

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**Charakterisierung der serologischen Immunreaktivität von Insektengiftallergikern mit
rekombinanten Allergenen**

Anna Duswald

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Markus Ollert
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 20.07.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 13.10.2021 angenommen.

1. Einleitung	7
1.1. Epidemiologie der Insektengiftallergie	7
1.2. Häufigste auslösende Insekten und ihre Charakteristika	8
1.2.1. Einteilung der Hymenopteren	8
1.2.2. Die häufigsten Hymenopteren-Arten in Europa, ihre Population und ihr Verhalten	9
1.2.3. Stichmechanismen und -eigenschaften	10
1.3. Klinik der Insektengiftallergie und Therapieoptionen	10
1.3.1. Reaktionsgrade und Kofaktoren	10
1.3.2. Spezifische Immuntherapie	11
1.4. Zusammensetzung des Insektengifts	13
1.4.1. Allgemeines zur Zusammensetzung von Insektengiften	13
1.4.2. Allergene im Bienengift (Honigbiene, <i>Apis mellifera</i>)	13
1.4.3. Allergene im Wespengift (gemeine Wespe, <i>Vespula vulgaris</i>)	14
1.4.4. Homologe Proteine	15
1.5. Rekombinante Allergene des Bienen- und Wespengiftes	16
1.5.1. Komponentendiagnostik	16
1.5.2. Kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten (cross-reactive carbohydrate determinants)	17
1.5.3. Herstellung rekombinanter Allergene	19
1.5.4. Für die Diagnostik verfügbare rekombinante Allergene	20
1.6. Klinische und serologische Diagnostik einer Insektengiftallergie	20
1.6.1. Zeitpunkt der Diagnostik	20
1.6.2. Hauttestungen	20
1.6.3. Bestimmung spezifischer Serum-IgE-Antikörper	21
1.6.3.1. Übersicht über die Testverfahren zur Bestimmung von spezifischem IgE	21
1.6.3.2. Testung mit Bienen- und Wespengiftextrakt	22
1.6.3.3. Ergänzende Komponentendiagnostik	22
1.6.3.3.1. Unterscheidung zwischen echter Doppeltsensibilisierung und Kreuzreaktion	22
1.6.3.3.2. Verwendung CCD-freier rekombinanter Allergene bei der in vitro-Testung	23

1.6.3.3.3. Erhöhte Sensitivität durch die Komponentendiagnostik	24
1.6.3.3.4. Ergänzende Untersuchungen zum Screening auf Antikörper gegen CCDs	25
1.6.4. Basophilenaktivierungstest (BAT)	26
2. Fragestellungen und Ziele der Arbeit	28
3. Material und Methoden	30
3.1. Daten	30
3.2. Aufbereitung der Daten und statistische Analyse	32
4. Ergebnisse	34
4.1. Vergleich der sIgE-Reaktivitäten von Hymenoptereingiftallergikern	34
4.1.1. Übersicht über die sIgE-Reaktivitäten	34
4.1.2. Gegenüberstellung von Bienengiftallergikern und Doppelpositiven	37
4.1.3. Gegenüberstellung von Wespengiftallergikern und Doppelpositiven	39
4.2. Vergleich von einfach- und doppelpositiven Patienten in Bezug auf die Klasseneinteilung mittels verschiedener Testverfahren	40
4.2.1. IgE-Klassenverteilung von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Bienengift (Honey Bee Venom)	40
4.2.2. IgE-Klassenverteilung von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Wespengift (Yellow Jacket Venom)	41
4.2.3. Vergleich der Intrakutantest-Ergebnisse von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Bienengift (Honey Bee Venom)	42
4.2.4. Vergleich der Intrakutantest-Ergebnisse von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Wespengift (Yellow Jacket Venom)	43
4.3. Auswertung der doppelpositiven Testergebnisse	44
4.3.1. Allgemeines	44
4.3.2. Häufigkeit von echten Doppeltsensibilisierungen und Kreuzreaktionen ..	44
4.4. Genauigkeit der Allergietestung mit rekombinanten Allergenen	46
4.4.1. Vergleich der Reaktionsstärken	47
4.4.2. Anteil der von rekombinanten Allergenen erfassten Allergikern	50
4.5. Untersuchung des Einflusses von kreuzreaktiven Kohlenhydratseitenketten (cross-reactive carbohydrate determinants, CCDs) auf das Testergebnis	55
4.5.1. Vergleich der IgE-Reaktivitäten von verschieden gewonnenen Allergenen	55

4.5.2.	Vergleich der IgE-Reaktivitäten von verschiedenen gewonnenen Allergenen unter Berücksichtigung der CCD-Reaktivität	60
4.5.3.	Korrelation der Höhe des CCD-spezifischen IgEs (MUXF3) mit dem wirklichen CCD-Einfluss bei Testung mit rekombinanten Allergenen	67
4.5.3.1.	Auswertung der CCD-Reaktivität von 96 Patienten mittels rApi m 1 (Sf9), rApi m 1 (Tni) und MUXF3	67
4.5.3.2.	Auswertung der CCD-Reaktivität von 98 Patienten mittels rApi m 1 (Sf9), rApi m 1 (Tni) und MUXF3)	73
4.6.	Vergleich von ImmunoCAP- und Immulite-System bezüglich ihrer Sensitivität	78
5.	Diskussion	81
5.1.	Ursachen von doppeltpositiven Testergebnissen in der serologischen Diagnostik	83
5.2.	Diagnostische Lücke bei Testung mit rekombinanten Allergenen	87
5.3.	Einfluss der kreuzreaktiven Kohlenhydratseitenketten (CCDs) auf die Interpretation von Testergebnissen	89
5.3.1.	Unterschiede zwischen CCD-negativen Patienten und Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE bei der Testung mit natürlichen und rekombinanten Allergenen	92
5.3.2.	Zusammenhang von Höhe der CCD-spezifischen IgE-Antikörper und Stärke der CCD-spezifischen IgE-Reaktivität beim einzelnen Patienten .	94
5.4.	Vergleichbarkeit verschiedener Testsysteme in der komponentenbasierten Allergiediagnostik	96
5.5.	Übersicht über Ergebnisse und Limitationen der Arbeit	98
6.	Zusammenfassung	101
7.	Literaturverzeichnis	104
8.	Danksagung	114

Abb.	Abbildung
BAT	Basophilenaktivierungstest
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten / „cross-reactive carbohydrate determinants“
CRD	Komponentendiagnostik / „component-resolved diagnosis“
cm	Zentimeter
E. coli	Escherichia coli
engl.	Englisch
et al.	et alii / und andere
evtl.	eventuell
HBV	Bienengift / „honey bee venom“
I.C.	Intrakutan
IgE	Immunglobulin E
insg.	insgesamt
kU/L	Kilounits pro Liter
min.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRJP	major royal jelly protein
o.g.	oben genannt
RAST	Radioallergosorbent-Test
Sf9	Spodoptera frugiperda

sIgE spezifisches Immunglobulin E
SIT spezifische Immuntherapie
sog. sogenannt
Tni Trichoplusia ni
u.a. unter anderem
v.a. vor allem
vgl. vergleiche
WHO world health organisation
YJV Wespengift / „yellow jacket venom“
z.B. zum Beispiel
z.T. zum Teil
 μg Mikrogramm

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie der Insektengiftallergie

Insektengifte sind neben Nahrungsmitteln und Medikamenten die häufigsten Auslöser von anaphylaktischen Reaktionen (Müller 2010), wobei der prozentuale Anteil an insektengiftbedingten Reaktionen in den Sommermonaten deutlich zunimmt (Schäfer 2009). Laut einer Veröffentlichung von Worm et al. stellen Insektenstiche sogar mit ca. 50% den häufigsten Auslöser von schweren Anaphylaxien dar (Worm et al. 2012). Diese Reaktionen werden zu 70,4% von Wespen, zu 19,9% von Bienen, zu 4,5% von Hornissen und zu 0,2% von Hummeln ausgelöst (Worm et al. 2014). Die Insektengiftallergie ist eine klassische IgE-vermittelte allergische Erkrankung, die durch die Kreuzvernetzung von an der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten rezeptorgebundenen IgE-Antikörpern ausgelöst wird (Ollert et al. 2015).

Die Häufigkeit von gesteigerten Lokalreaktionen in der Bevölkerung wird mit bis zu 26,4% angegeben, wobei Imker deutlich häufiger betroffen sind (bis zu 38%). Ähnlich verhält es sich auch mit den systemischen Reaktionen, hier liegt die Prävalenz bei den Imkern zwischen 14% und 43%, während sie in der Allgemeinbevölkerung lediglich auf bis zu 3,3% geschätzt wird (Bilo et al. 2005, Schäfer 2009). Aktuellste Daten zeigen, dass in Deutschland ca. 2,3-2,6% der Bevölkerung bereits eine oder mehrere systemische Reaktionen nach Insektenstichen hatte, wobei die erstmalige Reaktion vor allem zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr auftrat (Blank et al. 2019). Ebenso sind Landwirte, Förster, Gärtner, Bauarbeiter und Lastwagenfahrer deutlich häufiger von einer Insektengiftallergie als die Allgemeinbevölkerung betroffen, da auch hier aus beruflichen Gründen eine deutlich höhere Exposition gegenüber entsprechenden Insekten vorliegt (Siracusa et al. 2015). Insgesamt werden in Deutschland pro Jahr ca. 20 Todesfälle durch Kontakt mit Bienen, Wespen und Hornissen durch das Statistische Bundesamt erfasst (Schäfer 2009), die Anzahl der jährlichen Todesfälle durch Insektengift in Europa wird auf ca. 200 geschätzt (Müller 2010). Die tatsächlichen Zahlen dürften jedoch höher liegen, da anaphylaktische Reaktionen oft nicht erkannt werden.

Deutlich höher als die tatsächlich auftretenden Anaphylaxien ist jedoch das Vorkommen von Soforttypsensibilisierungen gegenüber Bienen- und Wespengift. Diese finden sich bei bis zu 41,6% der gesamten Bevölkerung (Blank et al. 2019), bei Kindern liegen die Raten sogar bei

fast 50% (Schäfer 2009). Sensibilisierungen gegen Wespengift kommen dabei mit 31,7% häufiger vor als gegen Bienengift (23,1%), wobei bei ca. 13% der Bevölkerung im Sinne einer Doppelsensibilisierung sIgE-Antikörper gegen beide Insektengifte nachweisbar sind (Blank et al. 2019). Patienten mit einer solchen vorhandenen Sensibilisierung gegen Insektengift, die jedoch keine entsprechende Anamnese aufweisen, scheinen zwar ein im Vergleich zu Patienten ohne vorhandene Sensibilisierung deutlich erhöhtes Risiko für ausgeprägte Lokalreaktionen nach Stichereignissen zu haben, jedoch nicht für systemische Reaktionen (Sturm et al. 2014).

1.2. Häufigste auslösende Insekten und ihre Charakteristika

1.2.1. Einteilung der Hymenopteren

Die Gifte, die in Europa hauptsächlich anaphylaktische Reaktionen auslösen, stammen nahezu ausschließlich von Hymenopteren (Hautflüglern), die für über 99% der durch Insektenstiche ausgelösten Anaphylaxien verantwortlich sind (Müller 2010). Wichtig ist hier vor allem eine Unterform der Hymenopteren, die sogenannten Aculeatae (Stechimmen), die wiederum in verschiedene Familien eingeteilt werden können.

