Bienengift, wobei die spezifische IgE-Bestimmung mit Klasse 1 auch eine Sensibilisierung gegen Wespengift aufzeigte. Der CD63-BAT ergab diesbezüglich ein positives Testresultat nur auf Bienengift, der CD203c-BAT hingegen fiel bei der Testung gegen beide Insektengifte positiv aus. Das Ergebnis von 6 Patienten waren positive Hauttests lediglich gegen Wespengift aber Doppelsensibilisierungen bei der spezifischen IgE-Bestimmung, nämlich in 4 Fällen Klasse 1 und bei 2 Patienten Klasse 2 auch gegen Bienengift.

Diese Doppelsensibilisierung konnte bei den Patienten mit Bienengift-Antikörpern der Klasse 1 durch beide BAT-Ansätze in 2 Fällen bestätigt werden, bei 2 Patienten erbrachten beide BAT-Protokolle positive Ergebnisse lediglich gegen Wespengift. Die Patienten mit spezifischer IgE-Klasse 2 gegen Bienengift lieferten in beiden BAT-Ansätzen mit positiven Ergebnissen sowohl gegen Bienen- als auch gegen Wespengift übereinstimmende Testresultate mit der spezifischen IgE-Bestimmung.

**Tabelle 17: Positive Reaktionen im jeweiligen Test gegen Bienen (B)- und Wespengift (W) bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion nach einem Insektenstich.**

Patienten	Anzahl	Insekten-gift	T e s t e r g e b n i s   p o s i t i v			
			Hauttest	RAST	CD63-BAT	CD203c-BAT
<b>Bienengift-allergie</b>	9	B	9 (100%)	9 (100%)	8 (88,9%)	9 (100%)
		W	1 (11,1%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	5 (55,6%)
<b>Wespengift-allergie</b>	27	B	4 (14,8%)	10 (37%)	7 (25,9%)	9 (33,3%)
		W	27 (100%)	27 (100%)	26 (96,3%)	27 (100%)
<b>Bienen- und Wespengift-allergie</b>	4	B	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)	3 (75%)
		W	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
<b>keine Allergie</b>	2	B	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
		W	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>B</b>	<b>17 (40,5%)</b>	<b>23 (54,8%)</b>	<b>18 (42,9%)</b>	<b>21 (50%)</b>
		<b>W</b>	<b>32 (76,2%)</b>	<b>33 (78,6%)</b>	<b>33 (78,6%)</b>	<b>37 (88,1%)</b>

### 3.1.5. Höhe der Basophilenaktivierung im BAT bei spezifischer Immuntherapie

Die untersuchten Patienten wurden gemäß der Dauer einer begonnenen SIT unterteilt. Von 42 Patienten hatten 4 Personen (1 Bienen- und ein 1 Wespengiftallergiker, 2 Patientinnen ohne Sensibilisierungsnachweis in Hauttest und RAST) zum Zeitpunkt der BAT-Durchführung nicht mit einer SIT gegen Insektengift begonnen. Mit 26 Personen (5 Bienengiftallergiker, 19 Wespengiftallergiker, 2 Bienen- und Wespengiftallergiker) befand sich der größte Teil der Patienten im ersten Monat der SIT. Weitere 5 Personen (5 Patienten mit Wespengiftallergie) befanden sich innerhalb des ersten Jahres und bei 7 Patienten (3 Bienengiftallergiker, 2 Wespengiftallergiker, 2 Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie) lag der Beginn einer SIT über ein Jahr zurück. Der Vergleich zwischen dem CD63- und CD203c-BAT wies keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Höhe einer Basophilenaktivierung in den Probenansätzen auf. Die Mittelwerte der Basophilenaktivierung in den jeweiligen Unterteilungen sind in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18: Einteilung von 42 Patienten mit allergischen Symptomen nach Insektenstichen hinsichtlich der Dauer einer Spezifischen Immuntherapie (SIT). Mittelwerte ( $\pm$  SA) der Basophilenaktivierung im CD63- und CD203c-BAT nach Inkubation mit Bienen (B)- und Wespengift (W) sowie einer Negativ (N.K.)- und Positiv-Kontrolle (P.K.).**

SIT in Monaten	CD63-BAT CD203c-BAT							
	N.K.	P.K.	B 1 $\mu$ g/ml	B 0,1 $\mu$ g/ml	B 0,01 $\mu$ g/ml	W 1 $\mu$ g/ml	W 0,1 $\mu$ g/ml	W 0,01 $\mu$ g/ml
<b>0</b> (n=4)	4,5 ( $\pm$ 3,8)	32,3 ( $\pm$ 18,3)	13,1 ( $\pm$ 18,5)	11,9 ( $\pm$ 18,3)	5,0 ( $\pm$ 4,8)	13,1 ( $\pm$ 15,0)	12,3 ( $\pm$ 14,2)	9,2 ( $\pm$ 6,4)
	3,8 ( $\pm$ 1,4)	48,1 ( $\pm$ 14,0)	19,1 ( $\pm$ 26,0)	16,1 ( $\pm$ 23,4)	10,5 ( $\pm$ 13,7)	29,8 ( $\pm$ 33,3)	24,2 ( $\pm$ 34,0)	17,6 ( $\pm$ 27,4)
<b>0-1</b> (n=26)	4,0 ( $\pm$ 2,7)	37,9 ( $\pm$ 15,9)	26,8 ( $\pm$ 33,0)	18,9 ( $\pm$ 28,9)	8,5 ( $\pm$ 11,5)	62,0 ( $\pm$ 28,6)	46,6 ( $\pm$ 29,0)	16,8 ( $\pm$ 22,5)
	4,3 ( $\pm$ 2,1)	43,7 ( $\pm$ 16,7)	25,6 ( $\pm$ 25,3)	20,0 ( $\pm$ 24,4)	12,8 ( $\pm$ 17,1)	55,7 ( $\pm$ 25,1)	51,8 ( $\pm$ 27,2)	25,5 ( $\pm$ 20,2)
<b>1-12</b> (n=5)	5,2 ( $\pm$ 2,8)	33,8 ( $\pm$ 18,3)	22,1 ( $\pm$ 22,2)	4,6 ( $\pm$ 3,7)	4,6 ( $\pm$ 2,7)	72,3 ( $\pm$ 19,7)	51,4 ( $\pm$ 29,7)	22,7 ( $\pm$ 21,6)
	5,8 ( $\pm$ 2,1)	32,1 ( $\pm$ 17,1)	20,3 ( $\pm$ 17,5)	8,8 ( $\pm$ 8,7)	4,9 ( $\pm$ 2,3)	55,8 ( $\pm$ 14,3)	45,8 ( $\pm$ 21,9)	23,2 ( $\pm$ 14,4)
<b>&gt;12</b> (n=7)	3,3 ( $\pm$ 2,5)	31,3 ( $\pm$ 18,5)	42,1 ( $\pm$ 22,2)	20,6 ( $\pm$ 17,3)	3,9 ( $\pm$ 4,2)	37,1 ( $\pm$ 32,9)	8,0 ( $\pm$ 8,1)	4,5 ( $\pm$ 3,0)
	3,9 ( $\pm$ 1,6)	40,3 ( $\pm$ 21,1)	55,7 ( $\pm$ 27,0)	42,9 ( $\pm$ 34,6)	14,2 ( $\pm$ 11,1)	53,7 ( $\pm$ 29,2)	34,5 ( $\pm$ 28,7)	12,9 ( $\pm$ 11,5)

### 3.1.6. Expressionshöhe von CD63 und CD203c in Bezug auf den Schweregrad von Stichreaktionen

Für beide BAT-Ansätze wurde die durchschnittliche prozentuale Basophilenaktivierung der Patienten hinsichtlich der Schweregradzuteilung einer allergischen Reaktion ermittelt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede weder zwischen dem CD63- und CD203c-BAT noch zwischen den Gruppen mit unterschiedlichen Schweregraden. Das Ergebnis im CD63- bzw. CD203c-BAT war bei 8 Patienten mit Grad I 65,2 ( $\pm$  27,6) bzw. 64,2 ( $\pm$  26,6) und bei 22 Patienten mit Schweregrad II 60,6 ( $\pm$  28,4) bzw. 63,2 ( $\pm$  23,0). Die mittlere Aktivierungshöhe erreichte Werte von 64,8 ( $\pm$  18,4) bzw. 62,1 ( $\pm$  14,2) bei 9 Patienten mit Grad III und bei 3 Personen mit Schweregrad IV 63,9 ( $\pm$  16,2) im CD63- bzw. 59,3 ( $\pm$  7,9) im CD203c-BAT.

## 3.2. Kontrollpersonen

### 3.2.1. Gruppenzuteilung

Den 25 Personen, die als Kontrollen in der Studie untersucht wurden, waren allergische Reaktionen nach einem Bienen- oder Wespenstich nicht Erinnerungsfähig. Die einzelnen Messwerte der Kontrollpersonen sind im Anhang auf S.104 dargestellt. Sie wurden ebenfalls eingeteilt:

#### *Gruppe A:*

Diese Gruppe bestand aus 18 Personen (10 Frauen, 8 Männer) mit negativer Stichanamnese und negativen Ergebnissen bei der Untersuchung auf insektengiftspezifische Antikörper und stellte somit die eigentliche Kontrollgruppe dar (Kontrollperson Nr. 1-18). Das durchschnittliche Alter der Kontrollpersonen lag bei 34 ( $\pm 11$ ) Jahren.

#### *Gruppe B:*

Die sieben Kontrollpersonen dieser Gruppe (3 Frauen, 4 Männer) wiesen neben einer negativen Stichanamnese positive Ergebnisse bei der spezifischen Antikörper-Bestimmung gegen Insektengift auf (Kontrollperson Nr. 19-25). Der Altersdurchschnitt der Gruppe betrug 42 ( $\pm 14$ ) Jahre.

### 3.2.2. Ergebnisse im CD63- und CD203c-BAT

In Kontrollgruppe A lieferte der CD63-BAT jeweils 18 (100%) richtig negative Ergebnisse bei der Testung auf beide Insektengifte. Daneben konnten mit dem CD203c-Testansatz 18 Personen (100 %) richtig negativ auf eine Reaktion gegen Bienengift und 16 Personen (88,9 %) richtig negativ gegen Wespengift getestet werden. Bei 2 Kontrollpersonen (Nr. 7, 16) wurde bei der höchsten Konzentrationsstufe für Wespengift eine prozentuale Basophilenaktivierung (43,3%, 36,5%) über die Grenzwerte hinaus erreicht, so dass die Testresultate positiv ausfielen. Somit ergibt sich für den CD63-BAT eine Spezifität von 100% und für den CD203c-BAT eine Spezifität von 89% in dieser Gruppe.

Die einzelnen Messwerte im CD63- und CD203c-BAT einer Kontrollperson der Gruppe A sind in Abbildung 19 dargestellt.

Das Testresultat in der Kontrollgruppe B waren mit dem CD63-Ansatz 7 (100%) und im CD203c-Testansatz 6 (85,7%) richtig negative Ergebnisse bzgl. der Bienengifttestung. Ein negatives Ergebnis auf eine Wespengiftexposition hin zeigten im CD63-Protokoll 5 (71,4%) und bei der CD203c-Bestimmung 4 (57,1%) Personen.

Bei 3 Kontrollpersonen (Nr. 19, 22, 25) der Gruppe B konnte eine Sensibilisierung gegen Bienengift durch giftspezifische Antikörper (jeweils Klasse 1) nachgewiesen werden, die in einem Fall (Nr. 22) auch im CD203c-BAT (B 1: 21,8%) bestätigt werden konnte. Im CD63-Ansatz fiel die Testung gegen Bienengift bei allen drei Personen negativ aus. Zu dem konnten bei 5 Personen der Gruppe B wespengiftspezifische Antikörper bestimmt werden. Bei einer Person (Nr. 25) mit Klasse 1 zeigten beide BAT-Protokolle keine Aktivierung gegen Wespengift über die Schwellenwerte hinaus. Die Klasse 2 gegen Wespengift wurde bei 3 Personen (Nr. 20, 21, 23) gemessen, wobei die Ergebnisse des CD63- und CD203c-BAT bei 2 (Nr. 20, 21) der 3 Personen ebenfalls positiv gegen Wespengift ausfielen. Eine Kontrollperson (Nr. 24) wies die wespengiftspezifische IgE-Klasse 3 auf und reagierte im CD203c-BAT positiv (W 1: 38,6%), im CD63-BAT jedoch negativ gegen Wespengift.

In Kontrollgruppe B konnte für den CD63-BAT eine Testspezifität von 100% für Bienengift und 71,4% für Wespengift ermittelt werden. Die Spezifität des CD203c-BAT betrug bei einer Testung gegen Bienengift 85,7% sowie 57,1% bei Testung gegen Wespengift. Hinsichtlich einer negativen Testung gegen beide Insektengifte betragen die Spezifitäten 57,1% für den CD63- und 42,9% für den CD203c-BAT.

Unter Verwendung der Cut-Offs von 14% bzw. 15% für den CD203c- bzw. CD63-BAT und bei Festlegung eines positiven Testergebnisses bei Überschreitung dieser Grenzwerte in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Konzentrationsstufen konnte in Gruppe A eine Spezifität von 100% für beide BAT-Ansätze ermittelt werden. In Gruppe B lag die Spezifität gleichfalls bei 100% in beiden BAT-Ansätzen hinsichtlich der Bienengifttestung und bei 71,4% in Bezug auf Wespengift sowohl im CD203c- als auch im CD63-BAT.

Die durchschnittlich gemessene Basophilenaktivierung der 8 Probenansätze in den BAT-Ansätzen von Kontrollgruppen A und B ist in Abbildung 21 graphisch dargestellt. Die erreichten Werte in beiden BAT-Protokollen sind in Tabelle 19 wiedergegeben.

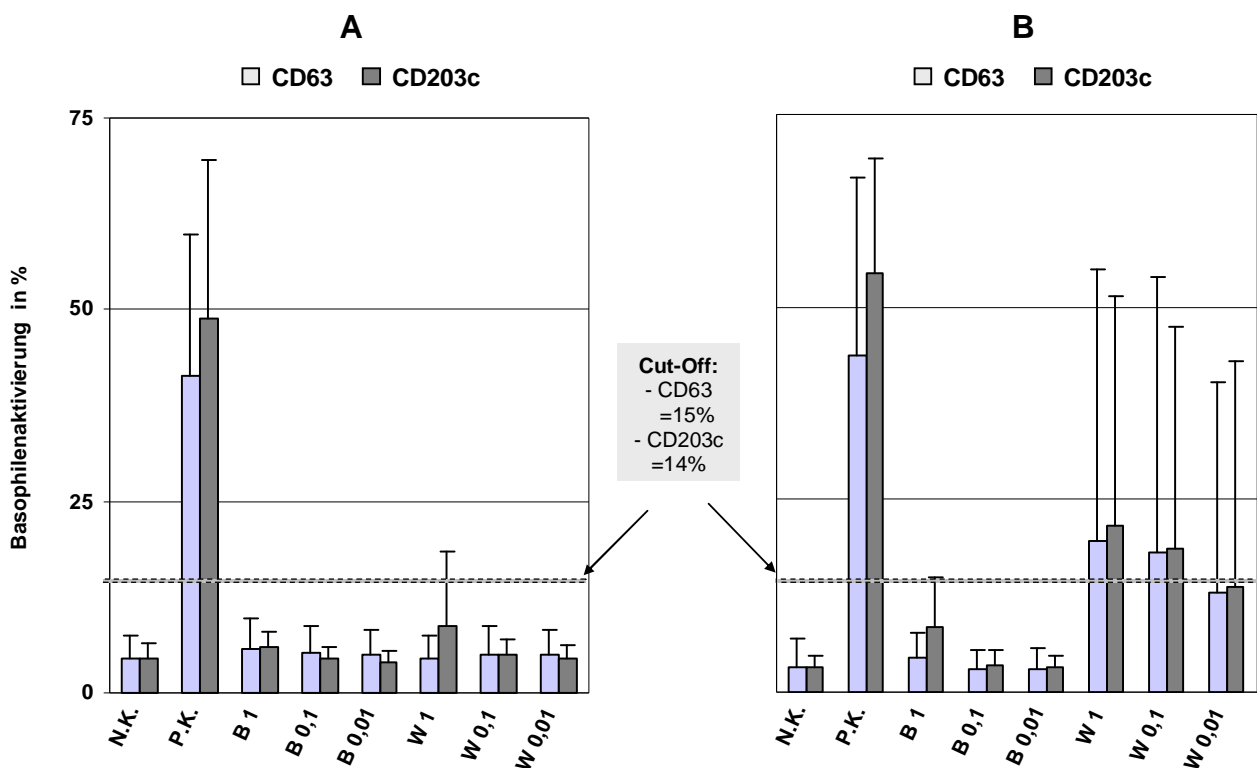
Der Vergleich der Mittelwerte der Bienen- und Wespengiftkonzentrationsstufen sowie der Kontrollansätze innerhalb der Kontrollgruppe A und B zeigten bzgl. einer Basophilenaktivierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider BAT-Ansätze. Der Vergleich zwischen den beiden Kontrollgruppen wies hinsichtlich der Aktivierungshöhe in den einzelnen Probenansätzen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf (s. Tab. 19).

**Tabelle 19: Ergebnisse der prozentualen Basophilenaktivierung im CD63- und CD203c-BAT von Kontrollpersonen.** Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichungen) der Negativ (N.K.)- und Positiv-Kontrollen (P.K.) sowie unterschiedlicher Bienen (B)- und Wespengiftkonzentrationsstufen (W) in der Einheit  $\mu\text{g/ml}$ .

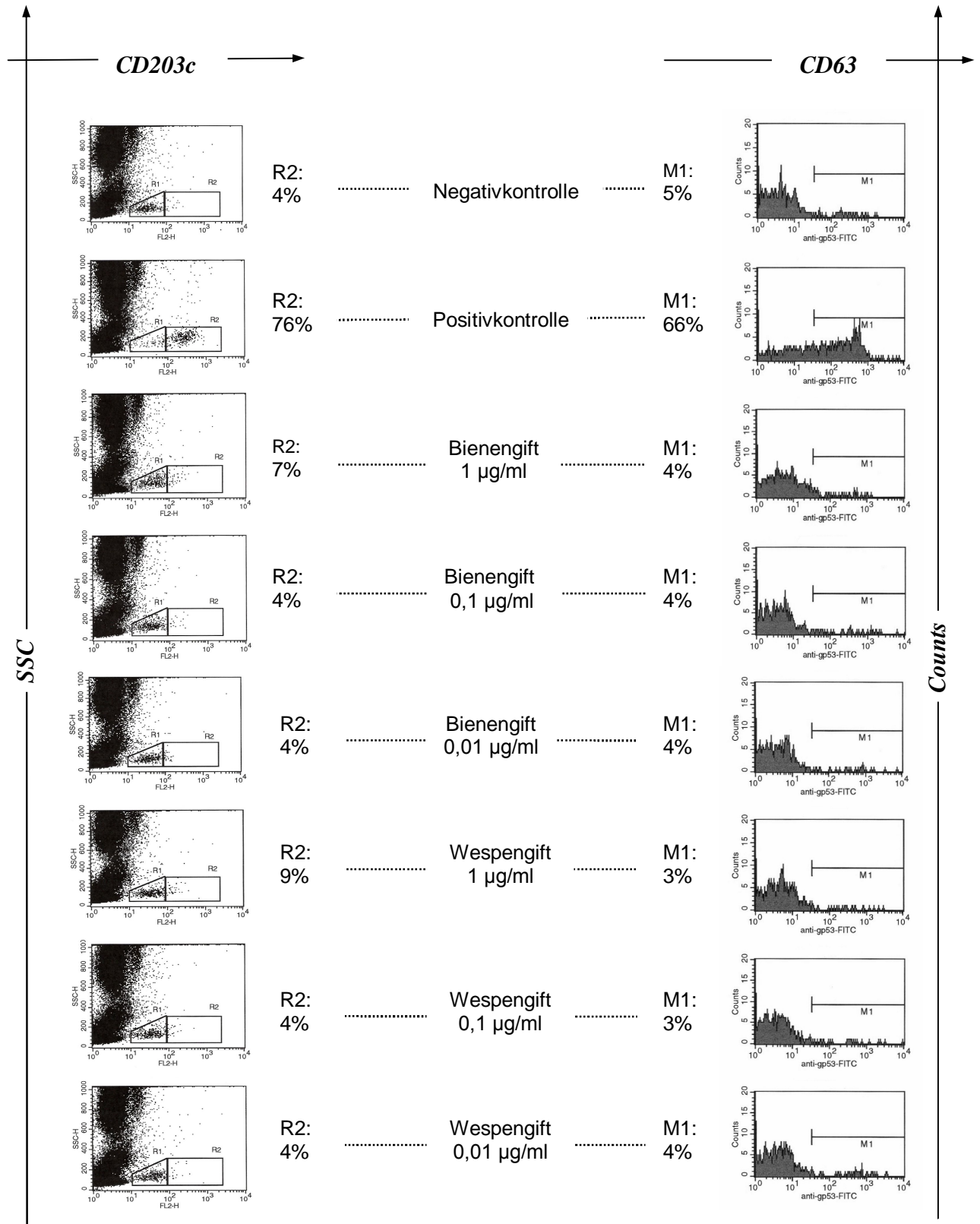
Kontrollpersonen	BAT	N.K.	P.K.	B 1	B 0.1	B 0.01	W 1	W 0.1	W 0.01
<b>Gruppe A</b> (n= 18)	<b>CD63</b> ( $\pm$ SD)	4,3 ( $\pm$ 2,9)	41,5 ( $\pm$ 18,0)	5,5 ( $\pm$ 3,9)	5,1 ( $\pm$ 3,1)	4,7 ( $\pm$ 3,3)	4,6 ( $\pm$ 3,1)	4,8 ( $\pm$ 3,6)	4,6 ( $\pm$ 3,1)
	<b>CD203c</b> ( $\pm$ SD)	4,3 ( $\pm$ 2,1)	47,7 ( $\pm$ 19,9)	5,7 ( $\pm$ 2,1)	4,5 ( $\pm$ 1,5)	4,0 ( $\pm$ 1,7)	10,1 ( $\pm$ 11,2)	5,1 ( $\pm$ 2,0)	4,5 ( $\pm$ 1,7)
<b>Gruppe B</b> (n= 7)	<b>CD63</b> ( $\pm$ SD)	3,4 ( $\pm$ 1,4)	43,6 ( $\pm$ 23,3)	4,5 ( $\pm$ 3,3)	3,0 ( $\pm$ 2,4)	3,0 ( $\pm$ 2,6)	19,7 ( $\pm$ 35,3)	18,2 ( $\pm$ 35,7)	12,8 ( $\pm$ 27,5)
	<b>CD203c</b> ( $\pm$ SD)	3,3 ( $\pm$ 1,4)	54,5 ( $\pm$ 14,9)	8,4 ( $\pm$ 6,6)	3,6 ( $\pm$ 1,9)	3,2 ( $\pm$ 1,5)	21,5 ( $\pm$ 30,0)	18,6 ( $\pm$ 28,9)	13,7 ( $\pm$ 29,3)