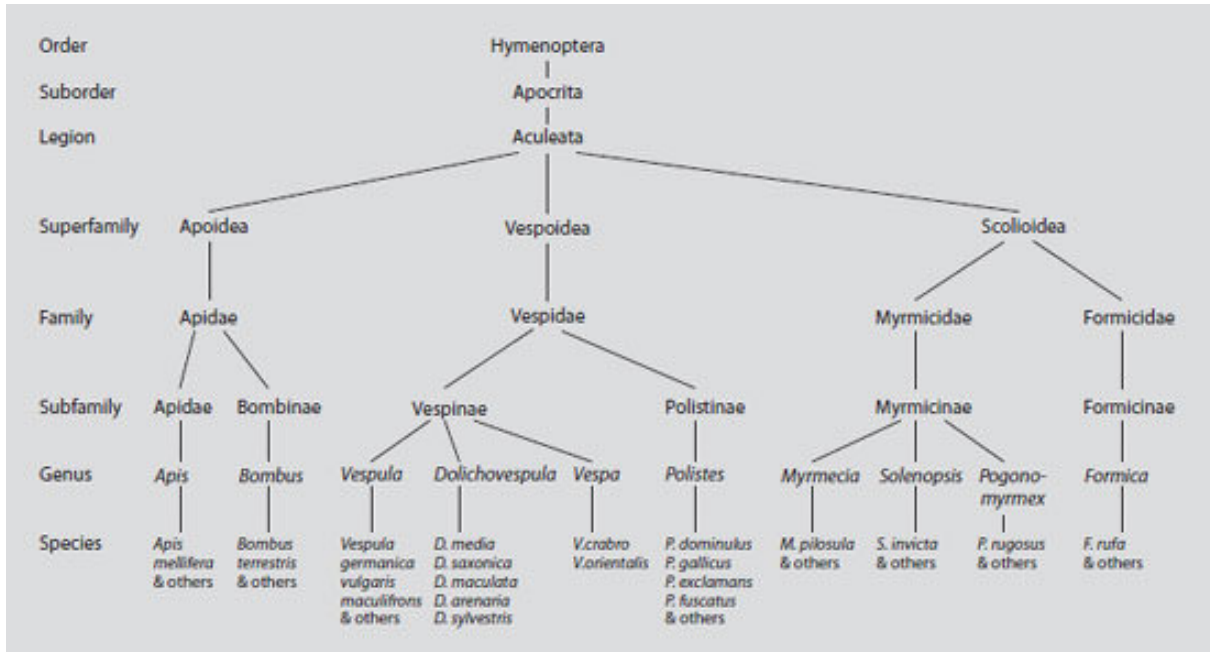
Zu diesen Familien gehören unter anderem die Apidae (echte Bienen), deren bekannteste Vertreter die Honigbiene (*Apis mellifera*) mit ihrer braunen Farbe und mäßigen Behaarung und die Hummel (*Bombus*) sind. Letztere ist deutlich größer, stärker behaart und hat neben der braunen Farbe charakteristische kräftig ausgeprägte gelbe oder weißliche Streifen (Bilo et al. 2005).

Eine weitere dieser Familien sind die Vespidae (Faltenwespen), die wiederum in Vespinae (echte Wespen) und Polistinae (Feldwespen) unterteilt werden (Müller 2010). Zu den Vespinae gehören die Gattungen der Vespulae (Wespen), der Vespae (Hornissen) und der Dolichovespulae (Langkopfwespen) (Bilo et al. 2005).

Weitere wichtige Anaphylaxieauslöser, z.B. in Amerika oder Australien, sind die Mitglieder der Familie der Formicidae (Ameisen). So sind z.B. in den südlichen Teilen Nordamerikas häufig Feuerameisen (*Solenopsis invicta*) für allergische Insektenstichreaktionen verantwortlich (Caplan et al. 2003), während in Australien vor allem die *Myrmecia pilosula*-

Spezies für anaphylaktische Reaktionen nach Ameisenstichen verantwortlich ist (Wiese et al. 2007).

Abbildung 1: Taxonomie der Hymenoptera (Müller 2010)



1.2.2. Die häufigsten Hymenopteren-Arten in Europa, ihre Population und ihr Verhalten

Mögliche Auslöser von Hymenoptereingiftallergien sind in Mitteleuropa vor allem sogenannte eusoziale Bienen- und Faltenwespenarten, die Kolonien bilden, die aus einigen fertilen Weibchen (Königinnen) und ihren sterilen weiblichen Nachkommen (Arbeiterinnen) bestehen. Von besonderer Bedeutung sind bestimmte Faltenwespen, die Honigbiene sowie teils auch einige Hummelarten, deren Arbeiterinnen aufgrund ihrer Körpergröße und des Baus ihres Stachels die menschliche Haut durchdringen können. Das hohe Gefahrenpotential resultiert aus hohen Populationsdichten in der Nähe des Menschen und einem Feindabwehrverhalten in der Nähe der Nester (Mauss 2008). In Deutschland sind die auslösenden Insekten von Anaphylaxien vor allem die Honigbiene (*Apis mellifera*) und verschiedene Wespenarten (v.a. *Vespula vulgaris* und *Vespula germanica*) (Schäfer 2009).

Da die Honigbienen als gesamtes Volk überwintern, sind sie während ihrer gesamten Flugzeit von Ende Februar bis Anfang Oktober mit ca. der gleichen Populationsgröße vorhanden. Bei den Faltenwespen hingegen überwintern nur einige junge fertile Weibchen, die dann im

Frühjahr Nistplätze suchen und dort eine neue Kolonie gründen, weshalb die höchste Populationsstärke - in Abhängigkeit von der jeweiligen Art - erst zwischen Frühsommer und Frühherbst erreicht wird (Mauss 2008).

Beim Verhalten der jeweiligen Arten und dem damit verbundenen Stichrisiko zeigen sich teils große Unterschiede. So sind Bienen und Hummeln eher friedlich, Stiche kommen daher meist nur in der Nähe des Stockes vor, während sich Wespen eher aggressiv verhalten (Przybilla et al. 2011). Bienen zeigen in der Entfernung vom Stock bei Störungen ein Fluchtverhalten. Stiche kommen hier eher nur zufällig vor, wenn die Tiere durch den Menschen unbeabsichtigt mechanisch beeinträchtigt werden. In der Nähe des Stockes wird jedoch ein ausgeprägtes Abwehrverhalten gezeigt. Wespen hingegen reagieren auch in der Nähe des Futterplatzes mit aggressivem Verhalten, das vor allem durch Bewegungen ausgelöst wird (Mauss 2008). Charakteristische Futterplätze, an denen die jeweiligen Insekten häufig zu finden sind, sind zum einen Blüten und Klee bei den Bienen und zum anderen Speisen und Abfall bei den Wespen (Przybilla et al. 2011).

1.2.3. Stichmechanismen und -eigenschaften

Da sich der Giftstachel aus dem Eiablageapparat entwickelt hat, können nur die Weibchen stechen. Bei einem Bienenstich werden bis zu 140 μg Gift (Schumacher 1994) abgegeben, bei einem Wespenstich hingegen nur ca. 3 μg (Hoffman 1984). Nach einem Bienenstich bleibt der Stachel meist stecken, während er bei Wespen meist nicht in der Haut verbleibt (Müller 2010). Dieser Unterschied beruht auf unterschiedlich starken Widerhaken der Stechborsten. Aus diesem Grund können Wespen auch mehrfach stechen. Bleibt nach dem Bienenstich der Stachel in der Haut stecken, bleibt dieser meist mitsamt dem Giftapparat zurück und es wird noch für ca. 1 Minute weiter Gift abgegeben (Przybilla et al. 2012).

1.3. Klinik der Insektengiftallergie und Therapieoptionen

1.3.1. Reaktionsgrade und Kofaktoren

Bei der Reaktion nach einem Insektenstich wird zwischen Lokalreaktionen und systemischen Reaktionen unterschieden. Die Lokalreaktion wird durch die toxische Wirkung des

Insektengiftes an der Stichstelle ausgelöst, zeigt sich als lokale Rötung und Schwellung von meist weniger als 10 cm Durchmesser. Bei ca. einem Viertel der Allgemeinbevölkerung kommt es zu einer, vermutlich allergisch bedingten, gesteigerten Lokalreaktion, die auch von Allgemeinsymptomen wie Krankheitsgefühl und Frösteln begleitet sein kann (Przybilla et al. 2012). Solche ausgeprägten Lokalreaktionen von über 10 cm Durchmesser und einer Persistenz von über 24 Stunden stellen einen Risikofaktor für spätere systemische Reaktionen dar: in Studien kam es bei bis zu 24% dieser Patienten beim nächsten Stich zu einer Anaphylaxie (Bilo et al. 2019). Bei auftretenden systemischen Reaktionen handelt es sich nahezu immer um allergische Reaktionen vom Soforttyp, die je nach Schwere in vier Grade eingeteilt werden. Die Skala reicht von leichten systemischen Reaktionen, die nur auf die Haut begrenzt sind (Grad I), bis zu akut lebensbedrohlichen systemischen Reaktionen, die mit Atem- oder Kreislaufstillstand (Grad IV) einhergehen können (Ring et al. 1977).

Die Stärke der Reaktion kann bei Patienten mit bekannten systemischen Reaktionen stark variieren, eine Vorhersage für die nächste Reaktion kann nicht getroffen werden. Frühere leichte Reaktionen stellen bereits einen Risikofaktor für spätere schwerere Reaktionen dar (Ruëff et al. 2009). Auch ein kurzer zeitlicher Abstand (weniger als zwei Monate) zwischen zwei Stichereignissen erhöht das Risiko für eine Anaphylaxie (Pucci et al. 1994). Zudem spielen sogenannte Kofaktoren eine Rolle, die eine Verstärkung der Reaktion und somit der allergischen Symptome bewirken können. Die wichtigsten Kofaktoren sind Medikamente, vor allem ACE-Hemmer, Betablocker und nicht-steroidale Antirheumatika, sowie Alkohol, Krankheit, körperliche Anstrengung und Stress (Wölbing et al. 2013, Nassiri et al. 2015). Zudem kann es bei Patienten, die erhöhte Serumtryptasewerte aufweisen oder an einer systemischen Mastozytose leiden, zu besonders schweren systemischen Reaktionen kommen (Ludolph-Hauser et al. 2001). Darüber hinaus besteht bei Patienten mit Mastozytose bereits grundsätzlich ein erhöhtes Risiko eine Insektengiftallergie zu entwickeln (Brockow et al. 2008; Niedoszytko et al. 2014). So leiden ca. 30% der Mastozytose-Patienten unter einer Allergie gegen Insektengift (Niedoszytko et al. 2009).