In den Allergiegruppen unterschied sich der Prozentsatz an aktivierten Basophilen bei den Giftkonzentrationen 1 µg/ml und 0,1 µg/ml hinsichtlich des relevanten Insektengifts in beiden BAT-Ansätzen signifikant von den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe A sowie nach Stimulation mit PBS. In Bezug auf die prozentuale Basophilenaktivierung nach Stimulation mit PBS ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe A (CD63: 4,4 ± 3,0/ CD203c: 4,4 ± 2,1) und der Patientengruppe (CD63: 4,1 ± 2,7/ CD203c: 4,4 ± 2,0) einerseits als auch andererseits zwischen den Allergiegruppen in beiden BAT-Ansätzen nachweisen. Gleiches gilt für die Inkubation mit fMLP, bei der ebenfalls keine signifikanten Schwankungen zwischen den Allergiegruppen einerseits und dem Patienten- (CD63: 35,8 ± 16,4/ CD203c: 42,2 ± 17,2) und Kontrollkollektiv (Gruppe A= CD63: 41,1 ± 18,5/ CD203c: 48,8 ± 20,7) andererseits in beiden BAT-Ansätzen sowie zwischen dem CD63- und CD203c-BAT zu verzeichnen waren.



**Abbildung 21: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Kontrollgruppen A (n=18) und B (n=7) als Mittelwerte und deren Standardabweichungen.** Ergebnisse der Oberflächenexpression von CD63 und CD203c nach Stimulation der Proben mit einer Negativ-Kontrolle (N.K.), Positiv-Kontrolle (P.K) sowie Bienen (B)- und Wespengift (W) unterschiedlicher Konzentrationen in der Einheit µg/ml. Als Schwellenwert (Cut-Off) für ein positives Testergebnis gilt eine Aktivierung von über 14% im CD203c- und über 15% im CD63-Protokoll.



**Abbildung 22: Messergebnisse einer Kontrollperson (Nr. 10).** Darstellung der SSC/FL2-Dotplot-Diagramme mit den Gates R1 und R2 für die Bestimmung der CD203c-Expression sowie der FL1-Histogramme mit den Messbereichen M1 für die Detektion von CD63. Die korrelierten Werte aus R2 und M1 gelten als Maß für die prozentuale Aktivierung basophiler Granulozyten nach Exposition mit Insektengift unterschiedlicher Konzentrationen und einer Negativ (Waschlösung)- und Positiv-Kontrolle (fMLP).

## 4. Diskussion

### 4.1. Diagnostische Möglichkeiten bei Insektengiftallergie

Die Insektengiftallergie ist eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp und kann mit lebensgefährlichen Symptomen einhergehen. Da sie durch die spezifische Immuntherapie (SIT) sehr gut therapiert werden kann, ist eine akkurate und schnelle Diagnosefindung unabdingbar. Neben der ausschlaggebenden Patientenanamnese stellen die Hauttestung und die Bestimmung allergenspezifischer IgE-Antikörper die Säulen der Diagnostik einer Insektengiftallergie dar und kamen auch in der vorliegenden Studie zum Einsatz [11, 119]. Diese routinemäßig durchgeführten Untersuchungen können indes mit erheblichen Unsicherheitsfaktoren behaftet sein, zumal anamnestische Angaben subjektiv sind und das Ergebnis von Hauttest und spezifischer IgE-Antikörper-Bestimmung falsch-positiv sowie falsch-negativ ausfallen können [59, 113, 104]. Nicht selten resultieren hieraus unstimmige Testresultate, wie dies auch für einige der in dieser Arbeit untersuchten Patienten (Nr. 17, 18, 24, 29, 37, 38, 42) zutraf.

In der vorliegenden Studie konnte für die Hauttestung eine Sensitivität von 95,2% ermittelt werden, wobei zu berücksichtigen ist, dass sowohl die Sensitivität der Hauttestung als auch deren Spezifität je nach Testprinzip und verwendeter Giftzubereitung, -menge und Applikationsart deutlich variieren können [59, 113, 104]. Wird die Hauttestung (intracutan) innerhalb eines Jahres nach Stichreaktion durchgeführt, wird eine Sensitivität über 95% und eine Spezifität zwischen 80-90% erreicht [121]. Bis zu 33% der Patienten mit durch Stichprovokation gesicherter Insektengiftallergie werden im Hauttest negativ getestet [59]. Falsch-negative Hauttestergebnisse können durch einen schlecht gewählten Zeitpunkt der Untersuchung oder durch Medikamente, welche die Hauttestempfindlichkeit herabsetzen (Antihistaminika, Steroide) bedingt sein. Daneben sind falsch-positive Ergebnisse relativ häufig (je nach Studie bei 20-46%), da sich Personen beim letzten reaktionslos vertragenen Insektenstich sensibilisiert haben könnten oder eine subklinische Sensibilisierung vorliegt [104].

Trotz der routinemäßigen Durchführung der spezifischen IgE-Ak-Bestimmung weist diese In-vitro-Methode eine diagnostische Lücke bis zu 20-30% auf, vor allem wenn spezifisches IgE erst über ein Jahr nach der letzten Stichreaktion gemessen wird [105]. Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Systeme dieser Methode sind allergenabhängig und können deutliche Schwankungen zeigen [76, 124]. Im Fall des am häufigsten angewendeten Immuno-CAP-Systems, das auch in dieser Arbeit bei der Mehrzahl der Patienten verwendet wurde, ist gegenwärtig eine Sensitivität von etwa 95% für Bienen- und mit ca. 90% eine etwas geringere für Wespengift zu bestimmen. Die Spezifität beträgt 80-90% für beide Giftarten [121]. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit bzgl. der Messung von spezifischen IgE-Ak gegen das Gift des anamnestisch eruierten Insekts. Es konnte eine Sensitivität von 95,2% für beide Giftarten sowie Spezifitäten von 88,0% für Bienen- und 80,0% für Wespengift ermittelt werden. Als Ursachen für falsch-positive spezifische IgE-Ergebnisse kommen unter Anderem hohe Gesamt-IgE-Werte in Frage oder Kreuzreaktionen, die einer weiteren Abklärung, z.B. durch Inhibitionstests bedürfen [65, 66, 146]. Negative IgE-Titer schließen eine Allergie nicht aus, da zellgebundene spezifische IgE-Ak durch das serologische Verfahren nicht erfasst werden oder die Messung zu früh nach einer Stichreaktion erfolgt [121]. Zudem ist eine Interferenz durch antigenspezifische IgG-Ak möglich, die häufig bei Imkern oder Patienten unter SIT quantitativ stark dominieren [104].

Die Sensitivitäten der spezifischen IgE-Bestimmungsmethoden und der Intrakutantests unterscheiden sich bei Durchführung innerhalb des ersten Jahres nach einer anaphylaktischen Stichreaktion nicht wesentlich. Bei einem längeren Zeitintervall scheint jedoch der Hauttest etwas empfindlicher zu sein [104].

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Testverfahren mit unterschiedlichen Ansatzpunkten zur Optimierung der Diagnosefindung bei Insektengiftallergie entwickelt. Einen zentralen Pfeiler bilden dabei allergologische In-vitro-Laboruntersuchungen, die neben serologischen Testmethoden auch Mediatorbestimmungen und zelluläre Analyseverfahren umfassen. Basophile Granulozyten stehen als hypersensitive Effektorzellen häufig im Fokus dieser In-vitro-Verfahren um IgE-vermittelte Sensibilisierungen zu erkennen [85, 124]

Der erste Ansatz eines funktionellen In-vitro-Verfahrens zur Messung einer allergeninduzierten Basophilenaktivierung gelang mit dem Histamin-Freisetzungstest, der bereits Mitte der 70er Jahre von der Arbeitsgruppe um Lichtenstein in die Allergiediagnostik eingeführt wurde [81, 144]. Bei diesem Test werden Blutleukozyten mit verschiedenen Allergenkonzentrationen inkubiert und die resultierende Freisetzung von Histamin mit Hilfe von Immunoassays gemessen. Aufgrund der ungenügenden Sensitivität und Spezifität ist der Nutzen dieser Methode umstritten. Bedingt durch einen relativ hohen Zeitaufwand und Materialkosten fand dieser Test bislang keine eingehende klinische Anwendung und bleibt vorwiegend speziellen diagnostischen oder wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten. Für dieses In-vitro-Verfahren konnten unter anderem Maly et al. [94] sowie Przybilla et al. [116] bezüglich der Insektengiftallergie Sensitivitäten zwischen 63% und 82% für Bienengift und für Wespengift zwischen 50% und 68% ermitteln. Die Spezifität erreichte für Bienen- bzw. Wespengift Werte von 44% und 94% bzw. 60% und 83%.

Als neuer zellulärer Assay für den indirekten Nachweis von zellgebundenem IgE wurde 1993 der Leukotrien-Freisetzungstest von de Weck et al. [28] als kommerzielles Testverfahren (CAST<sup>®</sup>) vorgestellt. Im CAST werden Leukozyten-Suspensionen mit IL-3 und Allergenen stimuliert. In den Überständen werden die daraufhin neu synthetisierten Sulfidoleukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) mittels ELISA-Technik bestimmt. Dieses Verfahren stellt ein komplexes Effektorzell-basiertes Testsystem dar, dessen Bedeutung bislang in der weiterführenden In-vitro- und nicht der Basis-Allergiediagnostik liegt (84). Da der CAST im Gegensatz zum Histamin-Freisetzungstest jedoch keine gespeicherten, sondern neu synthetisierte Mediatoren bestimmt, wird hier ein anderer immunologischer Mechanismus beleuchtet. Anhand zahlreicher Untersuchungen erwies sich dieser Test als nützliche komplementäre Methode zur Abklärung allergischer sowie pseudoallergischer Reaktionen [28, 31]. Bei Patienten mit Insektengiftallergie konnten mehrere kontrollierte Studien eine hohe Sensitivität von 68-100% für den CAST bestimmen mit Spezifitäten zwischen 67% und 100% [22, 69, 71, 134]. Diesbezüglich ermittelten Scherer et al. [140] in einer jüngsten Studie mit insektengiftallergischen Patienten ähnliche Sensitivität für den CAST (CAST-ELISA) mit 94,0% für Bienengift und 88,5% für Wespengift.

Der in dieser Arbeit untersuchte Basophilenaktivierungstest (BAT) ist ein seit Anfang der 90er Jahre stetig weiterentwickeltes zelluläres In-vitro Verfahren, das sich die Durchflusszytometrie zu Nutze macht. Entscheidendes Merkmal und der Vorteil hierbei gegenüber der klassischen Methode der mikroskopischen Auswertung von Zellen ist, dass die verschiedensten Parameter einer Zelle genau charakterisiert werden können, in dem tausende Zellen innerhalb kürzester Zeit in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden [54, 86, 131].

Erste durchflusszytometrische Untersuchungen und Testmethoden gehen unter anderem auf anfängliche Studien von Nakagawa et al. [108], Gane et al [54] und Knol et al. [86] zurück und die Anwendung in der Allergiediagnostik auf die Arbeitsgruppe um Sainte-Laudy [131-134]. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Dabei wurde anfänglich vorwiegend CD63 als Oberflächenantigen bestimmt um eine allergenspezifische Aktivierung basophiler Granulozyten quantitativ zu messen [54, 86, 99, 132]. CD63, ein Glykoprotein (gp53) der Transmembran-4-Superfamilie wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert und ist bei ruhenden Basophilen hauptsächlich in zytoplasmatischen Granulamembranen verankert. Bei der Aktivierung fusionieren die Granulamembranen mit der Zellmembran und CD63 wird an die Oberfläche verlagert und in hoher Dichte exprimiert [14, 86].

Neuere Untersuchungen identifizierten CD203c als geeigneten Aktivierungsmarker basophiler Granulozyten im Rahmen allergischer Reaktionen [12, 21, 63, 115]. CD203c ist ein zur Familie der Ecto-Nucleotid-Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase gehörendes Antigen (E-NPP3), das als Typ II Transmembranprotein die Phosphodiester- und Phosphosulfatbindungen von Nukleotidderivaten hydrolysiert. Im Gegensatz zu CD63 kommt CD203c im peripheren Blut ausschließlich auf Basophilen vor, weshalb es als linienspezifisch angesehen werden kann. Es wird sowohl von ruhenden als auch von aktivierten Zellen exprimiert, jedoch unterschiedlich stark [21].

Die beiden Aktivierungsmarker CD63 und CD203c standen in den letzten Jahren im Mittelpunkt zahlreicher Versuchsgruppen [32]. Es konnten etliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen beiden Markern hinsichtlich des Aktivierungsprozesses basophiler Granulozyten ermittelt werden, wobei insbesondere auf Diskrepanzen hinsichtlich des kinetischen Profils und der Quantität der Hochregulierung nach Stimulation hingewiesen wurde (s. Tab. 20) [21, 67, 93].

**Tabelle 20: Die Aktivierungsmarker CD63 und CD203c: Gemeinsamkeiten und Unterschiede [21, 93, 101]**

	CD63	CD203c
<b>Stimulation mit:</b>		
anti-IgE-Ak	Erhöhte Oberflächenexpression: Expressionsmaximum innerhalb 15 Min	Erhöhte Oberflächenexpression: Expressionsmaximum innerhalb 5 Min
IL-3	Keine Veränderung der spontanen Expression	Erhöhte Expression von ruhenden Basophilen
TPA	FcεRI-unabhängige Hochregulierung nach 60 Min	FcεRI-unabhängige Hochregulierung nach 1-2 Min
PGD2	Keine Hochregulierung	Hochregulierung nach 1 Min
<b>PI3K-Inhibitoren</b>		
Wortmannin LY294002	Hemmen anti-IgE-induzierte Hochregulierung	Hemmen anti-IgE-induzierte Hochregulierung
<b>Effekte von Statinen</b>		
Cerivastatin	Kein Einfluss	Hemmen: - IgE-vermittelte Histamin-Freisetzung
Atorvastatin		-IL-3 induzierte Hochregulierung
<b>Expressionserhöhung</b>	Abhängigkeit von Calcium-Ionen	Abhängigkeit von Calcium-Ionen

TPA= Tetradecanoylphorbolacetat

PGD2= Prostaglandin D2

PI3K= Phosphoinositol-3-Kinase

Sowohl diese Unterschiede als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten auf unterschiedliche Aktivierungswege sowie funktionelle Endpunkte hinsichtlich der Degranulation bzw. Histaminfreisetzung hin. Sie legen die Vermutung nahe, dass die Signalwege für den Transport der Marker zur Zelloberfläche verschieden sind oder auf unterschiedliche Arten von Transportvesikeln/Granula in Basophilen beruhen. Aufgrund der Tatsache, dass CD203c nach einer Zellaktivierung schnell und kontinuierlich auf der Zelloberfläche erscheint, werden intrazelluläre Speicher unweit der Basophilenmembran vermutet. Der Verlauf der CD63-Expression scheint dem Mechanismus der anaphylaktischen Degranulation mit schlagartiger und massiver Extrusion von Granulainhalt in den Extrazellularraum nahe zu sein [21, 36, 67].

## 4.2. Der CD63- und CD203c-BAT bei Insektengiftallergie

Um einen möglichst direkten Vergleich der Aktivierungsmarker CD63 und CD203c in dieser Studie zu ermöglichen wurden beide BAT-Verfahren unter nahezu identischen Testbedingungen durchgeführt. Als Grundlage für den CD63-BAT diente der Basotest® [5], ein kommerzielles Testverfahren, das 1991 erstmals publiziert wurde und die Oberflächenexpression von CD63 misst und für den CD203c-BAT eine leicht modifizierte Variante dieses Verfahrens.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass mit dem BAT sowohl bei der Bestimmung von CD63 als auch bei Detektion von CD203c ein äußerst sensitives und zuverlässiges In-vitro-Verfahren zur Abklärung und Diagnostik einer Bienen- und Wespengiftallergie zur Verfügung steht. In Bezug auf die Patientenanamnese konnte im CD203c-BAT eine etwas höhere Sensitivität (97%) als für den CD63-BAT (91%) ermittelt werden. Die Ergebnisse der BAT-Untersuchungen stimmten in der überwiegenden Zahl der Fälle mit denen der Standarddiagnostik überein: mit Hilfe des CD63-BAT ließ sich für 39 (93%) und mittels CD203c-BAT für 40 (95%) von 42 Patienten die Diagnose der Standardverfahren bestätigen.

Die erhobenen Daten stehen im Einklang mit bisherigen BAT-Untersuchungen an Patienten mit Hymenoptereingiftallergie. Einzelheiten der aufgeführten Studien finden sich in Tabelle 21.

Studiengruppen, die den CD63-BAT unter denselben methodischen Bedingungen dieser Arbeit untersuchten konnten bei Patienten mit Wespengiftallergie eine Sensitivität bei Bestimmung von CD63 als Aktivierungsmarker zwischen 92% und 100% ermitteln [38, 46, 51]. Für Patienten mit Bienen oder mit Bienen- und Wespengiftallergie konnten Eberlein et al. eine BAT-Sensitivität von 100% bestimmen [38]. Dabei waren die BAT-Sensitivitäten mit denen der Routine-Diagnostik vergleichbar. Die Sensitivität der Hauttestung lag bei 100% und die der spezifischen IgE-Bestimmung zwischen 92-100% bei den Untersuchungen von Eberlein et al. Auch stimmten die BAT-Ergebnisse von Erdmann et al. [47] gut mit denen von Hauttest, dessen Sensitivität 100% betrug und spezifischer IgE-Bestimmung mit einer Sensitivität von 76% überein.

Die Gesamtsensitivität des BAT bei Detektion von CD63 erreichte in der Studie von Sainte-Laudy et al. [134] mittels IL-3-Preincubation 100%, obgleich zu der Patientengruppe nicht nur Personen mit systemischen Insektenstichreaktionen, sondern auch Personen mit lediglich verstärkten lokalen Stichreaktionen gezählt wurden. Sie verglichen die Testresultate im BAT mit denen von Hauttest/ spezifischer IgE-Bestimmung/ Histamin-Freisetzungstest/ Leukotrien-Freisetzungstest, für welche Sensitivitäten von 85%/ 88%/ 89%/ 100% zu ermitteln waren. Aufgrund der hohen BAT-Sensitivität und Spezifität (100%) und wegen der guten Korrelation der Ergebnisse zwischen BAT und Histamin-Freisetzungstest sowie BAT und Leukotrienbestimmung stellte der CD63-BAT in ihren Augen eine spezifische und hilfreiche Methode zur Anwendung in der Insektengiftallergie-Diagnostik dar.