1.3.2. Spezifische Immuntherapie

Bei bekannter Insektengiftallergie mit systemischen Reaktionen sollte eine spezifische Immuntherapie (SIT) durchgeführt werden, da diese die einzige effektive Behandlung zur Prävention erneuter schwerer allergischer Reaktionen darstellt (Kosnik et al. 2009). Die SIT

führt zu einer Abnahme der Häufigkeit auftretender systemischer Reaktionen nach Insektenstichen und reduziert zum anderen die Schwere solcher Stichreaktionen, was zu einer Steigerung der Lebensqualität der betroffenen Patienten führt. Dies gilt vor allem für Patienten mit stattgehabten mittleren bis schweren systemischen Reaktionen (Dhami et al. 2017). Die SIT wird mit einer Standarddosierung von 100 μg alle vier Wochen durchgeführt, wodurch bei ca. 75-85% der Bienengiftallergiker und bei ca. 90-95% der Wespengiftallergiker ein ausreichender Schutz vor einer erneuten Stichanaphylaxie erzielt wird (Przybilla et al. 2016). Bei Therapieversagern, die mittels standardmäßig durchgeführter Stichprovokation erkannt werden, kann durch eine Erhöhung der Dosierung in nahezu allen Fällen ebenfalls ein ausreichender Schutz erzielt werden (Ruëff et al. 2001).

Um die Indikation für eine SIT stellen zu können, muss zum einen eine systemische Reaktion nach einem Insektenstich stattgefunden haben und zum anderen eine entsprechende Sensibilisierung vorliegen (Przybilla et al. 2016). Zur Erfassung der Sensibilisierung wird die Durchführung von Hauttests sowie die Bestimmung der spezifischen Serum-IgE-Antikörper empfohlen. Wird hierbei eine eindeutige Monosensibilisierung gegen ein Insektengift gefunden, fällt die Entscheidung zur Durchführung der SIT mit dem entsprechenden therapeutischen Insektengiftextrakt nicht schwer. Bei einer Doppelpositivität in den Testungen mit Bienen- und Wespengift und unklarer Anamnese bezüglich des schuldigen Insekts treten jedoch Probleme bei der Wahl der richtigen SIT auf (Tomsitz et al. 2017). Dies kann bei über 50% der getesteten Patienten auftreten (Müller et al. 2009). Diagnostische Stichprovokationen sollten nicht durchgeführt werden, da diese mit Risiken für den Patienten verbunden sind (u.a. Auftreten schwerer anaphylaktischer Reaktionen) und zu einem Wiederaufleben bzw. einer Schweregradsteigerung der allergischen Reaktion auf das Insektengift führen können (Ruëff et al. 2014). Zudem weisen die Stichprovokationen eine schlechte Reproduzierbarkeit auf, weshalb eine vertragene Stichprovokation keine zukünftige systemische Reaktion ausschließen kann (van der Linden et al. 1994, Dubois 2003).

Um in solchen Fällen von Doppelpositivität dennoch nicht immer eine Hyposensibilisierung gegen beide Insektengifte durchführen zu müssen, kann eine weiterführende Diagnostik mit dem Einsatz von Allergenkomponenten für den sIgE-Nachweis (Komponentendiagnostik = „component-resolved diagnosis“ = CRD) und mittels Basophilenaktivierungstest (BAT) helfen. Durch den ergänzenden Einsatz dieser beiden Methoden kann in vielen Fällen zwischen einer wahren Doppelsensibilisierung auf beide Insektengifte und einer klinisch irrelevanten Kreuzreaktion auf das jeweils andere Insektengift unterschieden werden (Eberlein 2009,

Kosnik et al. 2009, Eberlein et al. 2012). Um die Ergebnisse solcher Testungen jedoch richtig interpretieren zu können ist eine genaue Kenntnis der Zusammensetzung der Insektengifte und der Struktur der darin enthaltenen einzelnen Allergene notwendig (Bilo et al. 2005).

1.4. Zusammensetzung des Insektengifts

1.4.1. Allgemeines zur Zusammensetzung von Insektengiften

Insektengifte bestehen aus einer Mischung von Proteinen, Peptiden sowie niedermolekularen Substanzen. Bei der Charakterisierung der einzelnen Insektengiftbestandteile wurde der größte Fortschritt bisher beim Bienengift gemacht (de Graaf et al. 2009). Bereits in den 1970er Jahren wurden die ersten Hauptallergene im Bienengift entdeckt: Phospholipase A2 und Hyaluronidase (Hoffman et al. 1976) sowie das sogenannte „Allergen B“ (Hoffman et al. 1977), das später als saure Phosphatase bzw. Api m 3 bezeichnet wurde (Grunwald et al. 2006). Inzwischen wurden dank neuester technischer Methoden insgesamt 113 Proteine und Peptide im Bienengift nachgewiesen. So wurden erst vor wenigen Jahren durch die Kombination einer Vorbehandlung der Testpräparate mittels Peptidbibliothek (combinatorial peptide ligand library), um eine Anreicherung von nur in geringen Mengen vorhandenen Komponenten zu erreichen, mit der anschließenden Durchführung einer Analyse mittels Massenspektrometrie (LC-ESI-FT MS) 83 neue Giftbestandteile entdeckt (van Vaerenbergh et al. 2014).

1.4.2. Allergene im Bienengift (Honigbiene, *Apis mellifera*)

Aus den oben genannten Bestandteilen des Giftes der Honigbiene (*Apis mellifera*, engl.: honey bee) wurden bereits 12 Allergene nachgewiesen und charakterisiert. Zu den Hauptallergenen, gegen die bei dem größten Teil der Bienengiftallergiker spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden können, zählen Phospholipase A2 (Api m 1) und Hyaluronidase (Api m 2) (Bilo et al. 2005). Zudem konnten in einer Studie bei Bienengiftallergikern in 50,0% spezifische IgE-Antikörper gegen saure Phosphatase (Api m 3), in 58,3% gegen Dipeptidylpeptidase IV (Api m 5) und in 61,8% gegen Icarabin (Api m 10) nachgewiesen werden, wodurch bewiesen wurde, dass es sich auch bei diesen Allergenen um sogenannte Hauptallergene handelt (Kohler et al. 2014). Mellitin (Api m 4) hingegen, das zwar ca. 50%

des Trockengewichts des Bienengifts ausmacht und somit den Hauptbestandteil darstellt (Spillner et al. 2014), hat nur ein geringes allergisches Potential und es besteht lediglich eine moderate Sensibilisierungsrate bei den Patienten mit Bienengiftallergie gegen Mellitin, weshalb es nicht zu den Hauptallergenen zählt (Bilo et al. 2005; Paull et al. 1977, Kohler et al. 2014). Weitere Allergene im Bienengift sind Api m 6, ein Proteaseinhibitor, gegen den bei über 40% der Bienengiftallergiker eine Sensibilisierung gefunden wurde (Kettner A et al. 2001), die CUB-Serinprotease Api m 7 (Winningham et al. 2004), die Carboxylesterase Api m 8 und die Carboxypeptidase Api m 9 (Ollert et al. 2015, Elieh Ali Komi et al. 2017). Zudem wurden noch mit MRJP 8 und 9 („major royal jelly proteins“) zwei Isoformen von Api m 11 entdeckt (Blank et al. 2012) und Api m 12 (Vitellogenin) gefunden (Blank et al. 2013).

1.4.3. Allergene im Wespengift (gemeine Wespe, *Vespula vulgaris*)

Die Hauptallergene im Wespengift der sog. gemeinen Wespe (*Vespula vulgaris*, engl.: yellow jacket) sind Phospholipase A1 (Ves v 1), Hyaluronidase (Ves v 2) und Antigen 5 (Ves v 5) (King et al. 1983, Bilo et al. 2005). In serologischen Tests konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei Wespengiftallergikern über 70% eine Sensibilisierung gegen Ves v 1 und über 50% eine Sensibilisierung gegen Ves v 5 aufweisen (Seismann, Blank, Cifuentes et al 2010). Insgesamt zeigten in einer Untersuchung 94% der Wespengiftallergiker eine Reaktion auf mindestens eines der beiden Allergene Ves v 1 und Ves v 5 (Ebo et al. 2013). Von der Hyaluronidase sind die zwei Isoformen Ves v 2.01 und Ves v 2.02 bekannt (Seppala et al. 2009), die zu 58% in ihrer Proteinsequenz übereinstimmen. Die Isoform Ves v 2.02 kommt deutlich häufiger vor und stellt somit das eigentliche Hauptallergen dar (Kolarich et al. 2005). Jedoch ist die Bedeutung der Hyaluronidase (Ves v 2) als Hauptallergen zunehmend umstritten, da zwar sehr viele Wespengiftallergiker eine Sensibilisierung gegen Ves v 2 aufweisen, dies aber zumeist doppeltpositive Patienten mit gleichzeitiger serologischer Reaktion auf Bienengift sind und nur selten Patienten, die lediglich eine Sensibilisierung gegen Wespengift aufweisen (Jin et al. 2010). Als weitere Allergene im Wespengift sind Ves v 3 (Dipeptidylpeptidase IV) (Blank et al. 2010) und Ves v 6 (Vitellogenin) bekannt (Blank et al. 2013).

1.4.4. Homologe Proteine

Unter den Allergenen von Bienen- und Wespengift finden sich einige Allergene, die enge Strukturverwandtschaften in ihren Proteinsequenzen aufweisen und daher auch Auslöser von Kreuzreaktionen sein können. Diese sog. homologen Proteine von Honigbiene und gemeiner Wespe sind die beiden Hyaluronidasen Api m 2 und Ves v 2 (Hemmer et al. 2004), die beiden Dipeptidylpeptidasen IV Api m 5 und Ves v 3 (Blank et al. 2010) sowie die Vitellogenine Api m 12 und Ves v 6 (Blank et al. 2013). Als hauptverantwortliche kreuzreaktive Allergene zwischen dem Gift der gemeinen Wespe und der Honigbiene galten schon früh die Hyaluronidasen (Wypych et al. 1989). Es findet sich eine Übereinstimmung in der Proteinsequenz von ca. 50% zwischen Api m 2 und Ves v 2 (King et al. 1996). Neuere Studien zeigen jedoch, dass ein großer Teil dieser Kreuzreaktionen wahrscheinlich nicht auf die Peptidpitope sondern auf kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten, sog. cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs, siehe unten), zurückzuführen ist (Jin et al. 2010). Hingegen konnte für die beiden Dipeptidylpeptidasen IV Api m 5 und Ves v 3 gezeigt werden, dass diese unabhängig von einer Reaktion auf CCDs von spezifischen IgE-Antikörpern in den Seren von Insektengiftallergikern erkannt werden (Blank et al. 2010). Zuletzt wurden noch die beiden Vitellogenine Api m 12 und Ves v 6 gefunden, bei denen sich eine 40%-ige Übereinstimmung der Proteinsequenzen findet. Auch diese scheinen eine deutliche Rolle bei Kreuzreaktionen zu spielen, da diese in ca. 40% von Seren von Patienten mit Insektengiftallergie auch in Abwesenheit von CCDs erkannt wurden (Blank et al. 2013). Bei allen anderen Allergenen sind bisher keine homologen Proteine zwischen Bienen- und Wespengift bekannt.