Sturm et al. [147] testeten den CD63-BAT-Ansatz ohne vorherige Stimulierung der Zellen mit IL-3 und erhielten eine Sensitivität von 91,3% für Bienen- und von 85,3% für Wespengift, weshalb vermutet wurde, dass eine IL-3-Preinkubation der Basophilen die Sensitivität des CD63-BAT verbessere. Die Sensitivität in Bezug auf beide Insektengifte lag für den BAT (87,7%) leicht unter derjenigen von Hauttest (91,2%) und spezifischer IgE-Bestimmung (93,0%). Die Spezifität des CD63-BAT war mit 86,7% besser als die der spezifischen IgE-Messung mit 66,7%.

Bei der Bestimmung von CD203c als Marker einer Basophilenaktivierung errechneten Binder et al. [12] anhand von Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie eine Sensitivität von 92%, wobei diejenige von Hauttest und spezifischem IgE-Nachweis bei 95% und 92% lagen. Die Untersuchungen von Platz et al. [115] ergaben eine CD203c-BAT-Sensitivität von 94% für Wespen- und 83% für Bienengift und eine Gesamtsensitivität von 91%. Für die Hauttestung sowie die spezifische IgE-Bestimmung konnten Sensitivitäten von jeweils 86% ermittelt werden.

In vorausgegangenen Studien variierte die Spezifität des CD63-BAT zwischen 78% und 100% [37, 45, 134, 147] und die der CD203c-Detektion zwischen 85-100% [12, 115]. Diese Unterschiede in den Ergebnissen ergeben sich aus der Tatsache, dass die Kontrollpersonen in den Studien zum Teil erhöhte spezifische IgE-Antikörper gegen Insektengift aufwiesen. In den Messungen von Sturm et al. [147] konnten bei acht von 30 Kontrollen, die ein positives BAT-Ergebnis aufwiesen auch spezifisches IgE gemessen werden und bei den 20 Kontrollpersonen von Erdmann et al. wiesen drei Personen spezifische IgE-Antikörper gegen Wespen- und zwei Personen gegen Bienengift auf. Bekanntermaßen werden IgE-vermittelte Sensibilisierungen allerdings auch bei gesunden Patienten detektiert, die bei späterer Allergenexposition keinerlei Symptome aufweisen. Hierauf Bezug nehmend wiesen Schäfer et al. [139] durch eine Kohortenstudie der allgemeinen Bevölkerung darauf hin, dass bei 27,1% der getesteten Sera Insektengift-spezifische IgE-Antikörper auszumachen waren, aber lediglich 7,1% der Probanden über systemische Allergiereaktionen in der Vergangenheit berichteten. Dadurch, dass die Kontrollpersonen mit positiver Hymenoptergift-Serologie in dieser Arbeit als Gruppe für sich untersucht wurden, konnten für die eigentliche Kontrollgruppe ohne giftspezifische IgE-Antikörper gute (CD203c: 89%) bzw. optimale (CD63: 100%) Spezifitäten erreicht werden.

Die bisher umfangreichsten Studien mit allergischen Patienten gegen Insektengift [140] wiesen bei Detektion von CD63 auf eine Korrelation des BAT mit Hauttest und spezifischer IgE-Bestimmung zwischen 0,71 und 0,82 hin [32]. Übereinstimmende Ergebnisse zwischen Hauttest bzw. spezifischem IgE-Nachweis und dem CD203c-BAT konnten in Bezug auf das relevante Insektengift bei 77,3-86,5% bzw. 76,2-84,6% getesteter Patienten ermittelt werden [12, 115]. Anhand des vorliegenden Patientenkollektivs konnten diesbezüglich Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen im Hauttest und der spezifischen IgE-Bestimmung und den Testresultaten im CD63-BAT von jeweils 92,9% und den CD203c-BAT-Ergebnissen von jeweils 95,2% berechnet werden.

Gewöhnlich zeigt der CD63-BAT eine gute Korrelation mit dem Histamin-Freisetzungstest, weshalb Parallelitäten vermutet werden zwischen der CD63-Expression und der Histamin-Ausschüttung [90, 134]. Lambert et al. [90] ermittelten eine Übereinstimmung zwischen dem BAT mit CD63 als Marker und der Histamin-Freisetzung von 85,7% und die Untersuchungen von Eberlein-König et al. [37] konnten eine Übereinstimmung von 69,1% zwischen BAT und Histamin-Freisetzungstest eruieren. Zudem konnten Platz et al. [115] demonstrieren, dass bei sensibilisierten Patienten, bei denen es im Rahmen einer IgE-Rezeptor-Kreuzvernetzung nicht zu einer Hochregulierung von CD203c gekommen war, interessanterweise ebenfalls keine Hochregulierung von CD63 zu verzeichnen war und auch der Histamin-Freisetzungstest negativ ausfiel. In wie weit das Unterbleiben dieser spezifischen Vorgänge aus einer Hemmung der Degranulation resultiert, ist weiterhin unklar. Jedoch konnten vergleichende Studien veranschaulichen, dass die Histamin-Freisetzung eine glockenförmige Dosis-Wirkungs-Kurve aufweist und der Kurvenverlauf der CD63- und CD203c-Expression vielmehr sigmoidal ist [33, 137, 151]. Mehrere Studien, die beide zelluläre Testmethoden mit einander verglichen, wiesen auf bessere Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Spezifität des BAT bei der Diagnostik der Hymenoptergiftallergie hin [37, 90, 134].

Tabelle 21: Der BAT bei Insektengiftallergie: Studieneinheiten und Versuchsbedingungen

Allergen	P/K	Probenmaterial	Inkubation in Min		Posit.-Kontr.	Basophilenmarker		Grenzwert	BAT		Ref.
			IL-3	Allerg.		Selektion	Aktivierung		Sensit. in %	Spezif. in %	
Biene Wespe	57/10	Hepar. Vollblut	10	20	fMLP	anti-IgE	anti-CD63	15 %	97-100	100/100	[38]
Wespe	20/12	Hepar. Vollblut	10	20	fMLP	anti-IgE	anti-CD63	°	100	100	[51]
Wespe	50/20	Hepar. Vollblut	10	20	fMLP	anti-IgE	anti-CD63	15%	92	80	[46]
Biene Wespe	45/10	Leukozyten (EDTA-Blut)	15	45	anti-IgE	anti-IgE	anti-CD63	5 %	100	100	[134]
Biene Wespe	57/30	Leukozyten (Citrat-Blut)	-	30	anti-IgE	anti-CD123 <sup>+</sup> anti-HLA-DR	anti-CD63	25%	85-91	90/83	[147]
Biene Wespe	22/13	Hepar. Vollblut	-	15	anti-IgE	anti-IgE	anti-CD203c	?	83-94	85-100	[115]
Biene Wespe	39/9	Hepar. Vollblut	-	15	anti-IgE	anti-IgE	anti-CD203c	SI>1,4	85-91	100	[12]
Wespe	80/14	Hepar. Vollblut	10	20	anti-IgE	anti-IgE	anti-CD63	26%	84	100	[43]
Biene Wespe	134/44	Leukozyten (EDTA-Blut)	-	40	anti-FcεRI	anti-IgE	anti-CD63	>10%	87-90	95-97	[140]

P= Patienten K= Kontrollen SI= Stimulationsindex ° Mittelwert+2 Standardabweichungen bei Allergenexposition in der Kontrollgruppe

In einer kürzlich veröffentlichten Studie verglichen Scherer et al. [140] die In-vitro-Methoden BAT (Flow-CAST) mit Detektion von CD63, spezifische IgE-Bestimmung (CAP-FEIA) und Leukotrien-Freisetzungstest (CAST-ELISA) miteinander. Sie ermittelten durch die Untersuchungen an 134 Patienten mit Insektengiftallergie und 44 Kontrollpersonen eine Sensitivität für den CAST von 94,0% für Bienengift und 88,5% für Wespengift und für den BAT Sensitivitäten von 89,5% (Bienengift) und 86,7% (Wespengift). Auch die vergleichbaren hohen Spezifitäten beider Verfahren stützen ihren Einsatz in der Insektengiftallergie-Diagnostik (Bienengift= CAST: 91,1%/ BAT: 85,7%; Wespengift= CAST: 98,4%/ BAT: 92,1%), wobei die Autoren eine Kombination beider Testverfahren vorschlugen, da sich hieraus mit 94,7% (Bienengift) und 95,6% (Wespengift) die höchsten Sensitivitäten ergaben und diejenige der spezifischen IgE-Bestimmung (Bienengift: 92,5%/ Wespengift: 92,4%) überstiegen. Mit 97,4% für Bienen- und 100% für Wespengift stieg bei Verknüpfung beider Tests auch die Spezifität an. Die Studie von Eberlein-König et al. [37] ermittelte eine Übereinstimmung von 78,6% zwischen BAT und CAST bei Testung mit Insektengiften.



### 4.3. Diskussion der BAT-Ergebnisse

Im Einklang mit bisherigen Studien konnte anhand dieser Arbeit demonstriert werden, dass sowohl der CD63- als auch der CD203c-BAT eine Sensibilisierung gegen hauptsächlich das Insektengift reflektiert, das gemäß der Allergiediagnose zu erwarten war [12, 38, 43, 115, 134]. Bei Bienengiftallergikern sowie bei Patienten mit Wespengiftallergie lagen die mittleren Aktivierungswerte beider BAT-Ansätze hinsichtlich der relevanten Gifte bei den Konzentrationen 1 µg/ml und 0,1 µl signifikant über denen des Kontrollkollektivs (Kontrollgruppe A) und der Stimulation mit Waschlösung. Jedoch zeigte der CD203c-BAT im Vergleich zur CD63-Bestimmung eine geringere relative Spezifität auf das jeweils andere Gift sowohl bei Bienen- (CD203c: 44,4%; CD63: 66,7%) als auch bei Wespengiftallergikern (CD203c: 70,4%; CD63: 74,1%).

Äußerst interessant und hilfreich waren die Ergebnisse der beiden BAT-Ansätze im Hinblick auf die Zuordnung der sieben Patienten mit unklarer Stichanamnese zu den entsprechenden Insektengiftallergien (Nr. 36-42). Bei fünf dieser Patienten (Nr. 36-40) lieferten beide BAT-Ansätze einheitliche Zusatzinformationen durch Ergänzung bzw. Bestätigung der Basis-Diagnostik und erleichterten hiermit die Wahl des relevanten Insektengifts für die SIT. Bei Patient Nr. 41 bestätigte der CD63-BAT mit einer Sensibilisierung nur gegen Bienengift das Ergebnis des Hauttests, der CD203c-BAT und die spezifische IgE-Bestimmung ergaben eine Doppelsensibilisierung. Aufgrund der geringen wespengiftspezifischen IgE-Klasse 1 wurde diesem Patienten eine SIT gegen Bienengift empfohlen.

Von besonderem diagnostischen Wert waren die Ergebnisse der zwei Patientinnen (Nr. 39 und Nr. 42) mit unbekanntem Insektenstich, bei denen Hauttestung und Serologie negativ ausfielen. Bei Patientin Nr. 39 konnten beide BAT-Ansätze übereinstimmend keine Sensibilisierung gegen Bienen- oder Wespengift nachweisen, wobei der Grund hierfür unter anderem durch eine relativ lange Zeitspanne von über zwei Jahren zwischen dem letzten Stichereignis und der durchgeführten Diagnostik gegeben sein kann.

Das BAT-Ergebnis bei Patientin Nr. 42 war im CD203c-Ansatz gegen Wespengift positiv, jedoch nur bei der höchsten Giftkonzentration. Die klinische Relevanz dieser Sensibilisierung im CD203c-BAT hinsichtlich einer SIT ist jedoch umstritten, da beispielsweise auch bei zwei Kontrollpersonen dieser Studie ohne giftspezifische IgE-Antikörper eine Erhöhung der CD203c-Expression über den Cut-Off bei dieser Konzentration zu verzeichnen war. Da beide BAT-Verfahren hoch sensitive Untersuchungsmethoden sind können sogar Personen falsch-positive Reaktionen zeigen, die keine eindeutigen Allergien aufweisen, sondern lediglich einen vorübergehenden Anstieg spezifischer IgE-Ak nach Antigen-Provokation aufweisen. Dies ließe möglicherweise auch die hohe Anzahl positiver BAT-Ergebnisse in Kontrollgruppe B mit giftspezifischen IgE-Antikörpern erklären.

Demzufolge sollten Testresultate immer mit Hinblick auf das klinische Gesamtbild des Patienten beurteilt werden (Medikation, Jahreszeit, SIT, Allergenexposition, zusätzliche Erkrankungen) und allergische Reaktionen von sog. pseudoallergischen, nicht IgE-vermittelten Reaktionen (z.B. Komplementaktivierung, Serumkrankheit) unterschieden werden, die auf den ersten Blick mit gleichen Symptomen einhergehen [11, 104, 151].

Auffällig häufig im BAT war die hohe Zahl positiver Reaktionen auf Wespengift (CD63: 33,3%; CD203c: 55,6%) bei Bienengiftallergikern und auf das Gift der Biene (CD63: 25,9%; CD203c: 33,3%;) bei Wespengiftallergikern, was auf eine Doppelsensibilisierung oder eine Kreuzsensibilisierung hindeutet. Doppelsensibilisierungen werden unter anderem durch den serologischen Nachweis giftspezifischer IgE-Antikörper detektiert, die bei rund 30-40% der Patienten mit Insektengiftallergie vorkommen und auch in dieser Studie bei 38% der Insektengiftallergiker nachgewiesen wurden. Als Ursachen kommen unabhängige Sensibilisierungen gegen beide Gifte oder Kreuzreaktionen gegen die Hyaluronidasen im Bienen- und Wespengift in Frage.

Jedoch wiesen Hemmer et al. [65] darauf hin, dass klinisch irrelevante IgE-Antikörper gegen kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten (CCDs) an Glykoproteinen hauptsächlich für doppelt positive Befunde gegenüber Bienen- und Wespengift verantwortlich sind. Als einfache Routineverfahren zum Nachweis CCD-spezifischer Serum-IgE-Antikörper, die bei bis zu 80% doppelt positiver Sera bestimmt werden können, haben sich In-vitro-Methoden mit Bromelain oder anderen pflanzlichen Glykoproteinquellen bewährt. Die genaue Differenzierung zwischen einer tatsächlichen Doppelsensibilisierung und einer vermutlich unwesentlichen Kreuzreaktivität ist vor allem bei unbekannter Stichanamnese und in Hinsicht auf die SIT dringend notwendig. Hierdurch kann bei kompletter Kreuzreaktivität die Immuntherapie neben wirtschaftlichen Gründen zum Nutzen des Patienten auf ein Insektengift beschränkt werden [66, 146].

Auf Grund der relativ hohen Übereinstimmung der BAT-Ergebnisse (CD63: 63%; CD203c: 75%) mit denen der spezifischen IgE-Bestimmungen bzgl. einer Doppelsensibilisierung und der geringen relativen Spezifität besonders für Wespengift bei Bienengiftallergikern scheinen beide BAT-Ansätze alleine keine geeigneten Verfahren zu sein, um Patienten mit Kreuzreaktivität zu identifizieren. Eine besondere Fortentwicklung stellt in diesem Zusammenhang die Allergencharakterisierung auf molekularer Ebene dar. Durch den Einsatz definierter, rekombinanter oder gereinigter Bienen- und Wespengiftallergene ließen sich bei den Untersuchungen von Binder et al. [12] individuelle Sensibilisierungsmuster auf einzelne Giftkomponenten bei den Patienten bestimmen. Von Bedeutung sind solche Muster als Grundlage für Hyposensibilisierungen mit Einzelkomponenten oder bei Verwendung von definierten Hyposensibilisierungsextrakten [12, 103, 106].

Das Risiko, bei erneutem Stich wieder systemisch zu reagieren, korreliert positiv mit der Schwere der allergischen Reaktion und mit dem Alter. Es beträgt bei erwachsenen Patienten mit schweren anaphylaktischen Reaktionen 50-60%, bei Patienten mit leichten systemischen Allergiesymptomen 15-30% und bei Patienten mit großen Lokalreaktionen nur weniger als 5% [105]. Weder die Resultate im Hauttest noch die Bestimmung giftspezifischer IgE-Antikörper korrelieren mit dem Schweregrad einer vorangegangenen Allergiesymptomatik und sie können das individuelle Risiko erneuter schwerwiegender anaphylaktischer Stichreaktionen sowie den Verlauf der Insektengiftallergie nicht voraussagen [13, 59, 104, 149]. Ähnliches wurde auch über Ergebnisse des Histamin- und Leukotrien-Freisetzungstests berichtet, die sich ebenfalls nicht dafür eignen, den Erfolg einer SIT zu kontrollieren oder mögliche systemische Reaktionen bei einem erneuten Stichereignis vorherzubestimmen [36, 149].

Daher erhoffte man sich mit dem BAT ein Verfahren gefunden zu haben, mit dessen Hilfe diesbezüglich eine Prognose gelingt. Hierzu untersuchten Erdmann et al. [46] Patienten mit Wespengiftallergie in dem sie die CD63-BAT-Ergebnisse von 25 Patienten vor und sechs Monate nach einer erfolgten SIT verglichen. Da sich keine Abschwächung der Basophilenaktivierung zeigte, eignet sich der CD63-BAT ihrer Auffassung nach nicht als Alternative zur Stichprovokation, um den Erfolg einer SIT zu reflektieren.

Dem entsprechend ließ sich in der vorliegenden Studie ein statistischer Zusammenhang zwischen der Höhe der prozentualen Basophilenaktivierung und dem klinischen Schweregrad der allergischen Reaktion (nach Ring und Messmer) in beiden BAT-Ansätzen nicht feststellen. Ferner wies die Höhe der prozentualen Basophilenaktivierung in den BAT-Ansätzen in keiner Konzentrationsstufe einen bedeutsamen Unterschied zwischen den CD63- und CD203c-BAT-Ergebnissen auf hinsichtlich der Dauer einer SIT. Aufgrund der geringen Fallzahlen in einigen Unterteilungen muss hierzu angemerkt werden, dass die Aussagekraft dieser Daten eingeschränkt ist. Insofern sind auch die Unterschiede zwischen den jeweiligen SIT-Gruppen nur schwer zu interpretieren bzgl. einer Veränderung der prozentualen Basophilenaktivierung mit Rücksicht auf die SIT-Dauer.

Neuere Untersuchungen von Ebo et al. [43] konnten in diesem Zusammenhang jedoch demonstrieren, dass im CD63-BAT bei länger dauernder SIT zumindest ein signifikanter Abfall der Basophilenaktivierung zu beobachten ist, wenn die Zellen submaximal stimuliert werden. Sie wiederholten ihre CD63-BAT-Messungen bei 22 Wespengiftallergikern fünf Tage nach Beginn einer SIT, ohne hierbei entscheidende Unterschiede zu verzeichnen und nach sechsmonatiger Erhaltungstherapie mit Wespengift. Dass zu beiden Zeitpunkten bereits ein klinischer Schutz vorliegt konnte in mehreren Studien durch gutvertragene Stichprovokationen und eine relative Blockierung der Mediatorfreisetzung aus Basophilen nachgewiesen werden. Die Autoren legen die Vermutung nahe, dass die Einleitung der SIT (Rush-Verfahren) die Degranulation der Zellen inhibiert, aber nicht die Fusion der Granula mit der Basophilenmembran. Eine signifikante Aktivierungsminderung bei der Testkonzentration 0,01 µg/ml Wespengift im Vergleich zu den Konzentrationen 0,1 und 10 µg/ml, die eine maximale Stimulierung der Basophilen bewirkten in ihren Messungen, deuten ihrer Ansicht nach nicht auf eine komplette Inhibition der Zellen hin, sondern vielmehr auf einen bis zu zehnfachen Rückgang der Basophilenreagibilität.

Ihre zusätzlichen Untersuchungen anhand einer Querschnittstudie von 30 Patienten mit einer SIT-Dauer von bereits drei Jahren wiesen ebenfalls eine signifikante Verminderung der Basophilenaktivierung in den Wespengiftkonzentrationen 0,01 und 0,1 µg/ml auf. Diese Ergebnisse untermauern in den Augen der Autoren die Möglichkeit, die Veränderungen der CD63-Expression zur Beurteilung einer SIT heranzuziehen.