Jedoch finden sich weitere homologe Proteine in den Giften anderer Hymenopteren:

So weist das Gift der Hummel große Ähnlichkeit mit dem der Honigbiene auf. Bei der Untersuchung der Giftzusammensetzung der in Europa häufig vorkommenden Erdhummel (*Bombus terrestris*) wurden 57 verschiedene Giftbestandteile identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass für 72% dieser Bestandteile ein homologes Protein im Bienengift vorliegt (Van Vaerenbergh et al. 2015). Zu diesen 57 Proteinen zählen auch die beiden bisher bekannten Allergene des Hummelgifts Phospholipase A2 (Bom t 1) und eine Serinprotease (Bom t 4). Bei der Phospholipase A2 zeigte sich eine 53%-ige Übereinstimmung mit der aus dem Bienengift (Api m 1) (Hoffman et al. 2001).

Auch die Gifte der verschiedenen Gattungen der Faltenwespen (Vespidae), zu denen neben der gemeinen Wespe u.a. auch die Hornissen (Vespae) sowie die Feldwespen (Polistinae) gehören,

weisen Proteine mit deutlicher Verwandtschaft auf. Ihre Gifte enthalten alle Phospholipase A1, Hyaluronidase und Antigen 5, die große Übereinstimmungen in Bezug auf Struktur und Aufbau der Proteine aufweisen. So zeigt z.B. die Proteinsequenz der Phospholipase A1 aus dem Wespengift (Ves v 1) eine 67%-ige Übereinstimmung mit der Proteinsequenz der Phospholipase A1 im Hornissengift, bei der Hyaluronidase zeigt sich sogar eine Übereinstimmung von 92% (King et al. 1996). Auch bei den Feldwespen finden sich Phospholipase A1 (Pol d 1) und Antigen 5 (Pol d 5), zudem konnte zuletzt auch eine Dipeptidylpeptidase IV (Pol d 3) identifiziert und rekombinant hergestellt werden (Schiener et al. 2018).

1.5. Rekombinante Allergene des Bienen- und Wespengiftes

1.5.1. Komponentendiagnostik

Um eine gute Diagnostik einer Insektengiftallergie durchzuführen ist, wie bereits unter 1.3.2. aufgeführt, eine Komponentendiagnostik („component-resolved diagnosis“ = CRD) notwendig, bei der statt mit dem gesamten Giftextrakt, der eine Vielzahl an Allergenen und weiteren Bestandteilen in schwankenden Mengen enthält und daher kaum standardisiert werden kann, mit einzelnen Allergenen getestet wird, um ein genaues Profil der sIgE-Reaktivität des Patienten zu erhalten (Valenta et al. 1995). Dies hat den Vorteil, dass detailliertere Aussagen zur vorliegenden Allergie und zu evtl. vorhandenen Kreuzreaktionen möglich sind. Gerade zur Unterscheidung einer echten Doppeltsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift von reinen Kreuzreaktionen, die meist von keiner klinischen Relevanz sind, ist die Komponentendiagnostik u.a. vor Durchführung einer spezifischen Immuntherapie unerlässlich (Brehler et al. 2013). Dies ist besonders vor dem Hintergrund relevant, dass ca. 30-59% der Patienten mit einer systemischen Reaktion nach einem Insektenstich in der Routinediagnostik eine Sensibilisierung sowohl gegen den Gesamtextrakt des Bienengifts als auch gegen den des Wespengifts aufweisen (Egner et al. 1998, Müller et al. 2009).

So gilt bei Patienten mit vorliegender Sensibilisierung gegen Wespengift („yellow jacket venom“ = YJV) das Vorliegen spezifischer IgE-Antikörper gegen eines oder beide der Hauptallergene Ves v 1 und Ves v 5, für die keine homologen Proteine im Bienengift vorliegen, als beweisend für eine echte Wespengiftallergie. In entsprechenden Studien konnten mit Hilfe beider Allergene bis zu 96% der Wespengiftallergiker richtig diagnostiziert werden (Ebo et al.

2013, Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011, Korosec et al. 2012). Gleiches gilt für das Bienengift („honey bee venom“ = HBV) mit dem Allergen Api m 1, das hauptsächlich zur Diagnostik einer echten, klinisch relevanten Bienengiftallergie verwendet wird. Jedoch werden nur ca. 80% der echten Bienengiftallergiker durch eine Testung mit Api m 1 erfasst (Jakob et al. 2012, Müller et al. 2012).

Zudem scheint auch bei einer Sensibilisierung gegen Api m 3 und/oder Api m 10, für die ebenfalls keine ähnlichen Proteine im Wespengift bekannt sind, eine echte Bienengiftallergie vorzuliegen (Blank et al. 2011, Frick et al. 2015).

Finden sich jedoch bei Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift und Wespengift nur für eines der beiden Insektengifte sIgE-Antikörper gegen Hauptallergene, so spricht dies eher für eine klinisch nicht relevante Kreuzreaktion, deren Ursache beispielsweise in der Reaktion auf die gemeinsamen Proteinepitope von homologen Proteinen liegen kann, als für eine echte Doppelsensibilisierung (Blank et al. 2010, Hemmer et al. 2001, Hofmann, Pfender, Weckesser, Huss-Marp et al. 2011, Ollert et al. 2015).

Da jedoch die nativen Allergene, wie sie im natürlichen Insektengift vorkommen, oft in nicht ausreichender Menge oder in unzureichender Reinheit vorliegen, werden immer häufiger rekombinante Allergene für die Diagnostik verwendet (Valenta et al. 2002). Die meisten dieser rekombinanten Allergene zeigen die gleichen funktionalen und immunologischen Merkmale wie ihr natürlicher Gegenpart und ermöglichen so eine in vitro-Diagnostik von Allergien (Valenta et al. 1995). Der wichtigste Unterschied ist jedoch, dass die rekombinant hergestellten Allergene ohne kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten, sog. cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs), hergestellt werden können.

1.5.2. Kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten (cross-reactive carbohydrate determinants)

Bei den CCDs im Insektengift handelt es sich um IgE-bindende Kohlenhydratstrukturen, genauer um N-Glykane mit alpha-1,3-gebundener Fucose, die als zusätzliche Seitenketten an den Allergenen vorkommen können. Diese kommen bei Insekten sowie auch im gesamten Pflanzenreich vor, Säugetiere besitzen jedoch keine solchen Strukturen (Altmann 2007). Spezifische IgE-Antikörper gegen diese CCDs sind bei Allergikern häufig zu finden, jedoch scheinen sie keine klinische Relevanz zu haben (Mari 2002, van Ree 2002). Die CCDs finden

sich bei nahezu allen natürlich vorkommenden Allergenen der Insektengifte und können so für Kreuzreaktionen verantwortlich sein (Hemmer et al. 2004).

So wurden bei einer serologischen Untersuchung von Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift mittels natürlichem Api m 1 (nApi m 1) und rekombinant hergestelltem, CCD-freiem Api m 1 (rApi m 1) nur bei 72% der Patienten sIgE-Antikörper gegen rApi m 1 gefunden, während über 81% der Patienten eine positive Reaktion auf nApi m 1 zeigten. In der untersuchten Kohorte waren neben Patienten mit alleiniger Positivität auf Bienengift auch Patienten mit Doppeltpositivität auf Bienen- und Wespengift. Bei näherer Betrachtung der Patienten mit Doppeltsensibilisierung zeigte sich, dass die Patienten aus dieser Gruppe, die nur durch nApi m 1 jedoch nicht durch rApi m 1 positiv getestet wurden, zum größten Teil hohe Spiegel an sIgE-Antikörpern gegen CCDs aufwiesen. Bei den Patienten mit niedrigem oder nicht vorhandenem CCD-spezifischen sIgE zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen den Testungen mit nApi m 1 und rApi m 1 (Jakob et al. 2012).

Aber es können auch Kreuzreaktionen mit Allergenen von Pflanzen auftreten. So wurden beispielsweise bei Patienten, die nach einem Insektenstich solche sIgE-Antikörper gegen CCDs gebildet hatten, positive in vitro-Tests auf Pollenallergene gefunden, obwohl nie entsprechende klinische Symptome vorlagen und es sich somit um ein falsch-positives Ergebnis handelte (Kochuyt et al. 2005). Insgesamt finden sich bei ca. 75% aller Patienten mit Doppeltsensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift auch in vitro-Reaktionen gegen andere CCD-tragende Allergene, wie z.B. Allergene aus Lieschgras- oder Rapspollen und Naturlatex (Jappe et al. 2006). Es wird vermutet, dass die CCDs bei über 50% der Patienten mit serologisch festgestellten Sensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift eine wichtige Rolle spielen oder sogar der alleinige Auslöser der Doppeltpositivität sind (Hemmer et al. 2001). Die neueren Zahlen von Jappe et al. machen vorhandene IgE-Antikörper gegen die CCDs sogar für ca. 75% der Doppeltsensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift verantwortlich (Jappe et al. 2006). Aufgrund dieser Schlüsselrolle der CCDs bei Kreuzreaktionen können sie eine eindeutige Diagnose bzgl. des auslösenden Insekts bei doppelpositiven Patientenserum deutlich erschweren. Eine genaue Kenntnis über ihren Einfluss bei Kreuzreaktionen ist daher notwendig, um zwischen klinisch relevanten und irrelevanten Sensibilisierungen unterscheiden und den richtigen Giftextrakt für eine Hyposensibilisierung auswählen zu können (Hemmer et al. 2004, Ollert et al. 2015).

1.5.3. Herstellung rekombinanter Allergene

Eine Möglichkeit der Herstellung von rekombinanten Allergenen ist das Klonen und die anschließende Expression in Bakterien (Prokaryoten), wobei hier üblicherweise *Escherichia coli* verwendet wurde (Blank et al. 2011). Hierbei entstehen nicht-glykosylierte Formen der Allergene, die keine CCDs aufweisen und bei einer durch Kreuzreaktion auf CCDs bedingten Doppeltpositivität auf Bienen- und Wespengift helfen, das eigentlich die Allergie auslösende Insekt zu identifizieren (Mittermann et al. 2010). Im Fall von Api m 1 konnte mittels des *E. coli*-Systems eine nicht-glykosylierte, aber gleich strukturierte Form des natürlichen Api m 1 hergestellt werden, die auch ein gleiches immunologisches Profil aufwies. Hierbei war die fehlende Glykosylierung nicht ausschlaggebend für die Allergenität (Dudler et al. 1992). Jedoch können mit diesem prokaryotischen System nicht alle Allergene der Insektengifte korrekt hergestellt werden, da einige der natürlichen Allergene auch IgE-Epitope aufweisen, die bei fehlender Glykosylierung nicht mehr vorhanden sind (Perez-Riverol et al. 2015).

Eine neuere Methode ist die Produktion von rekombinanten Allergenen in eukaryotischen Insektenzellen. Hierbei werden die rekombinanten Proteine mittels Baculovirus-Infektion von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) oder *Trichoplusia ni* (Tni bzw. HighFive) Insektenzellen hergestellt (Grunwald et al. 2006, Seismann, Blank, Braren et al. 2010). Die rekombinant hergestellten Baculoviren enthalten hierbei die für das jeweilige Allergen codierende DNA und fungieren als Vektor (Seismann, Blank, Cifuentes et al. 2010). Im Gegensatz zu den mittels *E. coli* hergestellten rekombinanten Allergenen weisen die aus den Insektenzellen gewonnenen rekombinanten Allergene eine korrekte Proteinfaltung und Glykosylierung auf, bei der alle spezifischen IgE-Epitope des jeweiligen Allergens enthalten sind (Spillner et al. 2014). Dies macht vor allem bei den größeren Allergenen einen deutlichen Unterschied aus. So weist z.B. die aus den Insektenzellen gewonnene rekombinante Hyaluronidase (Api m 2) eine ähnliche enzymatische Aktivität und IgE-Bindungskapazität wie das natürlich vorkommende Allergen auf, während beides bei der mittels *E. coli* hergestellten rekombinanten Hyaluronidase deutlich reduziert ist (Soldatova et al. 1998). Der wichtigste Unterschied zwischen der Herstellung mittels der beiden verschiedenen Insektenzellen ist das Fehlen der alpha-1,3-gebundenen Fucoseseitenketten bei den durch Sf9-Insektenzellen hergestellten rekombinanten Allergenen, während diese bei den in den Tni-Insektenzellen hergestellten Allergenen vorkommen und diese rekombinanten Allergene daher eine CCD-Reaktivität aufweisen (Seismann, Blank, Braren et al. 2010).

1.5.4. Für die Diagnostik verfügbare rekombinante Allergene

Nachdem lange Zeit nur die Hauptallergene Api m 1, Ves v 1 und Ves v 5 als rekombinante Allergene für die Routinediagnostik der Bienen- und Wespengiftallergie zur Verfügung standen (Ollert et al. 2015), sind in den letzten Jahren noch rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5 und rApi m 10 hinzugekommen (Tomsitz et al. 2017).

1.6. Klinische und serologische Diagnostik einer Insektengiftallergie

1.6.1. Zeitpunkt der Diagnostik

Der ideale Zeitpunkt für die Durchführung der diagnostischen Tests ist so früh wie möglich, um gerade Patienten mit schweren systemischen Reaktionen den möglichst zeitnahen Beginn der SIT zu ermöglichen. Idealerweise sollte dies bereits innerhalb der ersten Woche nach dem Stichereignis erfolgen. Um dabei keine falsch-negativen Ergebnisse zu übersehen, sollte bei allen zu diesem Zeitpunkt negativ getesteten Patienten eine Wiederholung der Testung in Woche 5-6 nach dem Stichereignis erfolgen. In dieser Zeit kommt es meist zu einem Anstieg der Konzentration des spezifischen IgE gegen das auslösende Insekt. Hierdurch kann eine Sensibilisierung am zuverlässigsten erfasst werden (Goldberg et al. 1997, Rieger-Ziegler et al. 1999). Ist eine solche zweimalige Testung nicht möglich, dann wird eine Testung frühestens zwei Wochen nach dem Stichereignis empfohlen, um ein falsch-negatives Ergebnis aufgrund einer möglichen Refraktärphase zu vermeiden. Nach Ablauf dieser zwei Wochen sollte die Testung jedoch möglichst bald erfolgen (Przybilla et al. 2011). Vor allem bei länger zurückliegenden Stichereignissen kann eine Testung falsch-negativ ausfallen, da es nach dem initialen Anstieg der IgE-Konzentration kurz nach dem Stichereignis schon innerhalb der ersten drei Jahre zu einem signifikanten Abfall selbiger kommen kann – mit einer evtl. entsprechend niedrigeren Signifikanz der klinischen Diagnostik (Mosbech et al. 1986).

1.6.2. Hauttestungen

Hauttests werden mit den Gesamtextrakten von Bienen- und Wespengift in verschiedenen Verdünnungsreihen zur Ermittlung der Reaktionsschwelle durchgeführt. Standardmäßig wird ein Prick-Test mit den Giftkonzentrationen 1,0/10/100 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt, bei negativem

Pricktest anschließend der sensitivere Intrakutantest. Es kann jedoch auch ausschließlich ein Intrakutantest mit den Konzentrationen 0,001/0,01/0,1/1,0 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt werden (Przybilla et al. 2011). Hauttests werden bei einer Quaddel von mindestens 5 mm Durchmesser als positiv gewertet, ergänzend wird ein Erythem von mindestens 11 mm Durchmesser als eine positive Reaktion gewertet. Allerdings werden bei einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ im Intrakutantest häufig klinisch nichtrelevante positive Reaktionen beobachtet, die u.a. dem irritativen Effekt der Insektengifte in höheren Dosierungen zugeschrieben werden (Georgitis et al. 1985). Man geht jedoch davon aus, dass Hauttests nicht oder nur in sehr hohen Konzentrationen der Insektengifte durch CCDs beeinflusst werden (Sturm, Jin et al. 2011), doppelpositive Reaktionen gegen Bienen- und Wespengift wurden in 47,9% der Patienten mit systemischer Reaktion nach einem Insektenstich gefunden.

1.6.3. Bestimmung spezifischer Serum-IgE-Antikörper

1.6.3.1. Übersicht über die Testverfahren zur Bestimmung von spezifischem IgE

Der erste routinemäßig verwendete Test zur Bestimmung von spezifischem IgE im Serum war der Radioallergosorbent-Test (RAST), der bereits 1967 beschrieben wurde (Ollert et al. 2005). Die Ergebnisse wurden zumeist in sechs semiquantitativen Klassen (RAST-Klassen) angegeben (Egner et al. 1998), Papierscheiben kamen als Allergenträger zum Einsatz (Eiken et al. 1992). Durch die Verwendung solcher festen Papierscheiben als Allergenträger war die Sensitivität beeinträchtigt, zudem mussten radioaktiv markierte Substrate verwendet werden (Leimgruber et al. 1991).

Über die Jahre entwickelte sich eine 2. Generation von Testverfahren zum Nachweis von spezifischem IgE, das bekannteste und am weitesten verbreitete ist das CAP-System. Diese verwenden eine Standardreferenzkurve, die nach dem WHO-Standard für IgE (75/502) kalibriert ist. Die Ergebnisse werden in quantitativen Einheiten, Kilounits pro Liter (kU/L), angegeben. Ein kU/L entspricht 2,4 mg IgE pro Liter (Plebani et al. 1998). Dieser Test zeigte sich im Vergleich zum RAST deutlich sensibler, während zudem keine Einbußen der Spezifität auftraten (Leimgruber et al. 1991, Leimgruber et al. 1993). Wichtigster Unterschied war die weiterentwickelte Trägersubstanz für die Allergene, mittels derer nun dreimal mehr Allergen gebunden werden konnte als mit den Papierscheiben (Leimgruber et al. 1993). Der Arbeitsbereich bzw. Messbereich liegt normalerweise bei 0,35-100 kU/L, die Ergebnisse

werden sowohl quantitativ als auch im klassischen Spektrum der semiquantitativen Klassen (von Klasse 0, die alle Ergebnisse $< 0,35$ kU/L umfasst, bis Klasse 6, die alle Ergebnisse ≥ 100 kU/L umfasst) angegeben (Ollert et al. 2005).

Als folgende 3. Generation wurden dann vollautomatische Immunoassays, wie der Immulite2000, entwickelt, die eine hohe Übereinstimmung bezüglich der Ergebnisse mit dem halbautomatischen CAP zeigen (Ollert et al. 2005, Sturm, Jin et al. 2011).

1.6.3.2. Testung mit Bienen- und Wespengiftextrakt

Zur Diagnostik einer Insektengiftallergie werden initial die oben beschriebenen Hauttestungen sowie die Bestimmung der spezifischen Serum-IgE-Antikörper gegen die Gesamtgifte empfohlen (Przybilla et al. 2011). Wenn hierdurch kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden kann, sollten die spezifischen IgE-Antikörper gegen relevante Einzelallergene bestimmt werden (Komponentendiagnostik). Insgesamt werden bis zu 59% der Patienten, die nach einem Insektenstich allergisch reagiert haben, in der serologischen Diagnostik doppelpositiv auf Bienen- und Wespengift getestet (Müller et al. 2009).

1.6.3.3. Ergänzende Komponentendiagnostik

1.6.3.3.1. Unterscheidung zwischen echter Doppeltsensibilisierung und Kreuzreaktion

Wie bereits unter 1.5.1. beschrieben, hilft die Komponentendiagnostik bei der Unterscheidung zwischen einer echten Doppeltsensibilisierung und einer Kreuzreaktion auf homologe Proteine oder CCDs. Kreuzreaktionen auf homologe Proteine sind immer dann anzunehmen, wenn die Patienten erhöhte sIgE-Werte gegen diese aufweisen und eine alleinige Reaktion auf CCDs ausgeschlossen werden kann. Dies ist nicht immer einfach, da bei bis zu 75% der Patienten mit Doppeltsensibilisierungen auch IgE-Antikörper gegen CCDs nachgewiesen werden können (Jappe et al. 2006).

Gerade bei den beiden Hyaluronidasen Api m 2 und Ves v 2 scheinen die Kreuzreaktionen zumeist nicht durch die homologen Peptidpitope, sondern größtenteils durch die CCDs bedingt zu sein. So konnten in einer Studie 65% der positiven Reaktionen auf die Hyaluronidase Ves v

2 komplett den CCDs zugeschrieben werden, während in nur 8% die Reaktion allein durch die Peptidepitope ausgelöst wurde (Jin et al. 2010).

Hingegen scheinen die Dipeptidylpeptidasen Api m 5 und Ves v 3 eine deutlich größere klinische Rolle bei der Diagnostik der Insektengiftallergie zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Bienen- oder Wespengiftallergie in über 50% eine positive Reaktion auf Api m 5 oder Ves v 3 vorliegt, die unabhängig von CCDs ist (Blank et al. 2010). Kreuzreaktionen treten zudem auch mit Pol d 3 auf, der Dipeptidylpeptidase IV im Gift von Feldwespen (*Polistes dominula*), gegen die 66% der Patienten mit Sensibilisierung gegen *Polistes*-Gift sIgE-Antikörper aufweisen und die eines der Majorallergene dieses Giftes ist (Schiener et al. 2018). Eine ähnliche klinische Bedeutung kommt auch den Vitellogeninen Api m 12 und Ves v 6 zu, die bei ca. 40% der Insektengiftallergiker unabhängig von den CCDs eine positive Reaktion auslösen (Blank et al. 2013).

1.6.3.3.2. Verwendung CCD-freier rekombinanter Allergene bei der in vitro-Testung

Die Verwendung von CCD-freien rekombinanten Allergenen bei der Diagnostik ist v.a. bei CCD-positiven Patienten von Vorteil, da hier durch deren Verwendung eine durch die CCDs erhöhte Reaktivität bei der Testung vermieden wird, während bei den CCD-negativen Patienten kein Unterschied in der Reaktivität zwischen dem natürlichen und dem rekombinant mittels Sf9 hergestellten Allergen besteht (Jakob et al. 2012). Durch diesen Ausschluss von Reaktionen auf CCDs bei der Anwendung von rekombinanten, CCD-freien Allergenen wird auch die Beurteilung einer Doppeltsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift in Bezug auf eine durch homologe Allergene verursachte Kreuzreaktion vereinfacht (Ollert et al. 2015).