#### 4.4. Der BAT in der Allergiediagnostik

Vor allem Basophilenaktivierungstests, die auf der durchflusszytometrischen Erfassung des Oberflächenmarkers CD63 beruhen, wurden in den vergangenen Jahren mehrfach im Rahmen der Diagnostik IgE-Antikörper vermittelter Allergien untersucht. Hierbei erwies sich der CD63-BAT neben der Diagnostik der Insektengiftallergie als zuverlässiges und hilfreiches In-vitro-Verfahren bei Patienten mit Überempfindlichkeiten gegen Nahrungsmittel, Inhalationsallergene sowie Latex und Arzneimittel. Aufgrund der jüngeren Einführung in die Allergiediagnostik, werden beim CD203c-BAT neben den bisher erfolgten Untersuchungen zusätzliche Bestätigungen hinsichtlich der klinischen Anwendungsbereiche benötigt. [32, 40, 42] Einzelheiten der im Folgenden aufgeführten Studien finden sich in Tabelle 22.

Für etliche pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien wie Karotten-, Sellerie und Haselnussallergie ermittelten Erdmann et al. [45] für den CD63-BAT in Hinsicht auf Anamnese und gesunder Probanden Sensitivitäten (85-90%) und Spezifitäten (80-90%), die mit denen von Hauttest (Sensitivität: 90-100%, Spezifität: 80-90%) und spezifischer IgE-Bestimmung (Sensitivität: 70-80%, Spezifität: 80-95%) vergleichbar waren. Eine nahezu gleiche Sensitivität (90%) ergaben die Messungen von Ebo et al. [40] bei Patienten mit pollenassoziiertes Apfelallergie mit einer CD63-BAT-Spezifität von 100%.

Die Untersuchungen von Hauswirth et al. [63] an Pollenallergikern mit rekombinanten Birkenpollen-(Bet v 1,2) und Gräserpollen-Allergenen (Phl p 1,3,5) unter Verwendung eines CD203c-BAT-Protokolls demonstrieren, dass eine allergeninduzierte Hochregulation von CD203c im Rahmen der Basophilenaktivierung stets mit einer Hochregulation von CD63 einhergeht. Sie wiesen ferner auf eine signifikante Korrelation ( $r=0,76$ ;  $p<0,05$ ) zwischen den CD63- und CD203c-Ergebnissen hin, die im Einklang mit der in dieser Arbeit errechneten Korrelation ( $r=0,66$ ;  $p<0,05$ ) für den CD63- und CD203c-BAT steht.

Als erste wandten Ebo et al. [39] den CD63-BAT für die Diagnostik der Latexallergie an und erhielten mit 93% bzw. 92% hohe Werte für die Sensitivität bzw. Spezifität. Des Weiteren könne der BAT ihrer Meinung nach nützlich sein, um die Relevanz von positiven-IgE-Bestimmungen aber fehlenden Allergiesymptomen gegen Latex einzuschätzen.

Auch in den Händen von Sanz et al. [136] erwies sich der CD63-BAT als zuverlässiges In-vitro-Verfahren zur Diagnostik der Latexallergie mit einer höheren Sensitivität (93%), als die der spezifischen IgE-Bestimmung (88%), Histamin- (80%) und Leukotrien-Freisetzung (81%) und einer Spezifität von 100%.

In einer weiteren Studie verglichen Boumiza et al. [16] den BAT bei Latexallergie und verglichen die Testresultate bei Detektion von CD63 mit den Ergebnissen bei CD203c-Markierung. Sie deuteten auf eine bessere Sensitivität des CD203c-BAT (75%) im Vergleich zur CD63-Detektion (50%) hin mit gleichen Spezifitäten von 100%. Die Gründe für eine verbesserte Sensitivität mit CD203c als Aktivierungsmarker sahen die Autoren zum einen darin, dass eine Identifizierung von Basophilen durch CD203c präziser ist. Der zweite Grund sei durch die höhere Expression von CD203c in ihren Messungen im Vergleich zur CD63-Expression bei der Basophilenaktivierung gegeben (48% vs. < 20% bei der höchsten Latexkonzentration).

Jedoch wurden diese Ergebnisse von einigen Autoren hinterfragt, die auf entscheidende Unterschiede im Vergleich zu bisherigen BAT-Untersuchungen mit zufriedenstellenden Sensitivitäten über 90% hinwiesen. Ihrer Ansicht nach hätten eine optimierte Selektion der Allergiepazienten, die Berücksichtigung technischer Aspekte (IL-3-Priming, adäquate Allergenkonzentrationen, Inkubationsbedingungen und -zeiten) und eine allergenspezifische (ROC-analytierte) Festlegung der Schwellenwerte für ein positives Testergebnis bessere Resultate in beiden BAT-Ansätzen ermöglicht.

De Weck et al. [30] führten ebenfalls einen direkten Vergleich von CD203c und CD63 als Aktivierungsmarker durch, dessen Ergebnisse eine Verbesserung des BAT mit CD203c jedoch nicht bestätigten. Da ihre Untersuchungen jedoch an einer kleinen inhomogenen Patientengruppe (n= 10) mit verschiedenen Allergien (Pflanzlich, Latex, Glaskraut) sowie unterschiedlichen Allergenkonzentrationsstufen erfolgten, ist das Resultat dieses Vergleichs schwer zu interpretieren.

Einzelne Autoren wiesen jedoch auf eine deutliche Spannweite der Angaben bezüglich der Sensitivität und Spezifität durchgeführter Testansätze mit Detektion von CD63 hin, insbesondere bei der Diagnostik von Überempfindlichkeiten auf Arzneistoffe [32, 137]. Dabei werfen niedrige Sensitivitäten Fragen hinsichtlich der klinischen Verwendbarkeit auf. Als eine der ersten Gruppen untersuchten Abuaf et al. [1] den CD63-BAT bei Patienten mit Soforttyp-Reaktionen auf verschiedene Muskelrelaxanzien. Hierbei zeigte sich für den CD63-BAT eine Sensitivität von 64% und eine Spezifität von 93% sowie eine Korrelation von  $r = 0,53$  ( $p < 0,001$ ) mit den Ergebnissen der Hauttestungen. Ihrer Meinung nach eigne sich der CD63-BAT zur Ermittlung perioperativer anaphylaktischer oder anaphylaktoider Reaktionen, da die Sensitivität zwar unter der von Hauttest (100%) liegt, aber eine bessere Spezifität (93% vs. 63%) gegeben ist.

In diesem Zusammenhang wiesen die vergleichenden Untersuchungen von Sudheer et al. [148] auf eine deutlich bessere Sensitivität des BAT bei Detektion von CD63 anstelle von CD203c hin. Anhand von Patienten mit anaphylaktischen Zwischenfällen im Rahmen einer Behandlung mit Myorelaxanzien, konnten sie bei flowzytometrischer Messung von CD63 bzw. CD203c eine Sensitivität von 79% bzw. 36% berechnen. Die Sensitivität des CD63-BAT überstieg diejenige von Hauttest (64%) und Histamin-Freisetzungstest (36%), wobei für alle Testverfahren eine optimale Spezifität von 100% ermittelt werden konnte. Begründet durch eine nur halb so hohe Sensitivität bei Bestimmung von CD203c als Aktivierungsmarker im Vergleich zu CD63, sahen die Autoren lediglich den CD63-BAT als diagnostisches Hilfsmittel an, dessen Ergebnisse die Beurteilung perioperativer Anaphylaxien erleichtern könne.

Die Arbeitsgruppe um Gamboa [53] evaluierte den CD63-BAT bei Patienten mit einer Anamnese kutaner oder inhalativer Allergiereaktionen nach Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Die Sensitivität für die einzelnen untersuchten NSAR lag zwischen 12% (Paracetamol) und 55% (Naproxen), wobei für Aspirin und Metamizol Sensitivitäten von 43% und 15% ermittelt werden konnten. Hervorzuheben waren die hohen Spezifitäten für die einzelnen NSAR, die zwischen 74% und 100% lagen.

Jedoch sehen Erdmann et al. den Einsatz des CD63-BAT in diesem Bereich eher kritisch, solange der genaue Pathomechanismus der Intoleranzreaktionen gegen NSAR ungeklärt ist, der meist keine IgE-vermittelte Reaktion darstellt.

Sanz et al. [135] konnten in einer Studie anhand von Patienten mit Überempfindlichkeitsreaktion auf  $\beta$ -Laktam-Antibiotika für den CD63-BAT eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 93,3% nachweisen. Die Ergebnisse der spezifischen IgE-Bestimmung waren mit einer Sensitivität von 38% und einer Spezifität von 87% jenen des BAT unterlegen, wobei die Autoren auf eine Steigerung der Gesamtsensitivität durch einen kombinierten Einsatz von CD63-BAT und Messung von spezifischem IgE (Sensitivität der Verfahren kombiniert: 65%) hinwiesen.

Ziel der vor kurzem veröffentlichten Arbeit von Abuaf et al. [2] war der Vergleich der beiden Aktivierungsmarker CD63 und CD203c hinsichtlich der Messgenauigkeit bei Amoxicillinallergie, die gegenwärtig die häufigste Überempfindlichkeit gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika darstellt. Auf Grund abweichender Ergebnisse mit CD63 und CD203c trotz nahezu gleicher Testkonditionen (keine IL-3-Preinkubation in beiden Ansätzen), scheint die Detektion von CD203c aus ihrer Sicht sensitiver zu sein, als diejenige von CD63 bei Patienten mit anaphylaktischen Reaktionen nach Einnahme von Amoxicillin (Sensitivität= CD203c: 60%, CD63: 20%). Die Patienten mit lediglich Urtikaria bzw. Angioödem in der Anamnese lieferten gleiche Testresultate (29%) bei der CD63- und CD203c-Bestimmung, was die Vermutung bekräftigt, dass es sich hierbei um die Reflektion einer im Vergleich zur Anaphylaxie andersartigen Immunantwort handelt. Obgleich die Ergebnisse bei Kontrollpersonen ohne  $\beta$ -Laktam-Antibiotikaallergie bei CD203c-Detektion negativ ausfielen im Gegensatz zur CD63-Bestimmung bei Testung mit Amoxicillin (Spezifität= CD203c: 100%, CD63: 79%), waren in beiden Testansätzen falsch-positive Testresultate zu vermerken. Diese falsch-positiven Ergebnisse von 10 Personen konnten bei positiven BAT-Ergebnissen gegen Cefuroxim oder Amoxicillin durch entsprechend negative orale Provokationstestungen ermittelt werden. Bei Bestimmung von CD203c anstelle von CD63 wiesen die Autoren zudem auf eine verbesserte Übereinstimmung von BAT-Resultaten und den Ergebnissen der Hauttestung hin, die als Goldstandard-Verfahren zur Diagnostik der  $\beta$ -Laktam-Allergie angesehen wird.

In wie fern durch Detektion von CD203c anstelle von CD63 eine Verbesserung der Diagnostik IgE-vermittelter sowie IgE-unabhängiger Arzneimittelallergien möglich ist, oder sich hierbei Unterschiede ergeben, muss durch zusätzliche Studien weiter abgeklärt werden.

Einen direkten Vergleich der Oberflächenmarker CD63 und CD203c unternahmen auch Ocmant et al. [111] bei Patienten mit Katzenhaarallergie. Um optimale Testbedingungen für beide BAT-Ansätze zu ermitteln verglichen sie die BAT-Ergebnisse mit und ohne IL-3-Stimulierung der Proben. Den Testkonditionen dieser Arbeit entsprechend erhielten sie für beide BAT-Ansätze eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 95%, wenn lediglich die Zellen im CD63-BAT mit IL-3 vorstimuliert wurden. Darüber hinaus bestätigten ihre Untersuchungen die Ergebnisse vorheriger Studien, dass eine IL-3-Pre-Inkubation die allergeninduzierte Basophilenaktivierung im CD63-BAT erhöht und somit die Testsensitivität verbessert, wobei IL-3 auf unstimulierte Basophile keinen Effekt zeigt. Auf den CD203c-BAT wirkte sich eine IL-3-Stimulation nachteilig aus (Sensitivität 92%), da IL-3 die CD203c-Expression von ruhenden, nicht aktivierten Basophilen erhöht, was die Differenzierung zwischen ruhenden und aktivierten Zellen erschwert. In den Händen der Autoren war der CD203c-BAT unter optimierten und klar definierten Testbedingungen eine ebenso zuverlässige In-Vitro-Methode wie der CD63-BAT zur Diagnostik einer IgE-vermittelten Allergie, was die Schlussfolgerung der vorliegenden Studie untermauert.

**Tabelle 22: Der BAT in der Allergiediagnostik: Studieneinzelheiten und Versuchsbedingungen**

Allergie gegen	P/K	Proben	Inkubation in Min		Posit.-Kontr.	Basophilenmarker		Grenzwert	BAT		Ref.
			IL-3	Allergen		Selektion	Aktivierung		Sensit. in %	Spezif. in %	
Karotte Sellerie Haselnuss	29/20	Hepar. Vollblut	10	20	fMLP	anti-IgE	anti-CD63	10%	85-90	80-90	[45]
Apfel	59/10	Hepar. Vollblut	10	20	fMLP	anti-IgE	anti-CD63	15%	90	100	[41]
Pollen (Birke, Gräser)	20/10	Hepar. Vollblut	-	15	anti-IgE	anti-CD203c	anti-CD203c	SI>2	100	100	[63]
Katze	20/19	Hepar. Vollblut	10	20	anti-FcεRI	anti-IgE	anti-CD63	8,1%*	100	95	[111]
			-			anti-CD45	anti-CD203c	SI>1,38 5,2%*	100	95	
Latex	27/12	Hepar. Vollblut	-	10	fMLP	anti-IgE	anti-CD63	10%	50	100	[16]
						anti-CD45	anti-CD203c	10%	75	100	
Latex	43/30	Leukozyten (ACD-Blut)	+	40	anti-IgE	anti-IgE	anti-CD63	.*	93	100	[136]
Latex	29/12	Hepar. Vollblut	10	20	fMLP	anti-IgE	anti-CD63	17%	93	92	[39]
AB (β-Lactam)	58/30	PBMS (Citrat-Blut)	+	40	anti-IgE	anti-IgE	anti-CD63	SI>2	50	93	[135]
Amoxicillin	27/14	Leukozyten (Hepar. Vollblut)	-	30	Calzium-Ionophor	anti-IgE anti-CD45	CD63 CD203c	KA+2 SA	22 52	75 100	[2]
NSAR	60/30	Hepar. Vollblut	+	40	anti-IgE	anti-IgE	anti-CD63	SI>2	12-55	74-100	[54]
MR	33/29	Leukozyten (Hepar. Vollblut)	-	15	anti-IgE	anti-IgE anti-CD45	anti-CD63	15%	64	100	[1]
MR	21/10	Hepar. Vollblut	-	15	fMLP	anti-IgE	CD63	10%	79	100	[148]
						anti-CD45	CD203c	10%	36	100	

P= Patienten K= Kontrollen AB= Antibiotika MR= Muskelrelaxantien NSAR= Nichtsteroidale Antirheumatika  
 SI= Stimulationsindex KA= Kontrollansatz ° Mittelwert+2 Standardabweichungen (SA) bei Allergenexposition in der Kontrollgruppe  
 \* Fluoreszenz-Intensität > 10<sup>2</sup>

Allgemeine Empfehlungen hingegen, welchem der beiden Tests der Vorrang zu gewähren ist, können bislang nicht gegeben werden. Ein Grund hierfür ist unter anderem in widersprüchlichen Ergebnissen anderer Studien mit unterschiedlichen Allergenen bzw. Allergenkonzentrationen zu sehen. Diese unstimulierten Testresultate können zum einen durch diverse BAT-Protokolle und der Verwendung unterschiedlicher Materialien bedingt sein und zum anderen aufgrund verschiedener flowzytometrischer Detektionsmethoden und Schwellenwerte resultieren [151]. Neben dem Basotest, auf dessen Testprinzip beide BAT-Ansätze der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, kamen in den vergangenen Jahren vor allem die klinisch validierten und kommerziell erhältlichen BAT-Technologien Flow-CAST (Bühlmann Laboratories, Allschwil, Schweiz) und Fastimmune (Becton Dickinson, Mountain View, Californien, USA) zur Anwendung [32]. Im Folgenden soll auf wesentliche Anforderungen, Unterschiede und Besonderheiten im Testablauf verschiedener BAT-Methoden eingegangen werden.

#### 4.5. Technische Aspekte der BAT-Methodik

Bereits zu Beginn der BAT-Durchführung muss entschieden werden, ob das Ausgangsmaterial für die Analyse der Basophilen Vollblut oder bereits isolierte Leukozyten sind, die durch Zentrifugation oder Sedimentation gewonnen werden. Mehrere Berichte einer Vollblut Technik (Basotest) zeigten eine geringere Sensitivität im Vergleich zu isolierten Leukozyten (Flow-Cast [29]), besonders bei Diagnostik von Arzneimittelallergien, wobei andere Untersuchungen dies nicht bestätigten [137]. Vorteil der in dieser Studie verwendeten Vollblut-Proben ist zum einen die Reduzierung der basalen Basophilenaktivierung auf ein Mindestmaß, da der Isolierungsprozess neben einem generellen Zellverlust zu einer Aktivierung von Basophilen führen kann.

Hierdurch kann eine erhöhte Sensitivität des Tests erreicht werden, obgleich Beeinträchtigungen durch Serumkomponenten (z.B. anti-IgE-Antikörper, IgG-blockierende Antikörper), die eine unspezifische Aktivierung bewirken können nicht gänzlich auszuschließen sind. Zum anderen zeichnet sich der Vorteil einer einfacheren Handhabung aus (weniger Zentrifugationsschritte), der speziell für Routine- und Screening-Untersuchungen geeignet ist [42, 137, 151].

Sowohl die Blutentnahme als auch die Aufbewahrung von Blutproben erfordern besondere Bedingungen, um die Lebens- und Funktionsfähigkeit der Zellen zu gewähren. Die Ausbeute einer ausreichenden Anzahl reaktiver Basophile hängt vom Agens, der Lagerungszeit und der Temperatur der Blutprobe ab. Der Empfehlung vieler Autoren hinsichtlich einer Weiterverarbeitung der Blutproben innerhalb von 3 Stunden konnte in dieser Studie in allen Fällen nachgekommen werden. Obwohl heparinisieretes Vollblut bis zur Aufarbeitung innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden kann, scheint es deutlich instabiler und weniger zweckmäßig zu sein im Vergleich zu EDTA-Blut. Bei längerer Probenaufbewahrung sollte der Ansicht einiger Autoren nach EDTA-Blut verwendet und bei 4° C gelagert werden, da hierbei eine Funktionsfähigkeit von mindestens 24 Stunden nachgewiesen werden konnte. Zudem soll bei Probenentnahme in EDTA vielmehr als bei Heparin eine Kontamination mit Blutplättchen zu verhindern sein, die ebenfalls CD63 exprimieren und die durchflusszytometrische Auswertung verfälschen können [33, 44, 137].

Eine übereinstimmende Meinung in Bezug auf die Notwendigkeit einer Preinkubation mit IL-3 als Stimulationspuffer im Rahmen der BAT-Durchführung gibt es bislang nicht [33]. IL-3 gehört zur Gruppe der Zytokine, die eine bedeutende Rolle bei Entzündungsprozessen und Überempfindlichkeitsreaktionen spielen und die Proliferation, Differenzierung und Interaktionen vieler Zellen beeinflussen [142]. Gesichert ist, dass eine Inkubation mit IL-3 den Degranulationsprozess der Basophilen fördert und die Histamin-Freisetzung erhöht [137, 150]. Allerdings ist der genaue Mechanismus der IL-3-Preinkubation bei Basophilen nicht vollständig geklärt. Einige Autoren berichteten über eine erhöhte CD63-Expression nach Allergenexposition bei IL-3-Preinkubation, die eine erhöhte Testsensitivität bewirkt, wobei nachgewiesen werden konnte, dass eine kurze (bis zu 10 Minuten) Stimulierung mit IL-3 (2 ng/ml) die Expression von CD63 an sich nicht hochreguliert, sondern es vielmehr zu einem Priming der Zellen kommt, aus der eine erhöhte Mediatorfreisetzung oder CD63-Expression nach geeigneter Stimulierung resultiert [21, 24]. Für einige Allergene scheint das Priming mit IL-3 eine Hilfestellung zu bieten, um eine allergenspezifische Stimulation von einer unspezifischen Aktivierung oder gar Zytotoxizität abzugrenzen, da deutlich niedrigere Allergenkonzentrationen nötig sind im Vergleich zu Zellen ohne eine vorherige IL-3 Inkubation. Dies ist besonders für Allergene relevant, die nur eine geringe spezifische Basophilenaktivierung hervorrufen, wie beispielsweise zahlreiche Medikamente [17, 137].

Auf eine IL-3-Inkubation wurde im CD203c-BAT dieser Studie verzichtet, da IL-3 die basale CD203c-Expression zwar zu erhöhen vermag, sich dies aber nicht vorteilhaft auf die Sensitivität bzw. Spezifität auswirkt und diese sogar reduzieren kann [21, 111]. Die Verwendung von IL-3 als Stimulationsagens sollte nach Meinung von Monneret et al. [100] für die Testung von Patienten vorbehalten sein, die auf eine Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren nicht mit Histamin-Freisetzung aus den Basophilen reagieren. Diese werden als sog. "Non-Responder" bezeichnet und machen je nach Autor zwischen 15-25% der Patienten und Kontrollpersonen aus.