Es wird jedoch von einigen Autoren angeführt, dass die Diagnostik der Bienengiftallergie mittels des kommerziell erhältlichen rekombinant hergestellten rApi m 1 eine deutlich niedrigere Sensitivität aufzuweisen scheint als die Diagnostik mit dem natürlichen nApi m 1. So wiesen z.B. in einer Studie reine Bienengiftallergiker nur in 57% eine positive Testreaktion auf rApi m 1 auf, während 91% davon positiv bei der Testung mit nApi m 1 reagierten (Korosec et al. 2011). Insgesamt werden durch die reine Testung mit rApi m 1 ungefähr 57 – 79% der Bienengiftallergiker erfasst (Hofmann, Pfender, Weckesser, Huss-Marp et al. 2011, Jakob et al. 2012, Korosec et al. 2011, Sturm, Hemmer et al. 2011).

Bei der Diagnostik der Wespengiftallergie scheint dieses Problem nicht zu bestehen, hier werden positive Reaktionen auf rVes v 5 bei 84,5%-92% der Wespengiftallergiker gefunden (Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011, Michel et al. 2016, Vos et al. 2013), bei ergänzender Anwendung von rVes v 1 steigt der Anteil der positiv getesteten Wespengiftallergiker sogar auf 92-96,3% (Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011, Korosec et al. 2012).

Jedoch kann oben genanntes Problem durch die ergänzende Testung mit weiteren rekombinanten Allergenen wohl auch bei den Bienengiftallergikern ausgehebelt werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch eine Testung mit rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, nApi m 4, rApi m 5 und rApi m 10 insgesamt 94,4% der Bienengiftallergiker erfasst werden (Kohler et al. 2014). Ergänzend wurde bei einer Untersuchung von doppelpositiven Patienten festgestellt, dass durch eine ergänzende Diagnostik mit rApi m 3 und rApi m 10 bei insgesamt 46-65% der Api m 1-negativen Patienten doch eine Sensibilisierung gegen Bienengift nachgewiesen werden konnte (Frick et al. 2015).

1.6.3.3.3. Erhöhte Sensitivität durch die Komponentendiagnostik

Durch die Komponentendiagnostik kann zudem eine erhöhte Sensitivität bei der Diagnostik einer Insektengiftallergie erreicht werden. So wurden bei Patienten, die eine eindeutige Anamnese für eine anaphylaktische Reaktion nach einem Insektenstich hatten, aber weder durch Bienen- noch Wespengiftextrakt positiv getestet worden sind, in 56% spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v 5 nachgewiesen (Hofmann, Pfender, Weckesser, Huss-Marp et al. 2011). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von 308 Patienten, die mit einer systemischen Reaktion auf einen Wespenstich reagiert hatten, gefunden. Nur 83,4% der Patienten wurden mit dem Gesamtextrakt positiv getestet, während 89,9% positiv auf rVes v 5 reagierten. Bei ergänzender Anwendung von rVes v 1 wurden insgesamt 96,1% der Wespengiftallergiker durch die rekombinanten Allergene positiv getestet (Vos et al. 2013). Da zudem bei den mittels Wespengiftextrakt positiv getesteten Patienten die sIgE-Werte des gesamten Extraktes im Durchschnitt niedriger waren als die sIgE-Werte von rVes v 5, wurde eine Unterrepräsentation von rVes v 5 im Wespengiftextrakt als Ursache für die diagnostische Lücke vermutet und die Testung mit einem durch rVes v 5 angereicherten Wespengiftextrakt wiederholt. Durch dieses sog. „Spiking“ des Wespengiftextraktes konnte die Sensitivität der Testung von 83,4% auf 96,8% erhöht werden. In einer weiteren Studie zeigte sich ebenfalls für

den mit rVes v 5 angereicherten Wespengiftextrakt mit 95,6% eine höhere Sensitivität als bei der Testung mit dem herkömmlichen Extrakt (nur 93,8% positiv getestete Wespengiftallergiker), jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Bokanovic et al. 2014).

Auch für Bienengiftallergiker konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der Komponentendiagnostik die Sensitivität im Vergleich zur alleinigen Testung mit dem Bienengiftextrakt erhöhen kann. So wurden in einer Studie Bienengiftallergiker mit einem sIgE-Wert von $< 0,35$ kU/L (entspricht einem negativen Testergebnis) gegen den Gesamtextrakt in 22,2% mittels rApi m 1 und in 66,7% mittels rApi m 3 positiv getestet (Cifuentes et al. 2014), was für das Vorliegen einer Bienengiftallergie spricht.

Diese Erhöhung der Sensitivität durch die Komponentendiagnostik ist v.a. auch bei Hochrisikopatienten mit erhöhten basalen Serumtryptasewerten und/oder Mastozytose wichtig. Da diese Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung niedrigere Gesamt-IgE-Werte aufweisen, haben diese Patienten ein erhöhtes Risiko für falsch-negative Hauttestungen und werden häufiger trotz Insektengiftallergie mit den Insektengiftextrakten negativ getestet (Müller et al. 1990, Potier et al. 2009). In einer Studie mit 49 Wespengiftallergikern, die alle erhöhte basale Serumtryptasewerte und/oder eine diagnostizierte Mastozytose aufwiesen, wurden lediglich 87,7% mit dem Wespengiftextrakt unter Verwendung des standardmäßigen Cutoffs von 0,35 kU/L positiv getestet. In der Kontrollgruppe (Wespengiftallergiker ohne Mastzellerkrankung) wurden hierdurch 92% positiv getestet. Die Reduktion des Cutoffs auf 0,1 kU/L führte in der Kontrollgruppe zu einer Sensitivität von 100%, während bei den Hochrisikopatienten noch immer nur 91,8% positiv getestet wurden. Nur durch die ergänzende Testung mit rVes v 1 und rVes v 5 und Anwendung des Cutoff von 0,1 kU/L konnten die restlichen Wespengiftallergiker der Hochrisikogruppe erfasst werden, weshalb gerade bei diesen Patienten mit erhöhten basalen Serumtryptasewerten und/oder Mastozytose neben der Durchführung der Komponentendiagnostik auch die Anwendung eines erniedrigten diagnostischen Cutoff von 0,1 kU/L für die korrekte Diagnose der Insektengiftallergie nötig zu sein scheint (Michel et al. 2016).

1.6.3.3.4. Ergänzende Untersuchungen zum Screening auf Antikörper gegen CCDs

Zusätzlich sollte bei jeder Testung, v.a. bei Patienten, die spezifisches IgE sowohl gegen Bienen- als auch gegen Wespengift aufweisen, ergänzend zur Diagnostik mit den

rekombinanten Allergenen auch das spezifische IgE gegen mindestens ein CCD-tragendes Allergen bestimmt werden (Jappe et al. 2006). Hierfür werden aktuell verschiedene Reagenzien verwendet: Meerrettichperoxidase, Ascorbat-Oxidase, die Cysteinprotease Bromelain sowie MUXF (Ollert et al. 2015). Bei Meerrettichperoxidase, Ascorbat-Oxidase und Bromelain handelt es sich um pflanzliche Glykoproteine, die reich an CCDs sind (Batanero et al. 1996).

Die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase) wird häufig verwendet, da der menschliche Organismus ihr natürlicherweise nicht ausgesetzt ist und so Allergien dagegen nicht vorkommen (Jappe et al. 2006). Bromelain bietet sich ebenfalls für die CCD-Diagnostik an, da es nicht nur reich an kreuzreaktiven Kohlenhydratseitenketten ist, sondern das Protein selbst nahezu gar nicht als Allergen auftritt und kaum allergische Symptome auslöst (Mari 2001, Mari 2002).

MUXF (bzw. MUXF3 oder MUXF3 CCD), bei dem es sich um die CCD-Komponente des aus dem Stamm der Ananas gewonnenen Bromelain handelt, ist ein reiner CCD-Marker, da es nur das N-Glykan mit der alpha-1,3-gebundener Fucose enthält (Hemmer et al. 2001, Przybilla et al. 2011). Dieses ist kommerziell erhältlich (z.B. o214 von Phadia für ImmunoCAP).

Das Vorhandensein von spezifischem IgE gegen CCDs hilft bei der Interpretation, schließt jedoch eine tatsächliche Doppelsensibilisierung bzw. die Sensibilisierung gegen Proteinepitope von verschiedenen Insektengiften nicht aus (Sturm, Jin et al. 2011). So wurde z.B. in einer Studie gezeigt, dass fast 50% der CCD-positiven Patienten mit Sensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift auch spezifische IgE-Antikörper gegen rApi m 1 und rVes v 5 aufweisen, was gegen eine reine Kreuzreaktion und für eine tatsächliche Doppelsensibilisierung spricht (Hofmann, Pfender, Weckesser, Huss-Marp et al. 2011).

1.6.4. Basophilenaktivierungstest (BAT)

Kann mittels der oben genannten Diagnostik kein eindeutiges Ergebnis bzgl. des auslösenden Insektes bei Doppelsensibilisierung erzielt werden oder kann bei Patienten mit anamnestisch vorliegender systemischer Reaktion nach einem Stich weder durch Hauttests noch durch die Bestimmung der sIgE-Antikörper eine entsprechende Sensibilisierung gefunden werden, können ergänzend noch zelluläre in vitro-Tests durchgeführt werden (Przybilla et al. 2011). Hierzu gehören neben dem weitestgehend verwendeten Basophilenaktivierungstest noch der

Histaminfreisetzungstest und der Leukotrienfreisetzungstest (= „cellular antigen stimulation test“). Hierbei werden Vollblut oder angereicherte Blutleukozyten der Patienten mit einer Allergenlösung inkubiert und die durch die Allergenstimulation ausgelöste Freisetzung von Mediatoren bzw. die Expression von Oberflächenmarkern der basophilen Granulozyten dient als indirektes Maß für das Vorhandensein von zellulär gebundenem spezifischen IgE (Eberlein, Thomas 2016).

Beim Basophilenaktivierungstest wird die Expression von CD63 auf den Basophilen gemessen. CD63 ist ein Oberflächenmarker, der bei aktivierten Basophilen in großer Dichte vorkommt, bei ruhenden Zellen jedoch kaum exprimiert wird (Knol et al. 1991). Liegen bei dieser quantitativen Messung mehr als 15% der basophilen Granulozyten im aktivierten Zustand vor, wird der Test als positiv gewertet (Eberlein-König et al. 2004). Der BAT stellt eine sehr sensitive Messmethode zur Diagnostik der Insektengiftallergie dar. So werden für den BAT Sensitivitäten von 91,3% bis hin zu 100% bei der Erkennung von Bienengiftallergikern sowie von 85,3-97% bei der Diagnostik von Wespengiftallergikern berichtet, die teils über der Sensitivität der Bestimmung von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum liegt (Eberlein-König et al. 2006, Erdmann et al. 2004, Sturm et al. 2004). Aus diesem Grund eignet sich der BAT zur weiterführenden Diagnostik bei Patienten, bei denen trotz anamnestisch vorliegender systemischer Reaktion nach einem Stich mit den herkömmlichen Tests keine entsprechende Sensibilisierung gefunden werden konnte. So konnte in einer Studie bei 81% solcher Patienten, die keine spezifischen IgE-Antikörper gegen die Insektengifte aufwiesen, mittels BAT die Diagnose einer Insektengiftallergie gestellt werden. Ergänzend konnten 56% der Patienten, die sowohl negative sIgE-Antikörper als auch negative Intrakutantests bei der Testung mit den Insektengiften aufwiesen, mittels BAT diagnostiziert werden (Korosec et al. 2013). Zudem kann der BAT bei der Zuordnung von doppelpositiven Patienten zum eigentlich auslösenden Allergen helfen (Kosnik et al. 2009). In einer Studie konnte mittels des BAT sogar bei fast 50% der Patienten, die trotz Komponentendiagnostik doppelpositiv auf Bienen- und Wespengift getestet wurden, das für die Entscheidung zur spezifischen Immuntherapie relevante Insekt gefunden werden (Eberlein et al. 2012).

2. Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Trotz der umfassenden aktuell verfügbaren diagnostischen Möglichkeiten kann noch immer bei einigen Patienten mit anamnestisch bekannter Insektengiftallergie nicht eindeutig das auslösende Insekt bestimmt bzw. nicht immer zwischen einer echten, klinisch relevanten Doppelsensibilisierung und einer reinen Kreuzreaktion unterschieden werden.

Gründe hierfür sind unter anderem diagnostische Lücken bei der Komponentendiagnostik, mittels derer entsprechend aktueller Zahlen nur bis zu 96,3% der Wespengiftallergiker (Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011) und bis zu 94,4% der Bienengiftallergiker (Kohler et al. 2014) erfasst werden. Zudem ist gerade bei den Bienengiftallergikern noch nicht endgültig geklärt, ob die Testung mit rekombinanten Allergenen nicht deutlich weniger sensitiv ist als die Testung mit dem natürlichen Allergen Api m 1 (Korosec et al. 2011).

Bei den doppelt positiv getesteten Patienten ist zudem noch immer nicht in jedem Fall eine korrekte Zuordnung bzgl. echter Doppelsensibilisierung, einer Reaktion auf Peptid epitope homologer Proteine oder einer Kreuzreaktion aufgrund von CCDs möglich. So konnte beispielsweise zwar gezeigt werden, dass Sensibilisierungen gegen die Dipeptidylpeptidasen Api m 5 und Ves v 3 auch unabhängig von CCDs vorliegen (Blank et al. 2010), jedoch fehlen bisher umfassende Untersuchungen, wie häufig diese Sensibilisierungen tatsächlich die Ursache von Kreuzreaktionen bei doppelt sensibilisierten Patienten darstellen. Bei den Hyaluronidasen Api m 2 und Ves v 2 scheinen solche Sensibilisierungen unabhängig von CCDs kaum vorzukommen (Jin et al. 2010), jedoch fehlen auch hier Untersuchungen an größeren Kohorten um diese Ergebnisse zu überprüfen. Zwar können in solchen unklaren Fällen Screenings auf spezifische IgE-Antikörper gegen CCDs helfen, jedoch kann auch der Nachweis solcher nicht zuverlässig eine echte Doppelsensibilisierung oder eine Reaktion auf homologe Proteine ausschließen, zumal auch bei Patienten mit nachgewiesener Reaktion auf CCDs nicht immer entsprechende IgE-Antikörper vorliegen (Sturm, Jin et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand großer Fallzahlen eine umfangreiche Charakterisierung der serologischen Immunreaktivität von Insektengiftallergikern mittels rekombinanter Allergene erfolgen, um weitere Erkenntnisse über die Unterschiede der IgE-Reaktivitäten zwischen doppelt- und monosensibilisierten Patienten zu erhalten und die Häufigkeiten und Ursachen von Kreuzreaktionen näher untersuchen zu können. Insbesondere sollen auch die Einflüsse von CCDs auf die Diagnostik der Insektengiftallergie näher untersucht werden, um genauere Aussagen bzgl. ihrer Auswirkung auf doppelt positive Testergebnisse zu ermöglichen.

Weiter soll im Rahmen dieser Auswertung insbesondere auch auf die Vergleichbarkeit der verschiedenen Testverfahren eingegangen sowie die Sensitivität der Komponentendiagnostik gerade in Bezug auf oben aufgeführte diagnostische Lücken oder die noch fragliche Vergleichbarkeit zwischen der Testung mit natürlichen und rekombinant hergestellten Allergenen weiter untersucht werden. In diesem Rahmen soll auch die diagnostische Relevanz eines Cutoffs von 0,1 kU/L bei der Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper weiter untersucht werden, da dieser wohl in einigen Fällen für die korrekte Diagnose einer Insektengiftallergie notwendig zu sein scheint (Michel et al. 2016).

3. Material und Methoden

3.1. Daten

Es erfolgte die retrospektive Auswertung von Daten, die in den Jahren 2008 und 2009 im Rahmen verschiedener allergologischer Untersuchungen in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Klinikum rechts der Isar, TUM, von insgesamt 269 Patienten mit Bienen- und/oder Wespengiftallergie gewonnen und vollständig anonymisiert zur Verfügung gestellt wurden.

Bei den 269 anonymisierten Datensätzen handelt es sich um drei unterschiedliche Patientenkollektive, die sich durch die jeweils durchgeführten Untersuchungen voneinander unterscheiden. Aufgrund von teils fehlenden Einzelwerten konnten nicht alle vorliegenden Patientendaten für die erfolgte statistische Auswertung verwendet werden, einzelne Patientendaten mussten aus der Auswertung herausgenommen werden. Dies wird im Einzelnen im Rahmen der genaueren Beschreibung der drei verschiedenen Kollektive erläutert. Hauptsächlich handelt es sich bei den vorliegenden Daten um die Ergebnisse von serologischen Bestimmungen der spezifischen IgE-Reaktivität gegen Bienen- und Wespengift und verschiedenen Einzelallergenen. Diese serologischen Untersuchungen wurden mittels automatisierter Immunoassay-Systeme durchgeführt (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland und Phadia UniCAP250, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden). Bei einem Patientenkollektiv liegen außerdem Ergebnisse von intradermalen Hauttests vor.

Patientenkollektiv 1:

Hierbei handelt es sich um 67 Datensätze, die von Patienten mit Bienen- und/oder Wespengiftallergie stammen. Bei allen Patienten liegen die Ergebnisse der serologischen Bestimmung der spezifischen IgE-Reaktivität gegen Wespengift (Yellow Jacket Venom – YJV) und Bienengift (Honey Bee Venom – HBV) vor, hierbei waren jeweils die kommerziell erhältlichen Assays für YJV (i3) und HBV (i1) der Firma Siemens Healthcare Diagnostics verwendet worden. Weiter liegen jeweils die sIgE-Reaktivitäten gegen die Allergene Ves v 3,

Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4 und Api m 5 vor, die mittels Prototypen von Immunoassays für die klinische Forschung bestimmt worden sind. Hierbei waren die rekombinant in *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen hergestellten Allergene rVes v 3, rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 und rApi m 5 verwendet worden, die nahezu CCD-frei sind. Für das Allergen Api m 3 liegen zudem bei allen Patienten die Ergebnisse der IgE-Reaktivitäten vor, die mittels rekombinant in *Trichoplusia ni* (Tni)-Insektenzellen hergestelltem rApi m 3 ermittelt wurden, das im Gegensatz zu den Sf9-Produkten CCDs aufweist. Das für die Tests verwendete Api m 4 war mittels Peptidsynthese hergestellt worden. Die IgE-Reaktivitäten sind mit Werten von $< 0,10$ kU/L bis > 100 kU/L sowie zusätzlich als Zuordnung zu den IgE-Klassen 0-VI angegeben. Die Daten eines Patienten konnten jedoch für die meisten Auswertungen nicht verwendet werden, da hier keine Daten für die sIgE-Reaktivität gegen Api m 1, Api m 2 und Api m 4 vorlagen, sodass größtenteils nur die restlichen 66 Datensätze ausgewertet wurden. Ergänzend liegen bei allen 67 Patienten die Ergebnisse eines intradermalen Hauttests vor, der jeweils mit den natürlichen Bienen- und Wespengiftextrakten durchgeführt worden ist. Hier ist jeweils die niedrigste Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ angegeben, mit der ein positives Ergebnis erreicht werden konnte, sowie die entsprechende Wertung des Testergebnisses (negativ = neg, Reaktion ab $0,1 \mu\text{g/ml}$ = pos, Reaktion ab $0,01 \mu\text{g/ml}$ = pos+, Reaktion ab $0,001 \mu\text{g/ml}$ = pos++, Reaktion ab $0,0001 \mu\text{g/ml}$ = pos+++). Hier konnte ebenfalls ein Datensatz nicht für die statistische Auswertung verwendet werden, da hier die Angaben nicht eindeutig waren (Angabe, dass Reaktion ab $0,0001 \mu\text{g/ml}$, Testbewertung jedoch als pos/neg).

Bei 55 der 67 Patienten liegen zusätzlich die Ergebnisse der mittels von der Firma Phadia (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden) rekombinant hergestellten, CCD-freien und kommerziell vertriebenen Allergene rApi m 1 (i208) und rVes v 5 (i209) ermittelten sIgE-Reaktivitäten vor.

Patientenkollektiv 2:

Hierbei handelt es sich um 100 Bienengiftallergiker, deren sIgE-Reaktivitäten gegen rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, Api m 4, rApi m 5, Bienengift und gegen das aus Bromelain abgeleitete CCD-haltige Glykopeptidallergen MUXF3 bestimmt worden sind. Auch hier sind wie beim Patientenkollektiv 1 die rekombinant in *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen hergestellten Allergene rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 und rApi m 5 verwendet worden, die nahezu CCD-frei sind. Ergänzend liegen zudem für Api m 5 nicht nur die Daten für die mittels

Sf9-Insektenzellen hergestellte Variante, sondern auch für das mittels Tni-Insektenzellen hergestellte rApi m 5 vor. Das für die Tests verwendete Api m 4 war mittels Peptidsynthese hergestellt worden. Für die Bestimmung des sIgE-Wertes gegen Bienengift ist wie bei Kollektiv 1 der kommerziell erhältliche Assay für HBV (i1) der Firma Siemens Healthcare Diagnostics verwendet worden. Die IgE-Reaktivitäten sind wie beim Kollektiv 1 mit Werten von < 0,10 kU/L bis > 100 kU/L sowie zusätzlich als Zuordnung zu den IgE-Klassen 0-VI angegeben. Bei 5 Patienten fehlen jedoch die Ergebnisse für die Tests mittels rApi m 1, rApi m 2 und/oder rApi m 3, weshalb deren Datensätze nicht für alle Auswertungen verwendet werden konnten.

Patientenkollektiv 3:

Der letzte Datensatz stammt von 102 Patienten mit einer anamnestisch vorliegenden anaphylaktischen Reaktion auf einen Bienenstich, deren sIgE-Reaktivitäten gegen Api m 1, Api m 2, Api m 5, Bienengift und MUXF3 (aus Bromelain) bestimmt worden sind. Hierbei sind für die serologische Diagnostik neben natürlichem nApi m1 rekombinantes rApi m1 aus Sf9- und Tni-Insektenzellen verwendet worden, außerdem mittels Sf9- und Tni-Insektenzellen hergestelltes rApi m 2 und mittels Sf9-Insektenzellen hergestelltes rApi m 5. Bei dem verwendeten CCD-Marker MUXF3 handelt es sich um das kommerziell erhältliche Präparat o214 der Firma Phadia (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden). Jedoch sind bei insgesamt 9 Patienten die Daten teils lückenhaft, weshalb diese Datensätze nur eingeschränkt für die Auswertung zur Verfügung standen.