Dieser Anteil der Non-Responder bezieht sich wesentlich auf die Histaminfreisetzung, für den BAT ist der Prozentsatz gewöhnlich um 5-10% [42]. In dieser Studie wurde kein Patient diesem Status zugeteilt. Die genauen Schritte, die für diesen Freisetzungsmangel verantwortlich sind, sind bis heute nicht genau geklärt. Gezeigt werden konnte aber, dass die IgE-Rezeptordichte auf den Basophilenoberflächen von Non-Respondern denen von Respondern in etwa gleicht, so dass der Freisetzungsmangel nicht auf eine geringere Anzahl an IgE-Rezeptoren zurückzuführen ist. Vielmehr sind verminderte Proteinlevel der Tyrosin Kinase Syk in Basophilen mit diesem Status assoziiert [79].

Non-Responder können zwar positiv in Hauttests sein oder spezifische IgE-Antikörper produzieren, jedoch können Non-Responder durch herkömmliche Verfahren, d. h. Tests, mit denen der Aktivierungsstatus von Basophilen, bzw. die Hochregulierung bestimmter Oberflächenstrukturen erfasst werden, nicht als Allergiker identifiziert werden. Als erste beschrieben Yamaguchi et al. [155] und Kepley et al. [79] diesbezüglich, dass eine Histamin-Freisetzung auch bei Basophilen von Non-Respondern induziert werden kann, wenn diese mit Interleukin IL-3 stimuliert wurden. Auch die Arbeitsgruppe um Bühring bestätigte diese Beobachtungen bei Patienten mit Insektengiftallergie in dem sie demonstrierten, dass eine Inkubation mit IL-3 über mehrere Stunden die basale und allergeninduzierte CD203c-Expression auf Basophilen von Non-Respondern deutlich erhöhte [12].

Von entscheidender Bedeutung beim BAT ist die Wahl bzw. Festlegung der optimalen Allergenkonzentration. Eine allergeninduzierte Hochregulierung der Oberflächenmarker CD63 und CD203c ist gewöhnlich nicht nur auf eine einzige Stimulationskonzentration begrenzt, sondern umfasst vielmehr mehrere Konzentrationsstufen, die einige Log-Skalen umfassen können. Hierbei gilt es denjenigen Konzentrationsbereich zu ermitteln, der bei Allergikern im Gegensatz zu Gesunden zu einem positiven Ergebnis führt. Anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven kann für jedes Allergen die geeignete Konzentration bzw. ein Konzentrationsbereich festgesetzt werden, wie dies für die in dieser Arbeit untersuchten Insektengifte, aber auch für Aeroallergene und Nahrungsmittelallergene bereits erfolgte. Dies ermöglicht BAT-Untersuchungen auf geeignete Testkonzentration zu begrenzen, wodurch eine Unterscheidung zwischen Patienten und Gesunden gelingt [33, 40, 46, 147].

Vereinzelt wurden Konzentrationsstufen für Allergene im BAT von früheren Histamin-Freisetzungs- und Leukotrien-Freisetzungssassays hergeleitet, obgleich diese nicht immer gleichermaßen geeignet sind. Die in dieser Arbeit gewählten Allergenverdünnungsstufen 1,0/ 0,1/ 0,01 µg/ml wurden in Anlehnung an die Ergebnisse von Sturm et al. [147] gewählt, da sich diese im BAT-CD63 bei Testung mit sechs Hymenoptereingift-Verdünnungsstufen (10/ 1/ 0,1/ 0,01/ 0,001/ 0,0001 µg/ml) als optimale Testkonzentrationen erwiesen. Sie deuteten darauf hin, dass die relativ hohe Konzentration von 10 µg/ml Insektengift bei vielen Kontrollpersonen eine scheinbar nicht spezifische Basophilenaktivierung bewirke. Von besonderem Interesse ist es daher Konzentrationen zu ermitteln und auszuschließen, die eine unspezifische Zellstimulierung auslösen oder gar zytotoxisch wirken, da diese zu falsch-positiven sowie falsch-negativen Resultaten führen. In ihren Untersuchungen führte eine höhere Allergenkonzentration bei den Allergiepatienten in der Regel auch zu einer höheren Aktivierung der basophilen Granulozyten, ohne dass falsch-positive Ergebnisse, bedingt durch unspezifische Allergeneffekte bei Kontrollpersonen zu beobachten waren. Auch Erdmann et al. [46] testeten den CD63-BAT mit den Insektengiftkonzentrationen 1 µg/ml und 0,1 µg/ml, die sich in ihrem CD63-BAT ebenfalls als ideale Allergenkonzentrationen für die Beurteilung einer Insektengiftallergie eigneten. Auch sie ermittelten größere Aktivierungswerte bei höherer Allergenkonzentration. Bei Detektion von CD203c wiesen Platz et al. [115] auf den höchsten Aktivierungsgrad in ihrer Studie bei Inkubation der Giftmenge 1 µg/ml hin.



Mit diesen Beobachtungen im Einklang, konnten in der vorliegenden Studie sowohl bei der höchsten Konzentrationsstufe (1 µg/ml) für Bienengift als auch für Wespengift die größten durchschnittlichen Werte einer Basophilenaktivierung bestimmt werden in beiden BAT-Ansätzen. Doch erwies sich diese Konzentration als suboptimal im CD203c-BAT, da sich im Gegensatz zum CD63-BAT bei zwei Kontrollpersonen ohne wespengiftspezifische IgE-Ak bei dieser Konzentration falsch-positive Testresultate ergaben. Die Inkubation mit den Wespengiftkonzentrationen 1 µg/ml und 0,1 µg/ml ergab in der Studie von Erdmann jeweils die gleiche Anzahl positiver Testergebnisse. In der vorliegenden Studie nahm die Sensitivität in Hinsicht auf die Ergebnisse der Standarddiagnostik mit sinkender Allergenkonzentration ab sowohl im CD63-BAT (93%/ 86%/ 33%) als auch im CD203c-BAT (95%/ 91%/ 69%).

Bei Festlegung eines positiven BAT-Ergebnisses aufgrund erhöhter Aktivierungswerte in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsreihen der Insektengifte, wie von einigen Autoren empfohlen, ergibt dies eine optimale Testspezifität in beiden BAT-Protokollen (jeweils 100%), jedoch mit Einbußen hinsichtlich der Sensitivität beider BAT-Verfahren in Bezug auf die Basis-Diagnostik (CD63: 86% vs. 93% und CD203c: 91% vs. 95%).

In den BAT-Ansätzen der vergangenen Jahre kamen unterschiedliche Färbeprotokolle und Gating-Strategien zum Einsatz. Bei der in der Literatur häufig angegebenen Zweifarb-Methode des CD63-BAT wird neben anti-CD63-Ak-Reagenz für die CD63-Detektion ein weiterer basophilen-spezifischer Marker benötigt, um Basophile von anderen Zellen abzugrenzen, da CD63 auch von anderen hämatopoetischen Zellreihen exprimiert wird. Bei Verwendung von anti-IgE-Antikörpern zur Identifizierung von Basophilen muss beachtet werden, dass auch (aktivierte) Monozyten IgE-Rezeptoren exprimieren, wenn auch in weitaus geringerem Maße. Als Alternative eignet sich CD123, ein Typ I Transmembranmolekül der Zytokinrezeptor-Superfamilie, welches die wichtigste Untereinheit des IL-3-Rezeptors darstellt [102]. Allerdings muss hier ebenfalls eine Expression auf Monozyten und anderen Bluteukozyten in Kauf genommen werden. Hier kann die Zellfärbung mit anti-HLA-DR (histocompatibility leukocyte antigen) dazu beitragen, zwischen HLA-DR negativen Basophilen und HLA-DR positiven Monozyten zu unterscheiden [44]. Zudem wiesen einige Autoren auf die Tatsache hin, dass ein Teil der CD63 positiven Zellfraktion durch an Basophile haftende Blutplättchen bedingt sein kann. Diese Beeinträchtigung erwies sich jedoch als vernachlässigbar und scheint die Testqualität (positiv vs. negativ) nicht zu beeinflussen [33, 44]. Dieser Gegebenheit kann im CD203c-BAT ausgewichen werden, da CD203c linienspezifisch für Basophile ist und eine Einfachmarkierung mit anti-CD203c-Ak zur zweifelsfreien Identifizierung aktivierter Basophiler ausreicht. In wie weit diese Einfarb-Methode, die auch in dieser Studie für den CD203c-BAT verwendet wurde den BAT verbessere, wird kontrovers diskutiert [16, 115]. Die Baseline-Level der CD203c-Expression auf Basophilen können interindividuell erhebliche Unterschiede aufweisen, da die Expression dieses Antigens von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beeinflusst werden kann [21]. Die Simple Gating-Strategie vereinfache das Verfahren und minimiere Störfaktoren im Gegensatz zur CD63-Detektion, jedoch sei das sog. Gating wegen des Kontinuum von aktivierten zu ruhenden Zellen schwierig. Zum einen ist bei geringer Spontanexpression von CD203c das Erfassen von ruhenden Basophilen eingeschränkt und zum anderen ist bei erhöhter CD203c-Basalexpression eine Hochregulierung oft nicht messbar, weshalb falsch negative Ergebnisse in Kauf genommen werden müssen [42]. Durch Zweifarb- bzw. Dreifarb-Protokolle kann die Genauigkeit der Bestimmung weiter erhöht werden, wobei neben anti-IgE-Ak oftmals die Detektion von CD45, einem zusätzlichen Oberflächenmarker für Basophile zur Optimierung der Basophilenidentifizierung Anwendung findet [16, 54, 111].

Eine Verbesserung des BAT soll desweiteren durch Markierung von CRTH2 (chemoattractant receptor homologous molecule expressed on T-helper 2 cells) möglich sein. Dieses Antigen kommt auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, Eosinophilen und Basophilen vor [107] und wird aufgrund seiner Übereinstimmung mit dem Prostaglandin D<sub>2</sub>-Rezeptor auch als DP<sub>2</sub> bezeichnet. Die hohe Expression von CRTH2/DP<sub>2</sub> auf Basophilen soll eine Identifizierung dieser Zellen erleichtern, woraufhin Bouvier et al. [18] diesbezüglich ein dreifarbiges flowzytometrisches Protokoll an 18 Probanden mit Latex- oder Hausstaubmilbenallergie erprobten. Neben der CRTH2- und CD203c-Detektion wurde CD3 bestimmt, ein Marker der auf Th2-Lymphozyten, nicht jedoch von Basophilen exprimiert wird. Eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 100% sowie das sichere Erkennen von Basophilen und einer Basophilenaktivierung machen dieses Protokoll ihrer Meinung nach zu einem äußerst zuverlässigen Verfahren für zukünftige Untersuchungen einer flowassistierten Basophilenaktivierung. Ähnliches gilt für CCR3 (CC chemokine rezeptor 3), einem anderen potentiellen, jedoch nicht linienspezifischen Selektionsmarker für Basophile [34]. Um diese sicher von Mastzellen, TH2-Zellen und weiteren Entzündungszellen unterscheiden zu können, ist hier ebenfalls eine ergänzende Markierung mit beispielsweise anti-CD3 sinnvoll [17].

Aufgrund der Entdeckung relativ neuer spezifischer Marker einer Basophilenaktivierung und anhand zahlreicher Untersuchungen der Oberflächenmarker CD63 und CD203c in den vergangenen Jahren, scheint es generell zwei unterschiedliche Gruppen von Basophilen-Aktivierungsmarkern zu geben. Solche mit einer Aktivierungskinetik ähnlich wie CD203c, die nach anti-IgE Stimulation eine rasche und vollständige Hochregulation zeigen. Hierzu zählen die Moleküle CD13 und CD164. Ferner gibt es Aktivierungsmarker, die analog zu CD63 reguliert werden und durch eine etwas langsamere Aktivierungskinetik geprägt sind. Hierzu zählen die Moleküle CD107a und CD107b. In wie weit sich die Detektion dieser neueren Marker für die flowzytometrische Routinediagnostik eignet und ob hierdurch eine Optimierung der BAT-Technik möglich ist, muss genauer ermittelt werden. Zusätzliche Untersuchungen könnten diesbezüglich zu einer weiteren Klärung der Funktionsweise basophiler Granulozyten beitragen bzw. neue Strategien in der Diagnostik und Therapie allergischer Erkrankungen fördern (67, 44).

#### 4.6. Auswertung und Interpretation von BAT-Ergebnissen

Bei einer BAT-Bestimmung werden, um richtige Interpretationen der Ergebnisse zu gewährleisten, zweckmäßig geeignete Kontrollen mitgeführt. In den meisten Veröffentlichungen ist die Positiv-Kontrolle ein poly- oder monoklonaler anti-IgE-Antikörper, der den Proben zugesetzt wird und eine Basophilenaktivierung bewirkt [54, 63, 136]. Zahlreiche monoklonale Antikörper stellen jedoch schwache Aktivatoren dar, weshalb polyklonale Ak zu bevorzugen sind. Als Alternative hierzu finden auch anti-Fcε-I-Rezeptor-Ak Verwendung [1]. Zudem kommt als Positiv-Kontrolle eine die Granulozyten aktivierende Substanz wie beispielsweise fMLP, ein natürlich vorkommendes bakterielles Peptid zum Einsatz. Als sekretionsanregendes Agens wirkt es über einen spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptor (FPR1) auf der Zelloberfläche von Basophilen und bewirkt eine Aktivierung der Phospholipase C und Wege der MAP (mitogen-activated protein)-Kinase [44]. Biochemische und pharmakologische Studien wiesen auf wesentliche Unterschiede zwischen dem IgE-vermittelten Aktivierungsweg und der durch fMLP-ausgelösten Basophilenaktivierung hin, deren gemeinsame Endstrecke unter anderem die Histamin-Liberation darstellt. Dabei sind sowohl bei der IgE-vermittelten als auch bei der fMLP-induzierten Reaktion deutliche interindividuelle Unterschiede bzgl. der Basophilenaktivierung zu verzeichnen [87]. Dies konnte in beiden BAT-Ansätzen des vorliegenden Patientenkollektivs mit ähnlichen Spannweiten der Messwerte bei Inkubation mit fMLP demonstriert werden (CD63: 3,7-77,2%; CD203c: 9,1-77,8%).

Aufgrund von Ergebnissen anderer Studien wird davon ausgegangen, dass fMLP eine vermutlich geringere sekretionsfördernde Potenz im Vergleich zu Insektengiftallergenen aufweist (45). Die durch fMLP induzierte Basophilenaktivierung war bei den 42 Patienten dieser Studie im Schnitt allerdings in beiden BAT-Ansätzen höher als die jeweilige prozentuale Basophilenaktivierung der drei Bienengiftkonzentrationen. Lediglich die Wespengiftkonzentrationsstufen W 1 µg/ml und W 0,1 µg/ml erzielten höhere Aktivierungswerte in beiden BAT-Ansätzen als bei fMLP-Inkubation.

Da eine Aktivierung mit fMLP keine IgE-vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten widerspiegelt, kann es der Meinung einiger Autoren nach nicht als geeignete Positivkontrolle angesehen werden. Es kann vorrangig zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Zellen eingesetzt werden und fehlerhafte Testdurchführungen aufzeigen sowie zur Abklärung einer Pseudoallergie beitragen. Durch Verwendung von anti-IgE-Antikörpern als Positivkontrolle oder von Substanzen, die eine Basophilenaktivierung über den Fcε-I-Rezeptor bewirken gelingt es, Non-Responder zu identifizieren [42, 44].

Als Negativ-Kontrolle wird in den allermeisten Fällen wie auch in diesem Versuchsansatz Waschlösung (PBS) eingesetzt. Erfahrungsgemäß bleibt die Basophilenaktivierung der Negativ-Kontrolle in ca. 80% der Fälle unter einem Wert von 5%, was durch Messungen in beiden BAT-Ansätzen dieser Studie sowohl im Patientenkollektiv als auch in der Kontrollgruppe bekräftigt werden konnte [137, 151]. Die Basalwerte können jedoch erheblich schwanken, da einige Allergene, besonders Nahrungsmittel, eine unspezifische Aktivierung hervorrufen. Insbesondere bei der Untersuchung von Allergenen, die nur eine geringe Stimulierung bewirken, ist ein geringer Basalwert wünschenswert. Hohe Basalwerte können Ausdruck einer in-vivo Allergenexposition sein, wie dies im Fall der Insektengiftallergie unter SIT zu beobachten ist. Weitere Gründe für einen hohen Wert der Negativ-Kontrolle liegen in der Kontamination der Proben durch Endotoxin, Pyrogene oder Allergene während der Inkubation [42,44].

Falsch-negative BAT-Ergebnisse können einerseits durch eine zu lang hinausgezögerte Diagnostik resultieren, weshalb BAT-Untersuchung idealerweise sechs Wochen bis 12 Monate nach einem akuten Ereignis erfolgen sollten. Wie bereits zuvor erwähnt, wird das Testergebnis zudem durch Einnahme von Medikamenten, insbesondere Glukokortikosteroide, Immunmodulatoren, Immunsuppressiva und anti-IgE-Ak verfälscht. Andererseits können falsch-negative Ergebnisse durch technische Ursachen zustande kommen, wie falsche Lagerung der Blutproben oder ungeeignete Stimulierung der Zellen durch ungenau definierte Allergene, die hemmende und zytotoxische Komponenten aufweisen können. Außerdem ist nicht immer die individuell optimale Konzentration im Testansatz für das einzelne Allergen ermittelbar. Daneben führt die Verwendung zytotoxischer Allergenkonzentrationen zu negativen Ergebnissen und auch ein temporärer Non-Responder-Status ist bei einigen Patienten zu verzeichnen. Im Falle von negativen Testresultaten trotz positiver Allergieanamnese sollten all diese Störfaktoren stets sorgfältig überprüft werden und der Test eventuell wiederholt werden [42, 44, 137].

Die Veränderung bzw. Zunahme der Oberflächenexpression verschiedener Basophilenmarker kann zum einen anhand der prozentualen Modifikation der Basophilen oder zum anderen als Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben werden (63, 133). Bezüglich der MFI wird der Anstieg der Oberflächenmarker als relativer Wert, dem Stimulationsindex (SI) bestimmt, der sich als Verhältnis von (allergenaktivierten) stimulierten Zellen und unstimulierten Zellen der Negativkontrolle (Background-Expression) errechnet ( $MFI_{stim}:MFI_{kontrol}$ ) (135). Dabei kann ein SI-Wert über 2,0 als sicherer Hinweis für eine durch die Testsubstanz ausgelöste Basophilenaktivierung gesehen werden [151].

Hinsichtlich der prozentualen Basophilenanzählung ist bei der Festlegung des sog. Cut-Off, dem Schwellenwert für ein positives Testergebnis, besondere Sorgfalt nötig. Dieser sollte die basale CD63- bzw. CD203c-Expression vor Allergenexposition mitberücksichtigen, da diese deutliche Unterschiede aufweisen können. In einigen Studien erfolgte die Cut-Off-Bestimmung nur willkürlich anhand der ermittelten Background-Expression zuzüglich von Standardabweichungen [2, 51]. Daneben wurde von einigen Autoren empfohlen, dass eine Basophilenaktivierung über 15% im CD63-BAT nach Allergenstimulation auf einen Allergiestatus hindeutet, weshalb sich dieser Wert als Cut-Off für ein positives Testresultat eigne [151]. Auch bei der Durchführung dieser Studie wurde dieser Wert gemäß dem Hersteller und in Anlehnung einer ROC-Analyse-basierten Studie als Cut-Off für ein positives Testresultate herangezogen. Bei deutlich niedrigeren Werten ist jedoch problematisch, dass unstimulierte Basophile, je nach verwendeter Antikörper, nicht selten eine weit über diesen Wert reichende CD63-Expression zeigen. Um für jedes Allergen geeignete Cut-Off-Werte zu bestimmen, empfiehlt es sich ROC-Kurven zu erstellen [46, 137, 151]. Die auch in dieser Arbeit erstellte ROC-Analyse ist eine vielfach angewandte Methodik bei der Ergründung und Auswertung neuer Testverfahren mit dem Ziel, durch Festlegung eines idealen Cut-Offs eine hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen, was jedoch immer an Kompromisse geknüpft ist [157].

Zusammenfassend handelt es sich bei dem BAT sowohl bei Bestimmung von CD63 als auch von CD203c um ein relativ einfaches, schnelles (Testergebnisse je nach Markerbestimmung innerhalb 1-2 Stunden verfügbar) und zuverlässiges In-vitro-Diagnoseverfahren bei Insektengiftallergie. In der hier durchgeführten Studie waren beide BAT-Bestimmungsmethoden in der überwiegenden Zahl der Fälle geeignet, die mit Hilfe von Anamnese, spezifischem IgE-Nachweis und Hauttest gestellte Diagnose einer Bienen- und/ oder Wespengiftallergie zu bestätigen, wobei ihre Sensitivitäten und Spezifitäten mit jenen etablierter Routineverfahren verglichen werden können. Für Patienten, bei denen Hauttest und spezifische IgE-Bestimmung eine anamnestisch eruierte Insektengiftallergie nicht sichern konnten oder widersprüchlich ausfielen, konnten beide BAT-Ansätze wertvolle Zusatzinformationen liefern und stellen somit weitere Bausteine und eine optimale Ergänzung der Allergiediagnostik dar. Sie ermöglichen die gleichzeitige Testung verschiedener Allergene unter Verwendung minimalen Blutmengen ohne dass eine Zellisolierung von basophilen Granulozyten erforderlich ist, und stellen als nichtinvasive Testverfahren im Gegensatz zum Hauttest keine Gefährdung des Patienten dar. Auch ist das Erfassen von Allergien gegen bestimmte Allergene möglich, deren Diagnostik über die Bestimmung des allergenspezifischen IgE bisher nur teilweise oder weniger empfindlich gelingt. Allerdings sind bisher weder CD63- noch CD203c-BAT dafür geeignet, valide prognostische Aussagen über die eventuelle Reaktion bei erneutem Insektenstich zu ermöglichen. In wie weit sie den Erfolg einer SIT zu reflektieren vermögen muss durch zusätzliche gezielte Studienansätze weiter abgeklärt werden. Hinsichtlich Sensitivität und Spezifität hat sich der BAT den zellulären Antigen-Stimulations-Tests als ebenbürtig oder teilweise sogar überlegen gezeigt. Zudem soll vor allem der kombinierte Einsatz von BAT und Leukotrien-Freisetzungstest eine hohe Sensitivität und Spezifität bei der Diagnostik einer Insektengiftallergie und anderen Überempfindlichkeitsreaktionen ermöglichen. Die gewöhnlich positiven wissenschaftlichen und klinischen Erfahrungen der letzten Jahre mit dem BAT untermauern dessen Nutzen zur Optimierung der Allergiediagnostik, wobei in der Standardisierung des BAT hinsichtlich Testablauf und Auswertung ein wesentlicher Beitrag hierfür zu sehen ist.

## Zusammenfassung

Die Insektengiftallergie ist eine IgE-vermittelte Soforttypreaktion, die mit milden Allergiesymptomen bis hin zu lebensbedrohlichen Anaphylaxien einhergehen kann. Die korrekte Diagnose bei Insektengiftallergie ist wegen der therapeutischen Konsequenzen in Hinblick auf eine Spezifische Immuntherapie wichtig. Pfeiler der Diagnostik sind Anamnese, Hauttests und der Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern. Vor allem basophile Granulozyten stehen als hypersensitive Effektorzellen im Fokus zusätzlicher In-vitro-Laboruntersuchungen um IgE-vermittelte Sensibilisierungen zu erkennen, wenn Ergebnisse der Basis-Diagnostik diskrepanz sind. Der Basophilenaktivierungstest misst die allergenspezifische Aktivierung basophiler Granulozyten durch flowzytometrische Detektion bestimmter Oberflächenstrukturen, wobei die Aktivierungsmarker CD63 und CD203c bisher am häufigsten hierfür herangezogen werden.

In die Studie wurden 42 Patienten mit Verdacht auf eine Insektengiftallergie sowie 25 Kontrollpersonen ohne anamnestische Hinweise auf eine Allergie gegen Insektengift aufgenommen. Im CD63-BAT (Basotest<sup>®</sup>) wurden Vollblut-Proben (100 µl) mit IL-3 (2 ng/ml) stimuliert (10 Min, 37° C) und anschließend mit Bienen- und Wespengift unterschiedlicher Konzentrationen (1/ 0,1/ 0,01 µg/ml) inkubiert (15min) und mit Zweifarb-Antikörper-Reagenz (anti-IgE-PE und anti-CD63-FITC) markiert (20 Min im Eisbad). Für den CD203c-Ansatz kamen die gleichen Giftkonzentrationen und Inkubationszeiten zur Anwendung, jedoch wurde anstelle von IL-3 Waschlösung (PBS) den Proben zugesetzt und eine Einfachfärbung der Basophilen mit dem CD203c-spezifischen Antikörper 97A6-PE durchgeführt (20 Min im Eisbad). PBS diente als Negativ- und fMLP als Positiv-Kontrolle. Es folgte die flowzytometrische Analyse mit Bestimmung des Prozentsatzes aktivierter basophiler Granulozyten. Die Ergebnisse der Basophilenaktivierungstests wurden mit jenen der Standarddiagnostik (Evaluation der Anamnese, Intrakutantest, Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper) einerseits und andererseits miteinander verglichen.

Die mittlere Basophilenaktivierung im CD203c-BAT lag in allen Konzentrationsstufen der Insektengifte und der Kontrollansätze nicht signifikant über den Aktivierungswerten des CD63-BAT. In der Kontrollgruppe ohne spezifische IgE-Antikörper (n= 18) lag die CD63-Expression bei allen Giftkonzentrationen unter dem Cut-Off (15% nach ROC-Analyse) und die CD203c-Expression in 16 von 18 Fällen (14% nach ROC-Analyse). Bei den Kontrollen mit spezifischen IgE-Antikörpern (n= 7) blieb die durchschnittliche CD63- und CD203c-Expression unterhalb der Cut-Off-Werte bei allen Bienengiftkonzentrationen. Die Inkubation mit 1 µg/ml und 0,1µg/ml Wespengift führte zu mittleren Aktivierungswerten über die Grenzwerte in beiden BAT-Ansätzen (CD63: 19,7%, 18,2%; CD203c: 21,5%, 18,6%). Von 42 Patienten zeigten beide BAT-Ansätze in 35 (83%) Fällen identische Testresultate unabhängig von den Ergebnissen der Routinediagnostik. In Bezug auf die Anamnese ließ sich für den CD63-BAT eine Sensitivität von 91% und für den CD203c-BAT von 97% evaluieren. Mit Hilfe des CD63-BAT ließ sich für 39 (93%) von 42 Patienten die Diagnose der Standardverfahren (Hauttest, spezifische IgE-Bestimmung) bestätigen, bei der Bestimmung von CD203c gelang dies in 40 (95%) von 42 Fällen.

Für den CD63-BAT konnte eine Spezifität von 100% und für den CD203c-BAT eine Spezifität von 89% ermittelt werden hinsichtlich der Kontrollen ohne spezifische IgE-Antikörper. Der Prozentsatz an aktivierten Basophilen nahm mit der Konzentration des zur Stimulation verwendeten Insektengiftes in beiden BAT-Ansätzen zu und die Sensitivität bezüglich Standarddiagnostik mit sinkender Allergenkonzentration ab sowohl im CD63-BAT (93%/ 86%/ 33%) als auch im CD203c-BAT (95%/ 91%/ 69%). Es konnte eine Korrelation von  $r = 0,83$  ( $p < 0,05$ ) zwischen den CD63- und CD203c-BAT-Ergebnissen eruiert werden wobei der Korrelationskoeffizient für die höchste Bienengift- bzw. Wespengiftkonzentration mit  $r = 0,89$  ( $p < 0,05$ ) bzw.  $r = 0,73$  ( $p < 0,05$ ) berechnet werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit erwies sich der BAT mit Detektion sowohl von CD63 als auch von CD203c als zuverlässiges und empfindliches zelluläres In-vitro-Verfahren für die Diagnose einer Insektengiftallergie, wobei ihre Sensitivität mit denen üblicher etablierter Diagnoseverfahren verglichen werden kann. Darüber hinaus konnten beide BAT-Ansätze hilfreiche Zusatzinformationen liefern das relevante Insekt zu spezifizieren und die adäquate SIT zu wählen, wenn diskrepante Ergebnisse der Basis-Diagnostik oder Doppelsensibilisierungen vorlagen. Empfehlungen hingegen, welchem der beiden Tests der Vorrang zu gewähren ist, können bislang nicht gegeben werden. Vor allem müssen technische Aspekte der BAT-Methodik berücksichtigt werden und auf Unterschiede bzgl. optimaler Testkonditionen der Oberflächenmarker CD63 und CD203c geachtet werden. Der kombinierte Einsatz von BAT mit anderen In-vitro-Verfahren kann die Diagnosefindung spezifizieren, wobei die Interpretation der Ergebnisse immer in Hinblick auf das klinische Gesamtbild erfolgen sollte. In Anbetracht dieser Tatsachen stellen BAT-Untersuchungen hilfreiche diagnostische Bausteine in der Allergologie dar.

## Literaturverzeichnis

1. Abuaf, N., Rajorly, B., Ghazouani, E., Levy, D.A., Pecquet, C., Chabane, H.  
Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy.  
J Allergy Clin Immunol 104 (1999) 411-418
2. Abuaf, N., Rostane, H., Rajoely, B., Gaouar, H., Autegarden, J.E., Leynadier, F., Girot, R.  
Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy.  
Clin Exp Allergy 38 (2008) 921-928
3. Gräber, T., Sellinger, M., Niemeier, V., Gieler, U., von Hintzenstern, U.  
Notfälle, Innere Erkrankungen, Psychische Erkrankungen.  
In: "Klinikleitfaden Dermatologie", Altmeyer, P., Dirschka, Th., Hartwig, R. (Hrsg.)  
Urban & Fischer Verlag, München, 2003
4. Andoh, K., Jin-Hua, P., Terashima, K., Nakamura, H., Sano, K.  
Genomic structure and promoter analysis of the ecto-phosphodiesterase I gene (PDNP3) expressed in glial cells.  
Biochim Biophys Acta 1446 (1999) 213-224
5. Arbeitsanweisung Basotest®, Version 06/97.  
Orpegen Pharma, Heidelberg, 1997
6. Armstrong, L.W., Rom, W.N., Martiniuk, F.T.  
The gene for lysosomal protein CD63 is normal in patients with hermansky-pudlak syndrome  
Lung 176 (1998) 249-256
7. Atkinson, B., C. S. Ernst, B. F. D. Ghrist, A. H. Ross, Clark, W. H.  
Monoclonal antibody to a highly glycosylated protein reacts in fixed tissue with melanoma and other tumors.  
Hybridoma 4 (1985) 243-255
8. Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L., Sandoval, I.V.  
Biosynthesis, glycosylation, movement through the golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins.  
J Biol Chem 261 (1986) 16755-16763
9. Bellinghausen, I., Metz, G., Enk, A.H., Christmann, S., Knop, J., Saloga, J.  
Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects.  
Eur J Immunol 27 (1997) 1131-1139
10. Berdichevski, F., Zutter, M.M., Hemler, M.E.  
Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins).  
Mol Biol Cell 7 (1996) 193-207

11. Bilo, B.M., Rueff, F., Mosbech, H., Bonifazi, F., Oude-Elberink, J. N. G., Birnbaum, J., Bucher, C., Forster, J., Hemmer, W., Incorvaia, C., Kontou Fili, K., Gawlik, R., Müller, U., Fernandez, J., Jarish, R., Jutel, M., Wuthrich, B.  
Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. EAACI Position Paper.  
*Allergy* 60 (2005) 1339-1349
12. Binder, M., Fierlbeck, G., King, T.P., Valent, P., Bühring, H.J.  
Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients.  
*Int Arch Allergy Immunol* 129 (2002) 160–168
13. Blaauw, P.J., Smithius, O.L.M.J., Elbers, A.W.D.  
The value of an in-hospital insect sting challenge as a criterion for application or omission of immunotherapy.  
*J Allergy Clin Immunol* 98 (1996) 39-47
14. Bochner, B.S.  
Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences.  
*J Allergy Clin Immunol* 106 (2000) 292-302
15. Boucheix, C., Rubinstein, E.  
Tetraspanins  
*Cell Mol Life Sci* 58 (2001) 1189-1205
16. Boumiza, R., Monneret, G., Forissier, M.F., Savoye, J., Gutowski, M.C., Powell, W.S., Bienvenu, J.  
Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63.  
*Clin Exp Allergy* 33 (2003) 259-265
17. Boumiza, R., Debard, A.L., Monneret, G.  
The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives.  
*Clin Mol Allergy* 3 (2005) 9
18. Bouvier, G., Debard, A.L., Gendt, L., Canino, C., Bienvenu, J., Monneret, G.  
A new three-colour flow cytometric combination (CD203C/CRTH2/CD3) for monitoring allergen-induced basophil activation.  
*Cytometry* 59A (2004)134
19. Bühring, H.J., Simmons, P.J., Pudney, M., Müller, R., Jarrossay, D., van Agthoven, A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P., Kanz, L.  
The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors.  
*Blood* 94 (1999) 2343-2356
20. Bühring HJ, Seiffert M, Giesert C, Marxer A, Kanz L, Valent P, Sano K  
The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 3.  
*Blood* 97 (2001) 3303-3305
21. Bühring, H.J., Streble, A., Valent, P.  
The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis.  
*Int Arch Allergy Immunol* 133 (2004) 317-329



22. Cahen, Y.D., Maly, F.E., WuÈthrich, B.  
Cellular antigen stimulation test (CAST) -Verwendbarkeit in den Diagnostik von Insektengiftallergien.  
Schweiz Med Wochenschr 127 (1997) 5-11
23. Coombs, R.R.A., Gell, P.G.H.  
The classification of allergic reactions underlying disease.  
In: "Clinical aspects of immunology", Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., (Eds.)  
Davis, Philadelphia (1963)
24. Cozon G., Ferrandiz J., Peyramond D., Brunet J.  
Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients  
Allergol Immunopatholo (Madr) 27 (1999) 182-187
25. Creticos, P.S., Van Metre, T.E., Mardiney, M.R., Rosenberg, G.L., Norman, P.S., Adkinson, N.F., Jr.  
Dose response of IgE and IgG antibodies during ragweed immunotherapy.  
J Allergy Clin Immunol 73 (1984) 94-104
26. Deissler H, Lottspeich F, Rajewski MF  
Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130<sup>RB13-6</sup> reveals relationship to human and murine PC-1.  
J Biol Chem 270 (1995) 9849-9855
27. Demetrick, D.J., Herlyn, D., Tretiak, M., Creasey, D., Clevers, H., Donoso, L.A., Vennegoor, C.J.G.M., Dixon, W.T., Jerry, L.M.  
ME491 melanoma-associated glycoprotein family: antigenic identity of ME491, NK1/C-3, neuroglandular antigen (NGA), and CD63 proteins.  
J Natl Cancer Inst 84 (1992) 422-429
28. De Weck, A.L., Stadler, B.M., Urwyler, A., Wehner, H.U., Bühlmann, R.P.  
Cellular allergen stimulation test (CAST) - a new dimension in allergy diagnostics.  
Allergy Clin Immunol News 5 (1993) 9-14
29. De Weck, A.L., Sanz, M.L.  
Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test (Fast/ Flow-CAST)  
ACI Int 14 (2002) 204-215
30. De Weck, A.L., Sanz, M.L.  
For allergy diagnostic flow cytometry, detection of CD203c instead of CD63 is not at all an improvement in other hands. Correspondence regarding Boumiza, R., Monneret, G., Forrissier, M.F. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. Clin Exp Allergy 33 (2003) 259-65.  
Clin Exp Allergy 33 (2003) 849-853
31. De Weck, A.L., Sanz, M.L.  
Cellular Allergen Stimulation Test (CAST) 2003, a review.  
J Invest Allergol Clin Immunol 14 (2004) 253-273
32. De Weck, A.L., Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Aberer, W., Bienvenu, J., Blanca, M., Demoly, P., Ebo, D.G., Monneret, G., Sainte-Laudy, J.  
Diagnostic tests based on human basophils: more potentials than pitfalls.  
Int Arch Allergy Immunol 146 (2008) 177-189

33. De Weck, A.L., Sanz, M.L., Gamboa, .P.M., Aberer, W., Bienvenu, J., Blanca, M., Demoly, P., Ebo, D.G., Mayorga, L., Monneret, G., Sainte-Laudy, J.  
Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical Issues  
*J Investig Allergol Clin Immunol* 18 (2008) 143-155
34. Ducrest, S., Meier, F., Tschopp, C., Pavlovic, R., Dahinden C.A.  
Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers.  
*Allergy* 60 (2005) 1446-1450
35. Dvorak, A.M.  
A role for vesicles in human basophil secretion  
*Cell Tissue Res*, 293 (1997) 1-22
36. Eberlein-König, B., Kolsouzidou, S., Przybilla, B.  
Changes of histamine and leukotriene release during specific vespid venom hyposensitization.  
*Allergo J* 6 (1997) S42-S43
37. Eberlein-König, B., Rakoski, J., Behrendt, H., Ring, J.  
Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy.  
*J Invest Allergol Clin Immunol* 14 (2004) 10-16
38. Eberlein-König, B., Schmidt-Leidescher, C., Rakoski, J., Behrendt, H., Ring J.  
In vitro basophil activation test using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy.  
*J Investig Allergol Clin Immunol* 16 (2006) 5-10
39. Ebo, D.G., Lechkar, B., Schuerwegh, A.J., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Validation of a two-colour flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy.  
*Allergy* 57 (2002) 706-712
40. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow?  
*Clin Exp Allergy* 34 (2004) 332-339
41. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Flow cytometric analysis of in vitro activated basophils, specific IgE and skin tests in the diagnosis of pollen-associated food allergy.  
*Cytometry B Clin Cytom* 64 (2005) 28-33
42. Ebo, D.G., Sainte-Laudy, J., Bridts, C.H., Mertens, C.H., Hagendorens, M.M., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives.  
*Allergy* 61 (2006) 1028-1039
43. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Schuerwegh, A.J., Beirens, L.M.N., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J.  
Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy.  
*Cytometry Part B* 72B (2007) 196-203

44. Ebo, D.G., Bridts, C.H., Hagendorens, M.M., Aerts, N.E., De Clerck, L.S., Stevens, W.J. Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in Allergology. *Cytometry Part B* 74B (2008) 201-210
45. Erdmann, S.M., Heussen, N., Moll-Slodowy, S. CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 33 (2003) 607-614
46. Erdmann, S.M., Sachs B., Kwiecien, R., Moll-Slodowy, S., Sauer, I., Merk, H.F. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 59 (2004) 1102-1109
47. Escribano, L., Orfao, A., Diaz Agustin, B. Human bone marrow mast cells from indolent systemic mast cell disease constitutively express increased amounts of the CD63 protein on their surface. *Cytometry* 34 (1998) 223-228
48. Falcone, F.H., Haas, H., Gibbs, B.F. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 96 (2000) 4028-4035
49. Fischer, P., Külzer, R. Zur Prävalenz der Insektengift-Allergie in Deutschland. *Allergo J* 2 (1993) 53-56
50. Fitzgerald, K., Flood, A. Hymenoptera stings. *Clin Tech Small Anim Pract* 21 (2006) 194-204
51. Freitag, M., Höxtermann, S., Freitag, A.P., Straube, M., von Kobyletzki, G., Altmeyer, P., Szliska, C. Flowzytometrische Messung der Aktivierung basophiler Granulozyten zur Diagnose der Wespengiftallergie. *Allergologie* 24 (2001) 2-8
52. Fukuda, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* 266 (1991) 21327-21330
53. Gamboa, P., Sanz, M.L., Caballero, M.R., Urrutia, I., Antepará, I., Esparza, R. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 34 (2004) 1448-1457
54. Gane, P., Pecquet, C., Lambin, P., Abuaf, N., Leynadier, F. Flow cytometry evaluation of human basophils. *Cytometry* 14 (1993) 344-348
55. Ghannadan, M., Hauswirth, A.W., Schernthaner, G.H., Müller, M.R., Klepetko, W., Schatzl, G., Sperr, W.R., Bühring, H.J., Valent, P. Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 127 (2002) 299-307

56. Goding, J.W., Grobber, B., Slegers, H.  
Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family  
*Biochim Biophys Acta* 1638 (2003) 1-19
57. Goldberg, A., Confino-Cohen, R.  
Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis.  
*J Allergy Clin Immunol* 100 (1997) 182-184
58. Golden, D.B.K., Marsh, D.G., Kagey-Sobotka, A., Freidhoff, L., Szklo, M., Valentine, M.D.  
Epidemiology of insect venom sensitivity.  
*JAMA* 262 (1989) 240-244
59. Golden, D.B.K., Kagey-Sobotka, A., Norman, P.S., Hamilton, R.G., Lichtenstein, L.M.  
Insect sting allergy with negative skin test responses.  
*J Allergy Clin Immunol* 107 (2001) 897-901
60. Golden, D.B.K.  
Insect sting anaphylaxis.  
*Immunol Allergy Clin North Am* 27 (2007) 261-272
61. Green, A., Reisman, R., Arbesman, C.,  
Clinical and immunologic studies of patients with large local reactions following insect stings.  
*J Allergy Clin Immunol* 66 (1980) 186-189
62. Hamilton, R.G.  
Diagnostic methods of insect sting allergy  
*Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5 (2004) 209-212
63. Hauswirth, A.W., Natter, S., Ghannadan, M., Majlesi, Y., Scherthaner, G.H., Sperr, W.R., Bühring, H.J., Valenta, R., Valent, P.  
Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals.  
*J Allergy Clin Immunol* 110 (2002) 102-109
64. Heijnen H.F.G., Debili, N., Vainchencker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J., Sixma, J.J.  
Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet-granules  
*Blood* 91 (1998) 2313-2325
65. Hemmer, W., Focke, M., Kolarich, D.  
Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 108 (2001) 1045-1052
66. Hemmer, W.  
Kreuzreaktivität auf Bienen- und Wespengift  
*Hautarzt* 59 (2008) 194-199
67. Hennersdorf, F., Florian, S., Jakob, A., Baumgartner, K., Sonneck, K., Nordheim, A., Biedermann, T., Valent, P., Bühring H.J.  
Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation.  
*Cell Res* 15 (2005) 325-335

68. Hider, R.C.  
Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides  
Endeavour 12 (1988) 60-65
69. Hipler, U.C., Schlenvoigt, G., Bauer, A., Gebhardt, M., Elsner, P.  
Der Zellantigenstimulationstest (CAST) in der Diagnostik von Allergien und Intoleranzreaktionen auf Hymenopterngifte.  
Allergologie 22 (1999) 481-486
70. Hölldobler, B., Wilson, E.O.  
Ameisen – die Entdeckung einer faszinierenden Welt.  
Birkhäuser Verlag, Basel, 1995
71. Höxtermann, S., Auer, T., Altmeyer, P.  
Zelluläre in vitro Diagnostik mittels CAST-ELISA: Leukotriennachweis bei Wespengiftallergie.  
Allergologie 16 (1995) 287-291
72. 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
73. Hoffman, D.R.,  
Allergens in hymenoptera venom. XXV. The amino acid sequence of antigen 5 molecules and the structural basis for antigenic cross-reactivity.  
J Allergy Clin Immunol 92 (1993) 707-716
74. Horejsi, V., Vlcek, C.  
Novel structurally distinct family of leukocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63.  
FEBS Lett 288 (1991) 1-4
75. Hotta, H., Ross, A.H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M.V., Ricciardi, R.P., Tsujimoto, Y., Croce, C.M., Koprowski, H.  
Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression.  
Cancer Res 48 (1988) 2955-2962
76. Jeep, S., Kirchoff, E., O'Connor, A., Kunkel, G.  
Comparison of Phadebas RAST with the Pharmacia CAP system for insect venom.  
Allergy 47 (1992) 212-217
77. Jentsch, J.  
Bienengift - Zusammensetzung und Wirkung.  
Biologie in unserer Zeit 8 (1978) 75-81
78. Jin-Hua, P., Goding, J.W., Nakamura, H., Sano, K.  
Molecular cloning and chromosomal localization of PD-I $\beta$  (PDNP3), a new member of the human phosphodiesterase I genes  
Genomics 45 (1997) 412-415
79. Kepley, C., Youssef, L., Andrews, R., Wilson, B., Oliver, J.  
Syk deficiency in nonreleaser basophils.  
J Allergy Clin Immunol 104 (1999) 279-284

80. Kettner, A., Hughes, G.J., Frutiger, S., Astori, M., Roggero, M., Spertini, F., Corradin, G.  
Api m 6: A new bee venom allergen  
*J Allergy Clin Immunol* 107 (2001) 914-920
81. King, T.P., Sobotka, A.K., Alagon, A., Kochoumian, L., Lichtenstein, L.M.  
Allergens of honey bee venom  
*Arch Biochem Biophys* 172 (1976) 661-671
82. King, T.P., Lu, G., Gonzalez, M., Qian, N.F., Soldatova, L.N.  
Yellow jacket allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy.  
*J Allergy Clin Immunol* 98 (1996) 588-600
83. King, T.P., Spangfort, M.D.  
Structure and biology of stinging insect venom allergens.  
*Int Arch Allergy Immunol* 123 (2000) 99-106
84. Kleine-Tebbe, J.  
Immunologisch basierte allergologische Diagnostik in vitro und ex vivo.  
*Allergo J* 12 (2003) 198-200
85. Kleine-Tebbe, J., Bergmann, K.C., Friedrichs, F., Fuchs, T., Jung, K., Klimek, I., Kühr, J., Lässig, W., Lepp, U., Niggemann, B., Rakoski, J., Rebien, W., Renz, H., Saloga, J., Simon, J., Sitter, H., Virchow, C., Worm, M.  
Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. Leitlinie der DGAKI, des ÄDA und der GPA.  
*Allergo J* 15 (2006) 56-74
86. Knol, E.F., Mul, F.P.J., Jansen, H., Calafat, J., Roos, D.  
Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435.  
*J Allergy Clin Immunol* 88 (1991) 328-338
87. Knol, E.F., Koenderman, L., Mul, F., Verhoeven, A., Ross, D.  
Differential activation of human basophils by anti-IgE and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Indications for protein kinase C-dependent and -independent activation pathways.  
*Eur J Immunol* 21 (1991) 881-885
88. Koyama, Y., Suzuki, M., Yoshida, T.  
CD63, a member of tetraspan transmembrane protein family, induces cellular spreading by reaction with monoclonal antibody on substrata.  
*Biochem Biophys Res Commun* 246 (1998) 841-846
89. Kwon, M., Shin, S., Yim, S., Lee, K., Kang, H., Kim, T., Chung, Y.  
CD63 as a biomarker for predicting the clinical outcomes in adenocarcinoma of lung  
*Lung Cancer* 57 (2007) 46-53
90. Lambert, C., Guilloux, L., Dzviga, C., Gourgaud-Massia, C., Genin, C.  
Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to hymenoptera venom.  
*Cytometry Part B* 52B (2003) 13-19
91. Larsen, J.N., Lowenstein, H.  
Allergen nomenclature.  
*J Allergy Clin Immunol* 97 (1996) 577-578

92. Maecker, H.T., Scotif, C.T., Shoshana, L.  
The tetraspanin superfamily: molecular facilitators.  
FASEB J 11 (1997) 428-442
93. Majlesi, Y., Samorapoompichit, P., Hauswirth, AW., Schemthaler, GH., Ghannadan, M., Baghestanian, M., Rezaie-Majd, A., Valenta, R., Sperr, WR., Bühring, H.J., Valent, P.  
Cerivastatin and atorvastatin inhibit IL-3-dependent differentiation and IgE mediated histamine release in human basophils and downmodulate expression of the basophil-activation antigen CD203c/E-NPP3.  
J Leukoc Biol 73 (2003) 107-117
94. Maly, F.E., Mart-Wyss, S., Blumer S., Cuhat-Stark, I., Wüthrich, B.  
Mononuclear blood cell sulfidoleukotriene generation in the presence of Interleukin-3 and whole blood histamine release in honey bee and yellow jacket venom allergy.  
J Invest Allergol Clin Immunol 7 (1997) 217-224
95. Mantegazza, A.R., Barrio, M.M., Moutel, S., Bover, L., Weck, M., Brossart, P., Teillaud, J.L., Mordoh, J.  
CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells.  
Blood 104 (2004) 183-190
96. Mauss, V.  
Einfluß der Lebensweise, Populationsdynamik und Abwehrverhalten akuleater Hymenopteren auf das Stichrisiko für den Menschen.  
Allergologie 2 (1999) 42 - 45
97. Metzelaar, M., Wijngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., Clevers, H.C.  
CD63 antigen: a novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells.  
J Biol Chem 266 (1991) 3239-3245
98. Metzger, H.  
The receptor with high affinity for IgE.  
Immunol Rev 125 (1992) 37-48
99. Monneret, G., Gutowski, M.C., Bienvenu, J.,  
Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method.  
Clin Exp Immunol 115 (1999) 393-396
100. Monneret, G., Bouzima, R., Powell, W.S.  
Response by the authors: detection of CD203c is clearly an improvement for monitoring basophil activation in whole blood. Correspondence regarding Boumiza, R., Monneret, G., Forrissier, M.F. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. Clin Exp Allergy 33 (2003) 259-65.  
Clin Exp Allergy 33 (2003) 849-853
101. Monneret, G., Boumiza, R., Gravel, S., Cossette, C., Bienvenu, J., Rokach, J., Powell, W.S.  
Effects of prostaglandin D2 and 5-lipoxygenase products on the expression of CD203c and CD11b by basophils.  
J Pharmacol Exp Ther 312 (2004) 627-634
102. Moretti, S., Lanza, F., Dabusti, M., Tieghi, A., Campioni, D., Dominici, M, Castoldi, G.A.  
CD123 (Interleukin 3 receptor  $\alpha$  chain).  
J Biol Regul Homeost Agents 15 (2001) 98-100

103. Mothes, N., Valenta, R., Spitzauer, S.  
Allergy testing: the role of recombinant allergens.  
*Clin Chem Lab Med* 44 (2006) 125–132
104. Müller, U. R.  
"Insektenstichallergie: Klinik, Diagnostik und Therapie"  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1988
105. Müller, U., Mosbech H.  
Position paper: Immunotherapy with Hymenoptera venoms. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)  
*Allergy* 48 (1993) 37-46
106. Müller, U.  
New developments in diagnosis and treatment of hymenoptera venom allergy.  
*Int Arch Allergy Immunol* 124 (2001) 447-453
107. Nagata K, Hirai H, Tanaka K, Ogawa K, Aso T, Sugamura K et al.  
CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s).  
*FEBS Lett* 459 (1999) 195-199
108. Nakagawa, T., Stadler, B.M., De Weck, A.L.  
Flow-cytometric analysis of human basophil degranulation. Quantification of human basophils and their degranulation by flow-cytometry.  
*Allergy* 36 (1981) 39-47
109. Nieuwenhuis, H.K., Oosterhout van, J.J.G., Rozemuller, E., Iwaarden van, F., Sixma, J.J.  
Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000 molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation.  
*Blood* 70 (1987) 838-45
110. Nishibori, M., Cham, B., McNicol, A.  
The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak Syndrome, and appears identical to granulophysin.  
*J Clin Invest* 91 (1993) 1775-1782
111. Ocmant, A., Peignois, Y., Mulier, S., Hanssens, L., Michils, A., Schandené, L.  
Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c upregulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy.  
*J Immunol Methods* 320 (2007) 40-48
112. Okochi, H., Mine, T., Nashiro, K.  
Expression of tetraspan transmembrane family in the epithelium of the gastrointestinal tract.  
*J Clin Gastroenterol* 29 (1999) 63-67
113. Patrizzi, R., Müller, U., Yman, L., Hoigne, R.  
Comparison of Skin tests and RAST for the diagnosis of bee sting allergy.  
*Allergy* 34 (1979) 249-256
114. Pierkes, M., Bellinghausen, I., Hultsch, T., Metz, G., Knop, J., Saloga, J.  
Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells.  
*J Allergy Clin Immunol* 103 (1999) 326-332



115. Platz, I.J., Binder, M., Marxer, A., Lischka, G., Valent, P., Bühring, H.J.  
Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 3 in sensitized individuals.  
Int Arch Allergy Immunol 126 (2001) 335-342
116. Przybilla, B., Ring, J., Wielgosch, J.  
Der Basophilen-Histamin-Freisetzungstest als diagnostische Methode bei Hymenoptereingift-Allergie.  
Hautarzt 39 (1988) 662-670
117. Przybilla, B.  
Bienen- und Wespengiftallergie.  
Hautarzt 44 (1993) 611-623
118. Przybilla, B., Müller, U., Jarisch, R., Ruëff, F.  
Erhöhte basale Serumtryptasekonzentration oder Mastozytose als Risikofaktor der Hymenoptereingiftallergie: Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAKI).  
Allergo J 13 (2004) 440-442
119. Przybilla, B., Ruëff, F., Fuchs, T., Pfeiffer, C., Rakoski, J., Stolz, W., Vieluf, D.  
Insektengiftallergie: Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI)  
Allergo J 13 (2004) 186-190
120. Pumphrey, R., Roberts, I.  
Postmortem findings after fatal anaphylactic reactions  
J Clin Pathol. 53 (2000) 273-276
121. Reimers, A., Müller, U.  
Labordiagnostik bei der Insektengift-Allergie.  
J Lab Med 26 (2002) 115-119
122. Reimers, A., Müller, U.  
Bienen- und Wespengiftallergie.  
Schweiz Med Forum 4 (2004) 661-665
123. Reisman, R.E., Wypych, J., Arbesman, C.E.  
Stinging insect allergy: Detection and clinical significance of venom IgE antibodies.  
J Allergy Clin Immunol 56 (1975) 443-449
124. Renz, H., Becker, W.M., Bufe, A., Kleine-Tebbe, J., Raulf-Heimsoth, M., Saloga, J., Werfel, T., Worm, M.  
In-vitro-Labordiagnostik. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI).  
Allergo J 11 (2002) 492-506
125. Renz, H.  
Immunsystem  
In: "Integrative klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie", Renz, H. (Hrsg.)  
Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York, 2003
126. Rieger-Ziegler, V., Rieger, E., Kränke, B., Aberer, W.  
Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first weeks after a sting.  
Int Arch Allergy Immunol 120 (1999) 166-168

127. Ring, J., Messmer, K.  
Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes.  
*Lancet* 1 (1977) 466-469
128. Ring, J., Lonsdorf, G., Schury, W., Burg, G.  
Bienen- und Wespengift-Allergie.  
*Münch Med Wochenschr* 124 (1982) 587-59
129. Ring, J., Rakoski, J., Ollert, M.  
Allergologie  
In: "Fallstricke und Fehlerquellen in der Dermatologie", Köhn, F.M., Ring, J. (Hrsg.)  
Springer Verlag, Wien-New York, 2004
130. Ruëff, F., Przybilla, B., Müller, U., Mosbech, H.  
The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy.  
*Allergy* 51 (1996) 216-225
131. Sabbah, A., Sainte-Laudy, J.  
Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation.  
*Allergy Clin Immunol Int* 8 (1996) 116-119
132. Sainte-Laudy, J., Valcon, C., Guérin, J.C.  
Analyse de l'expression membranaire du marqueur CD63 par activation du basophile humain.  
*Allergol Immunol (Paris)* 26 (1994) 211-214
133. Sainte-Laudy, J., Sabbah, A., Vallon, C., Guerin, J.C.  
Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release.  
*Inflamm Res* 47 (1998) 401-408
134. Sainte-Laudy, J., Sabbah, A., Drouet, M., Lauret, M.G., Loiry, M.  
Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release.  
*Clin Exp Allergy* 30 (2000) 1166-1171
135. Sanz, M.L., Gamboa P.M., Antépara, I., Usua, C., Vila, R., Garcia-Avilés, C. Chazot, M., De Weck, A.L.  
Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics.  
*Clin Exp Allergy* 32 (2002) 277-286
136. Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Garcia-Aviles, C., Vila, L., Dieguez, I., Antepara, I.  
Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy.  
*Int Arch Allergy Immunol* 130 (2003) 33-39
137. Sanz M.L., Gamboa, P.M., De Weck, A.L.  
In vitro Tests: Basophil Activation Tests  
In: "Drug Hypersensitivity", Pichler, W.J. (Ed.)  
Karger, Basel, 2007, 391-402
138. Sauer, G., Kurzeder, C., Grundmann, R., Kreienberg, R., Zeillinger, R., Deissler, H.  
Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells.  
*Oncol Rep* 10 (2003) 405-410

139. Schäfer, T., Vieluf, D., Berger, J., Ring, J.  
Epidemiologie von Insektengiftallergien  
*Allergo J* 6 (1997) S4-S6
140. Scherer K., Weber J. M., Jermann, T.M., Krautheim A., Tas E., Ueberschlag E.V.,  
Cammarata M., Bircher, A.J.  
Cellular in vitro assays in the diagnosis of hymenoptera venom allergy.  
*Int Arch Allergy Immunol* 146 (2008) 122-132
141. Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C., Conjeaud, H.  
Structure of the tetraspanins main extracellular domain.  
*J Biol Chem* 276 (2001) 40055-40064
142. Serafin, W.E., Austen, K.F.  
Mediators of immediate hypersensitivity reactions.  
*N Engl J Med* 317 (1987) 30-34
143. Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Lida, J., Skubitz, A.P.  
CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18 and transmits an activation  
signal in neutrophils.  
*J Immunol* 157 (1996) 3617-3626
144. Sobotka, A.K., Valentine, M.D., Benton, A.W., Lichtenstein, L.M.  
Allergy to insect stings. I. Diagnosis of IgE-mediated hymenoptera sensitivity by venom-  
induced histamine release.  
*J Allergy Clin Immunol* 53 (1974) 170-184
145. Solley, G.O., Vanderwoude, C., Knight, G.K.  
Anaphylaxis due to red imported fire ant sting.  
*Med J Aust* 176 (2002) 521-523
146. Straumann, F., Bucher, C., Wüthrich, B.  
Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with  
both venoms?  
*Int Arch Allergy Immunol* 123 (2000) 268-274
147. Sturm, G.J., Böhm, E., Trummer, M., Weiglhofer, I., Heinemann, A., Aberer, W.  
The basophil activation test in Hymenoptera venom Allergy: a prospective study.  
*Allergy* 59 (2004) 1110-1117
148. Sudheer, P.S., Hall, J.E., Read, G.F., Rowbottom, A.W., Williams, P.E.  
Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c.  
*Anaesthesia* 60 (2005) 251-256
149. Van der Linden, P.W.G., Hack, C.E., Stuyvenberg, A., van der Zwan, J.K.  
Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current  
criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of  
anaphylaxis.  
*J Allergy Clin Immunol* 94 (1994) 151-159
150. Valent, P., Bettelheim, P.  
The human basophil.  
*Crit Rev Oncol Hematol* 10 (1990) 327-352

151. Valent, P., Hauswirth, A.W., Natter, S., Sperr, W.R., Bühring, H.J., Valenta, R.  
Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens.  
Methods 32 (2004) 265-270
152. Vetter, R.S., Visscher, P.K.  
Bites and stings of medically important venomous arthropods.  
Int J Dermatol 37 (1998) 481-496
153. Vischer, U.M., Wagner, D.D.  
CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells.  
Blood 82 (1993) 1184-1191
154. Wide, L., Bennich, H., Johansson, S.G.O.  
Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies.  
Lancet ii (1967) 1105-1107
155. Yamaguchi, M., Hirai, K., Ohta, K., Suzuki, K., Kitani, S., Takaishi, T.  
Nonreleasing basophils convert to releasing basophils by culturing with IL-3.  
J Allergy Clin Immunol 97 (1996) 1279-1287
156. Yano, Y., Hayashi, Y., Sano, K., Nagano, H., Nakaji, M., Seo, Y., Ninomiya, T., Yoon, S.,  
Yokozaki, H., Kasuga, M.  
Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-  
NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-Ibeta/B10/gp130(RB13-6)) in inflammatory and  
neoplastic bile duct diseases.  
Cancer Lett 207 (2004) 139-147
157. Zweig, M.H., Campell, G.  
Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical  
medicine.  
Clinical Chemistry 39 (1993) 561-577

# Anhang

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Pathogenese der allergischen Soforttyp-Reaktion
- Abbildung 2: Systematische Darstellung verschiedener Hymenopteren
- Abbildung 3: Expression von CD63 und CD203c
- Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.
- Abbildung 5: Bestimmung der prozentualen Basophilenaktivierung im CD63-BAT
- Abbildung 6: Bestimmung der prozentualen Basophilenaktivierung im CD203c-BAT
- Abbildung 7: ROC-Analyse des CD63- und CD203c-BAT für Insektengift der Konzentration 1 µg/ml.
- Abbildung 8: Ergebnisse der Hauttestung und spezifischen IgE-Bestimmung
- Abbildung 9: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Patienten mit Bienengiftallergie als Mittelwerte und deren Standardabweichungen
- Abbildung 10: Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT bei Patienten mit Bienengiftallergie
- Abbildung 11: Messergebnisse eines Bienengiftallergikers
- Abbildung 12: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Patienten mit Wespengiftallergie als Mittelwerte und deren Standardabweichungen.
- Abbildung 13: Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT bei Patienten mit Wespengiftallergie
- Abbildung 14: Messergebnisse eines Wespengiftallergikers
- Abbildung 15: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie als Mittelwerte und deren Standardabweichungen
- Abbildung 16: Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT bei Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie
- Abbildung 17: Messergebnisse eines Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie.
- Abbildung 18: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT als Mittelwerte und deren Standardabweichungen des Patientenkollektivs
- Abbildung 19: Box-Plot-Diagramm der Ergebnisse im BAT des Patientenkollektivs
- Abbildung 20: Korrelationen der prozentualen Basophilenaktivierung zwischen dem CD63- und dem CD203c-BAT
- Abbildung 21: Darstellung der prozentualen Basophilenaktivierung im BAT der Kontrollpersonen als Mittelwerte und deren Standardabweichungen
- Abbildung 22: Messergebnisse einer Kontrollperson

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zusammensetzung von Bienen- und Wespengift
- Tabelle 2: Rekombinante Insektengiftallergene
- Tabelle 3: Notfallmaßnahmen zur Behandlung anaphylaktischer Reaktionen nach
- Tabelle 4: Schweregradeinteilung der anaphylaktischen Reaktion
- Tabelle 5: Spezifische IgE-Klasseneinteilung gemäß CAP-FEIA-System
- Tabelle 6: Spezifische IgE-Klasseneinteilung gemäß Immulite 2000-Allergie
- Tabelle 7: Inhalte der 8 Probenansätze des CD63- und CD203c-Protokolls
- Tabelle 8: Fluoreszenzeigenschaften der im Test verwendeten Fluorochrome
- Tabelle 9: Einteilung der allergischen Symptome der Patienten in Schweregrade
- Tabelle 10: Einteilung der Patienten in insektengiftspezifische IgE-Klassen
- Tabelle 11: Prozentuale Basophilenaktivierung der BAT-Ansätze bei positiver Stichanamnese und negativen Ergebnissen in Hauttest und IgE-Bestimmung
- Tabelle 12: Korrelation der Ergebnisse des CD63- und CD203c-BAT der acht Probenansätze des gesamten Patientenkollektivs.
- Tabelle 13: Korrelation der Ergebnisse des CD63- und CD203c-BAT bei Patienten mit Insektengiftallergie.
- Tabelle 14: Vergleich der BAT-Ergebnisse mit den Ergebnissen aus Hauttest und spezifischer IgE-Bestimmung bei Testung gegen Bienen- und Wespengift
- Tabelle 15: Übereinstimmung von Hauttestung, spezifischer IgE-Bestimmung und der BAT-Ansätze hinsichtlich der Ergebnisse bei Testung gegen Bienengift, Wespengift und beide Insektengifte
- Tabelle 16: Positive Ergebnisse im BAT auf das jeweilige Insektengift bei Patienten mit Insektengiftallergie.
- Tabelle 17: Positive Reaktionen im jeweiligen Test gegen Bienen- und Wespengift bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion nach einem Insektenstich.
- Tabelle 18: Einteilung von 42 Patienten mit allergischen Symptomen nach Insektenstichen hinsichtlich der Dauer einer Spezifischen Immuntherapie (SIT)
- Tabelle 19: Ergebnisse der prozentualen Basophilenaktivierung im CD63- und CD203c-BAT von Kontrollpersonen.
- Tabelle 20: Die Aktivierungsmarker CD63 und CD203c: Gemeinsamkeiten und Unterschiede
- Tabelle 21: Der BAT bei Insektengiftallergie: Studieneinzelheiten und Versuchsbedingungen
- Tabelle 22: Der BAT in der Allergiediagnostik

## Patientendaten

Patient	W= weiblich M= männlich	Alter in Jahren	Anamnese* Anzahl Stiche, Insekt, Reaktion [127]	Hauttest + positiv - negativ	Spezifische IgE-Klasse * CAP-FEIA * Immulite	SIT gegen	Basophilenaktivierungstests															
							CD63-BAT (positiv > 15%)						CD203c-BAT (positiv > 14%)									
							Negativ- kontrolle		Positiv- kontrolle		Bienengift 1 µg/ml		Bienengift 0,1 µg/ml		Bienengift 0,01 µg/ml		Wespengift 1 µg/ml		Wespengift 0,1 µg/ml		Wespengift 0,01 µg/ml	
1	M	50	> 1 x B, III	B + W -	B3 W0 °	B	6,4	2,2	63,7	45,0	88,9	62,6	87,5	51,2	19,2	31,9	9,9	24,7	2,2	6,1	4,3	2,9
2	W	32	>1 x B, III	B + W -	B2 W0 °	B	3,2	1,9	39,3	35,1	48,7	52,5	5,8	15,8	2,9	9,8	1,9	4,4	2,8	4,5	3,9	6,7
3	M	49	>1 x B, IV	B + W -	B2 W0 °	B	9,4	5,4	66,7	69,0	86,8	70,5	34,7	55,6	9,9	63,6	69,9	19,5	31,2	54,4	10,9	19,2
4	M	60	3 x B, II 1 x W, 0	B + W -	B3 W0 *	B	3,9	4,3	17,4	25,7	79,6	82,5	84,0	91,7	36,9	58,0	23,5	15,3	4,3	9,6	5,0	8,4
5	W	69	1 x B, II 1 x W, 0	B + W +	B3 W2 °	B	4,1	1,9	21,9	41,0	67,7	79,0	43,7	82,7	3,9	28,5	49,9	62,3	3,9	40,7	3,2	6,3
6	W	21	>1 x B, II	B + W -	B2 W0 °	B	0,2	4,3	46,6	59,9	1,6	14,2	0,4	5,4	0,8	3,7	0,8	6,3	0,8	4,7	1,0	2,6
7	M	29	>1 x B, I	B + W -	B6 W0 °	B	8,6	4,5	32,0	43,3	40,8	57,9	39,1	51,0	10,5	31,0	9,0	9,1	8,9	6,1	9,5	5,9
8	M	20	1 x B, II	B + W -	B3 W0 °	B	3,2	1,9	50,0	51,7	75,4	68,4	53,5	55,5	4,0	8,6	2,5	8,9	2,6	3,6	3,2	3,8
9	W	34	>1 x W, II	B - W +	B0 W3 °	W	2,6	4,7	49,3	50,2	1,4	5,8	0,4	3,6	0,8	1,8	90,4	70,4	33,7	60,0	2,5	12,3
10	W	55	>1 x B, 0 >1 x W, II	B - W +	B0 W2 °	W	6,8	3,6	23,8	30,1	9,1	4,5	4,9	1,5	6,4	4,6	55,0	67,1	43,9	62,0	12,0	15,7
11	M	26	1 x B, 0 >1 x W, I	B - W +	B0 W3 *	W	2,0	2,5	34,6	62,5	2,4	5,8	1,8	3,1	1,4	5,0	64,3	77,0	64,0	75,5	13,8	50,5
12	M	65	1 x B, 0 1 x W, II	B - W +	B0 W2 *	W	3,1	3,9	18,6	20,0	14,6	24,0	4,6	8,5	5,0	7,9	89,3	77,4	85,2	66,8	34,7	66,7
13	M	75	2 x W, IV	B - W +	B0 W3 °	W	2,5	3,0	10,1	44,2	2,8	5,6	2,3	3,7	2,6	9,8	75,1	68,4	66,3	54,9	4,3	4,5
14	W	23	1 x B, 0 1 x W, I	B - W +	B1 W3 °	W	1,0	9,9	53,7	64,0	52,7	71,1	2,1	17,5	2,7	7,7	93,8	84,8	92,5	89,8	53,2	25,8
15	W	20	1 x W, II	B - W +	B0 W3 °	W	8,9	2,8	23,4	33,2	5,9	8,2	4,3	5,6	5,9	5,0	89,2	75,3	92,0	88,1	51,0	66,3
16	W	28	2 x W, II	B - W +	B0 W2 °	W	2,3	2,5	32,2	32,6	8,3	8,0	3,9	2,7	3,6	3,3	69,3	68,2	70,8	62,3	11,4	22,8
17	M	42	>1 x W, I	B - W +	B2 W5 °	W	2,3	2,1	37,2	43,8	2,9	6,8	0,9	2,5	1,8	2,6	66,9	85,7	33,0	56,8	3,3	12,7
18	M	58	1 x W, III 1 x unkl., 0	B + W +	B2 W6 °	W	5,3	6,6	31,5	31,8	52,5	48,8	5,0	23,7	7,1	6,7	67,2	60,0	68,0	43,7	55,8	32,9
19	W	47	1 x W, II	B + W +	B6 W5 °	W	2,6	3,8	3,7	9,1	45,0	76,4	23,4	67,7	2,8	28,1	7,9	60,3	1,3	36,3	2,7	4,9
20	M	29	3 x W, III	B - W +	B0 W2 °	W	1,1	3,6	38,8	57,8	2,8	5,9	1,4	4,4	1,7	4,2	78,1	86,3	63,3	77,8	11,3	36,4
21	W	48	3 x W, II	B - W +	B0 W3 °	W	3,8	3,6	11,1	12,0	3,0	9,3	3,0	5,2	3,1	4,2	79,1	72,0	53,3	48,0	8,0	22,3
22	W	24	> 1 x W, III	B + W +	B1 W3 *	W	2,5	4,0	60,0	54,8	37,8	25,3	2,3	0,9	2,7	1,8	42,9	47,6	4,5	10,2	1,6	2,3
23	M	66	1 x B, 0 1 x W, I	B - W +	B2 W1 °	W	5,4	3,3	77,2	32,2	81,5	39,0	74,2	48,2	6,6	10,2	52,6	53,7	43,3	78,7	59,1	34,2
24	W	61	>1 x W, II	B - W +	B0 W4 *	W	2,3	3,4	38,7	15,8	3,7	8,4	2,4	9,3	1,3	3,9	40,1	71,2	41,5	81,7	8,4	64,8
25	W	64	2 x W, III	B - W +	B0 W2 °	W	2,9	4,8	26,8	24,4	2,2	8,4	2,7	8,2	2,5	3,7	54,1	40,9	42,6	49,4	3,1	20,3
26	W	41	1 x W, II	B - W +	B0 W4 °	W	4,6	6,3	25,0	19,8	3,1	6,1	1,8	5,9	2,1	4,3	81,0	35,7	83,5	66,8	31,1	40,0
27	W	77	>1 x W, I 1 x unkl., 0	B - W +	B0 W5 °	W	1,0	3,8	39,0	50,0	0,7	2,6	0,4	1,8	0,6	1,4	86,7	75,3	23,5	62,6	2,5	10,0
28	W	29	> 1 x W, II	B - W +	B1 W3 *	W	8,7	9,3	34,3	49,0	27,5	26,6	14,0	12,7	12,6	11,0	60,0	44,1	35,1	38,0	16,1	16,4
29	W	51	1 x W, III	B + W +	B2 W6 °	W	2,9	5,1	42,5	54,1	55,2	40,8	17,2	26,1	34,7	4,7	56,6	48,8	70,0	44,4	1,2	42,4
30	W	35	1 x W, I	B - W +	B0 W3 °	W	3,8	5,6	31,2	32,1	4,1	5,9	5,9	7,2	4,5	6,5	46,7	46,3	43,2	40,6	6,4	6,6
31	W	54	1 x W, II	B - W +	B0 W3 *	W	4,3	5,8	19,5	17,0	4,4	20,4	3,0	8,3	3,6	6,9	98,6	83,2	96,4	76,7	92,1	39,7
32	W	56	2 x W, II	B - W +	B0 W3 °	W	9,8	8,7	41,2	42,3	13,9	12,1	10,9	8,4	7,8	7,6	74,2	63,9	47,9	60,1	17,2	18,7
33	M	44	>1 x B, I >1 x W, I	B + W +	B3 W3 °	B/W	3,2	6,1	23,0	27,4	56,7	78,1	21,8	69,1	3,1	6,0	66,1	81,8	48,5	78,0	7,4	37,9
34	M	55	1 x B, IV >1 x W, IV	B + W +	B2 W2 °	B/W	7,4	3,0	34,0	66,8	8,9	12,8	7,3	8,0	6,0	6,7	29,7	38,9	6,3	10,7	7,0	4,6
35	M	45	1 x B, II 1 x W, II	B + W +	B2 W2 °	B/W	7,8	1,8	38,5	43,6	68,1	40,0	71,9	63,0	41,4	47,1	73,6	71,0	61,1	57,0	7,7	17,3
36	M	72	1 x unkl., III >1 x W, 0	B - W +	B1 W5 *	W	1,0	5,2	17,3	42,5	2,2	7,0	1,0	3,8	0,6	4,7	35,2	78,3	33,1	75,0	17,1	58,6
37	W	9	1 x unkl., II	B - W +	B1 W2 °	W	3,4	8,2	30,4	38,4	4,2	9,0	6,0	8,1	3,5	7,0	48,7	41,0	31,0	24,5	7,3	17,1
38	M	46	1 x unkl., II >1 x unkl., 0	B + W +	B3 W3 °	B/W	0,6	4,4	28,1	41,5	25,9	47,9	7,3	3,3	0,9	6,3	40,2	70,3	7,3	3,2	1,9	15,0
39	W	36	1 x unkl., II	B - W -	B0 W0 °	-	6,7	3,4	21,8	37,7	5,0	7,9	6,3	7,3	7,4	4,3	3,4	7,2	5,3	5,7	8,6	4,2
40	M	50	2 x unkl., III	B - W +	B0 W2 *	W	0,4	4,1	46,6	73,0	1,7	9,2	1,0	8,1	0,6	6,9	70,7	73,2	54,0	72,4	5,8	48,9
41	M	21	1 x unkl., II 1 x unkl., 0	B + W -	B5 W1 °	B	8,3	5,5	62,8	77,8	49,8	53,3	42,0	60,0	13,0	19,5	6,7	21,3	9,2	16,0	10,0	9,6
42	W	45	2 x unkl., II	B - W -	B0 W0 °	-	1,6	1,9	58,2	68,7	4,2	3,4	1,3	2,2	1,3	2,1	4,6	24,7	1,9	9,8	1,4	1,8

• letzte Stichreaktion kursiv gedruckt B= Biene bzw. Bienengift W= Wespe bzw. Wespengift

## Kontrollpersonen

Kontrollen W= weiblich M= männlich	Alter in Jahren	Spezifische IgE-Klasse nach ° CAP-FEIA * Immulite 2000	Basophilenaktivierungstests																
			CD63-BAT (positiv > 15%)						CD203c-BAT (positiv > 14%)										
			Negativ- kontrolle		Positiv- kontrolle		Bienengift 1 µg/ml		Bienengift 0,1 µg/ml		Bienengift 0,01 µg/ml		Wespengift 1 µg/ml		Wespengift 0,1 µg/ml		Wespengift 0,01 µg/ml		
1	M	22	B 0 W 0 °	1,8	5,0	50,8	30,8	1,8	3,6	3,9	5,5	3,5	5,8	1,0	4,2	2,2	3,6	1,9	5,7
2	W	47	B 0 W 0 °	2,7	4,0	18,6	26,9	9,3	4,3	3,8	3,7	3,0	6,7	2,9	8,2	2,4	7,4	2,0	4,3
3	W	41	B 0 W 0 *	0,3	2,3	25,2	15,6	0,3	2,2	0,2	2,2	0,3	2,1	0,7	4,3	0,7	2,2	0,6	1,9
4	W	24	B 0 W 0 °	7,8	2,8	68,1	52,0	8,2	5,5	8,7	3,5	7,2	2,8	7,0	8,3	7,9	5,5	9,7	2,9
5	M	51	B 0 W 0 °	1,7	5,9	61,4	79,4	2,3	5,7	2,1	7,1	2,3	4,4	2,1	9,9	3,2	7,6	2,5	5,2
6	M	29	B 0 W 0 °	2,9	1,4	17,2	65,1	3,7	1,4	3,2	2,7	2,3	1,6	2,4	2,6	3,2	2,0	2,2	2,8
7	M	43	B 0 W 0 °	2,6	1,9	33,0	56,8	1,6	7,1	2,5	3,5	1,3	2,2	2,5	43,3	1,2	4,2	1,5	1,5
8	W	46	B 0 W 0 *	5,9	4,8	40,0	55,6	5,6	6,0	5,2	3,4	5,8	3,7	4,7	6,2	6,8	4,8	6,0	4,7
9	M	28	B 0 W 0 *	5,6	5,3	22,9	52,4	1,8	6,9	1,9	5,7	1,8	3,4	2,6	4,9	2,4	4,4	3,3	6,2
10	W	33	B 0 W 0 °	4,6	3,6	66,1	75,9	3,6	7,2	3,6	3,6	3,6	3,7	3,6	8,8	2,8	3,8	4,0	3,6
11	W	28	B 0 W 0 °	8,6	5,6	36,2	52,2	9,5	7,2	7,3	5,5	8,8	4,5	9,9	5,6	8,5	5,2	7,5	4,1
12	M	27	B 0 W 0 *	9,2	2,8	44,0	31,7	12,9	5,6	12,8	4,1	11,1	4,7	10,8	6,1	13,6	7,0	8,3	2,7
13	M	28	B 0 W 0 °	1,1	2,5	44,1	73,4	1,3	7,4	9,5	4,0	1,2	2,5	1,6	2,8	1,2	2,1	1,2	3,9
14	W	25	B 0 W 0 °	4,3	3,8	53,7	51,5	11,4	8,4	5,8	4,7	5,2	5,4	4,8	5,8	4,1	6,0	4,7	6,6
15	W	26	B 0 W 0 °	8,2	5,7	27,6	16,5	6,4	5,3	5,7	5,8	7,3	2,7	5,4	3,3	8,0	4,5	8,6	4,8
16	M	23	B 0 W 0 *	1,8	3,6	48,2	45,8	4,0	3,3	2,9	2,5	2,3	4,1	8,2	36,5	3,0	8,2	3,5	6,4
17	W	25	B 0 W 0 °	5,0	9,5	73,0	60,7	5,1	8,3	4,6	7,0	7,0	7,8	3,8	11,2	6,0	7,0	5,9	7,3
18	W	61	B 0 W 0 *	0,2	7,7	26,0	15,7	10,3	7,8	7,3	6,2	10,2	4,3	8,9	9,5	9,9	6,8	9,7	5,1
19	M	47	B 1 W 0 °	2,7	1,5	39,8	48,0	2,4	4,5	2,9	3,2	2,4	2,0	2,6	3,3	2,5	2,8	1,7	2,0
20	W	32	B 0 W 2 °	10,6	3,7	52,0	41,9	7,6	6,9	7,4	4,7	7,9	3,0	25,2	13,3	19,9	18,9	7,2	4,0
21	W	66	B 0 W 2 *	5,5	4,6	68,3	58,6	6,3	9,3	4,2	6,9	5,0	5,7	97,4	82,9	97,6	82,6	75,0	80,1
22	M	37	B 1 W 0 °	1,5	1,3	1,4	53,8	9,0	21,8	1,0	1,2	1,7	1,5	1,2	1,3	1,7	1,6	1,3	1,0
23	M	29	B 0 W 2 °	0,4	4,7	42,5	42,9	0,7	4,2	1,0	3,5	0,4	3,9	1,0	3,7	0,6	4,0	0,8	3,3
24	M	55	B 0 W 3 °	2,3	2,8	32,2	50,7	4,2	9,9	3,6	1,7	2,8	2,1	7,3	38,6	4,5	14,0	2,6	2,2
25	W	26	B 1 W 1 *	0,5	4,3	69,0	85,7	1,1	1,9	0,6	3,8	0,9	3,9	3,1	7,1	0,4	6,0	1,1	3,6

B= Biene bzw. Bienengift W= Wespe bzw. Wespengift



---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, für die Möglichkeit an seiner Klinik zu promovieren bedanken.

Mein aufrichtiger Dank gilt besonders Frau Prof. Dr. Bernadette Eberlein für die Vergabe des Dissertationsthemas, die konstruktive Anleitung sowie die stets schnelle und detaillierte Korrektur und Begutachtung sämtlicher Fassungen meiner Dissertation. Äußerst wertvoll waren ihre praktischen Ratschläge, Anregungen und Hilfestellungen über den gesamten Zeitraum der wissenschaftlichen Betreuung.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Martin Mempel für die geduldige Einführung in die FACS-Analyse und wichtigen Hinweise bei der Datenauswertung.

Die Arbeit in den dermatologischen Laboren sowie der Allergieambulanz wurde durch das hilfsbereite und freundliche Klima zu einer wertvollen Erfahrung. Ich möchte an dieser Stelle allen Mitarbeitern danken, insbesondere Frau Herta Sezer und Frau Franziska Martin und natürlich den Patienten und Kontrollpersonen für ihre bereitwilligen Blutspenden.

In größter und herzlichster Dankbarkeit fühle ich mich meinen Eltern verbunden, die jederzeit hinter mir standen und mir meine Ausbildung ermöglichten. Ihre Geduld und ihr Vertrauen sowie die kostbare, unermüdliche und vor allem vielfältige Unterstützung meiner Geschwister und Freunde haben wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Ihnen gebührt mein besonderer Dank.