3.2. Aufbereitung der Daten und statistische Analyse

Primär wurden die Daten in einer Übersichtstabelle (Microsoft Excel) gesammelt. Entsprechend der geplanten graphischen und/oder statistischen Auswertungen wurde anschließend die gesamte Übersichtstabelle oder einzelne Auszüge daraus zur Auswertung in IBM SPSS Statistics Version 21 bzw. in Sigma Plot Version 10.0, Systat Software GmbH, konvertiert. Für die statistische Auswertung wurden dem Wert < 0,1 kU/L der Wert 0,09 kU/L zugewiesen, dem Wert > 100 kU/L wurde der Wert 100 kU/L zugewiesen.

Zuerst erfolgte eine graphische Auswertung der vorliegenden Daten mit Sigma Plot. So wurden die Verteilungen der einzelnen Werte durch Boxplots dargestellt, zur Darstellung von prozentualen Werten wurden Tortendiagramme verwendet. Direkte Vergleiche von Wertepaaren wurden entweder durch Verbindung der jeweiligen Einzelwerte durch eine Gerade oder mittels übereinanderliegender Kurven dargestellt und ihre Differenzen wurden als Säulendiagramm abgebildet. Säulendiagramme dienten auch zur Darstellung von Patientenzahlen oder anderen absoluten Zahlenwerten. Die graphische Darstellung von Korrelationen erfolgte über Eintragung der Einzelwerte in das entsprechende Koordinatensystem, durch die anschließend eine von Sigma Plot berechnete Korrelationsgerade gezogen wurde.

Zur Signifikanzprüfung erfolgte dann die statistische Auswertung der Daten mittels SPSS. Zur Datenkorrelation wurden verschiedene statistische Tests eingesetzt. Zum Vergleich zweier qualitativer Parameter in Bezug auf ihre Häufigkeitsverteilung wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt. In zwei Fällen konnte aufgrund eines zu großen Datensets keine exakte Signifikanz mit SPSS berechnet werden, diese wurde dann stattdessen mittels Monte-Carlo-Methode geschätzt. Handelte es sich jedoch lediglich um eine 2x2-Kreuztabelle oder lagen die zu erwartenden Häufigkeiten zu oft unter 5, wurde stattdessen der exakte Test nach Fisher (Fisher-Exact-Test) angewendet, der auch bei kleineren Fallzahlen genaue Werte liefert. Bei zwei quantitativen, jedoch nicht normalverteilten Parametern erfolgte der Vergleich mittels U-Test nach Mann und Whitney (kurz: Mann-Whitney-U), wenn es sich um zwei unabhängige Stichproben handelte, oder mittels Wilcoxon-Test bei abhängigen Stichproben. Für die Korrelationsanalysen wurden – aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Variablen – die beiden Rangkorrelationskoeffizienten Kendalls Tau-b und Spearmans Rho herangezogen.

Als signifikant wurde für alle statistischen Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angesehen.

Außerdem wurden zur Beschreibung der Boxplots mittels SPSS deskriptive Werte wie Mittelwert, Minimum, Maximum, Median und Standardabweichung berechnet. Als Standard wurde auf zwei Stellen hinter dem Komma gerundet, bei sehr kleinen Werten wurden bei den Berechnungen mit SPSS drei Stellen hinter dem Komma angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der sIgE-Reaktivitäten von Hymenoptereingiftallergikern

4.1.1. Übersicht über die sIgE-Reaktivitäten

Um eine Übersicht über die Verteilung der sIgE-Reaktivitäten von Bienen- und Wespengiftallergikern sowie von doppelpositiv getesteten Patienten zu erhalten, wurden bei diesen drei Patientengruppen jeweils die Verteilungen ihrer ermittelten sIgE-Werte für Bienengift (Honey Bee Venom) und Wespengift (Yellow Jacket Venom) sowie für die Allergene Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4, Api m 5 und Ves v 3 mittels Boxplot dargestellt. Zudem wurden die Kenngrößen Minimum, Maximum, Median, Mittelwert, 05., 25., 75. und 95. Perzentile, Standardabweichung und Varianz berechnet. Insgesamt wurden hierfür 66 Patienten (Kollektiv 1) ausgewertet, das Kriterium für die Verteilung auf die einzelnen Gruppen war das Ergebnis bei den Testungen mit Bienen- und Wespengift, die jeweils ab einem Cutoff von 0,35 kU/L als positiv gewertet wurden. Insgesamt wiesen 40 Patienten Sensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift auf und jeweils 13 der Insektengiftallergiker aus dem Patientenkollektiv 1 waren lediglich gegen Bienen- oder Wespengift sensibilisiert.

Hierbei zeigten die Bienengiftallergiker (siehe Abb. 2) durchschnittlich die höchsten IgE-Werte bei Bienengift (Mittelwert 12,25 kU/L und Median 2,33 kU/L), Api m 1 (Mittelwert 9,85 kU/L und Median 1,77 kU/L) und Api m 2 (Mittelwert 12,74 kU/L und Median 0,62 kU/L). Der höchste IgE-Wert wurde bei Api m 2 mit 85,36 kU/L erreicht. Mittels Api m 4 wurden durchschnittlich nur wenig höhere IgE-Werte erzielt als bei Wespengift und Ves v 3, der Mittelwert lag mit 0,29 kU/L unterhalb des Cutoffs von 0,35 kU/L.

Bei den Wespengiftallergikern (siehe Abb. 3) zeigten sich entsprechend die höchsten Werte bei der Testung mit Wespengift (Mittelwert 6,80 kU/L und Median 2,00 kU/L). Bei der Testung mit Ves v 3 zeigten sich genau wie bei den Testungen mit Bienengift sowie mit den Allergenen Api m 1-5 durchschnittlich nur sehr geringe sIgE-Werte, die größtenteils unterhalb des Cutoffs von 0,35 kU/L lagen. Nur bei einem einzigen Wespengiftallergiker wurde für ein rekombinantes Bienengiftallergen ein Wert über dem Cutoff gemessen (Api m 2: 0,38 kU/L).

Auch der maximal bei der Testung mit Ves v 3 erreichte sIgE-Wert lag mit 0,55 kU/L nur knapp über dem Cutoff.

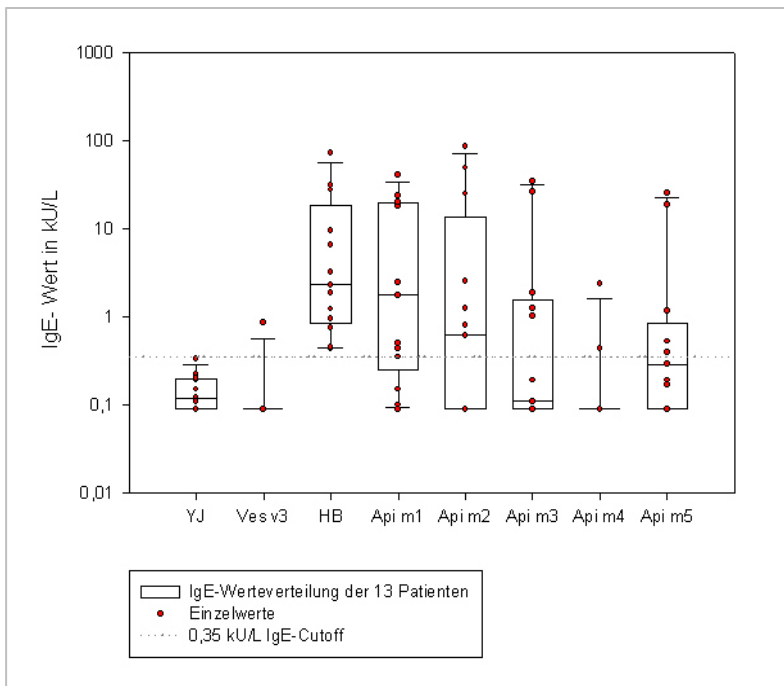


Abbildung 2:

IgE-Reaktivität von
Bienengiftallergikern
(Patientenkollektiv 1)

	YJ	Ves v3	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Maximum	,33	,87	72,70	41,27	85,36	34,70	2,38	25,40
Perzentil 95	,33	,87	72,70	41,27	85,36	34,70	2,38	25,40
Perzentil 75	,19	,09	9,48	18,81	2,55	1,24	,09	,53
Median	,12	,09	2,33	1,77	,62	,11	,09	,29
Perzentil 25	,09	,09	,96	,35	,09	,09	,09	,09
Perzentil 05	,09	,09	,44	,09	,09	,09	,09	,09
Minimum	,09	,09	,44	,09	,09	,09	,09	,09

	YJ	Ves v3	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Mittelwert	,151	,150	12,253	9,853	12,738	5,067	,293	3,676
Standardabweichung	,073	,217	20,917	13,264	26,225	11,412	,633	8,311
Varianz	,005	,047	437,515	175,937	687,731	130,245	,401	69,066

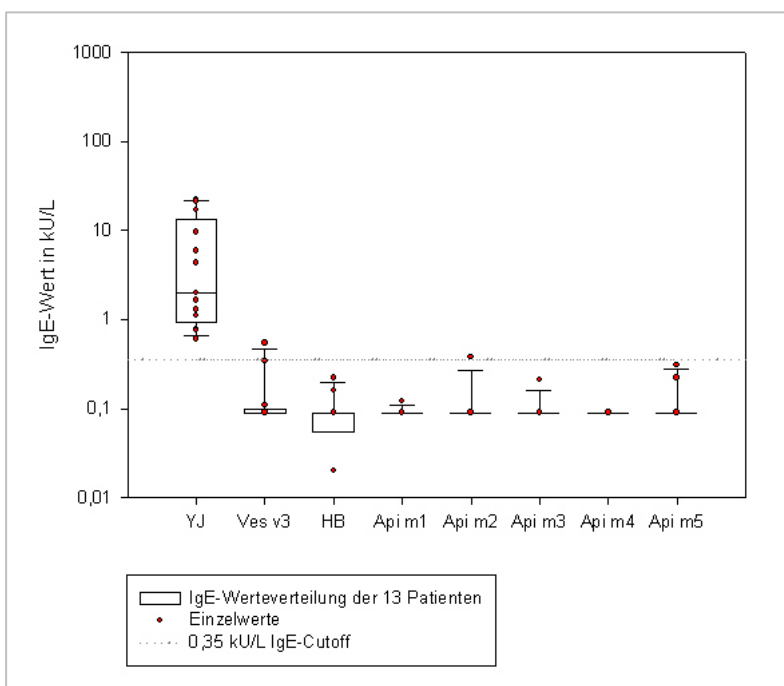


Abbildung 3:

IgE-Reaktivität von
Wespengiftallergikern
(Patientenkollektiv 1)

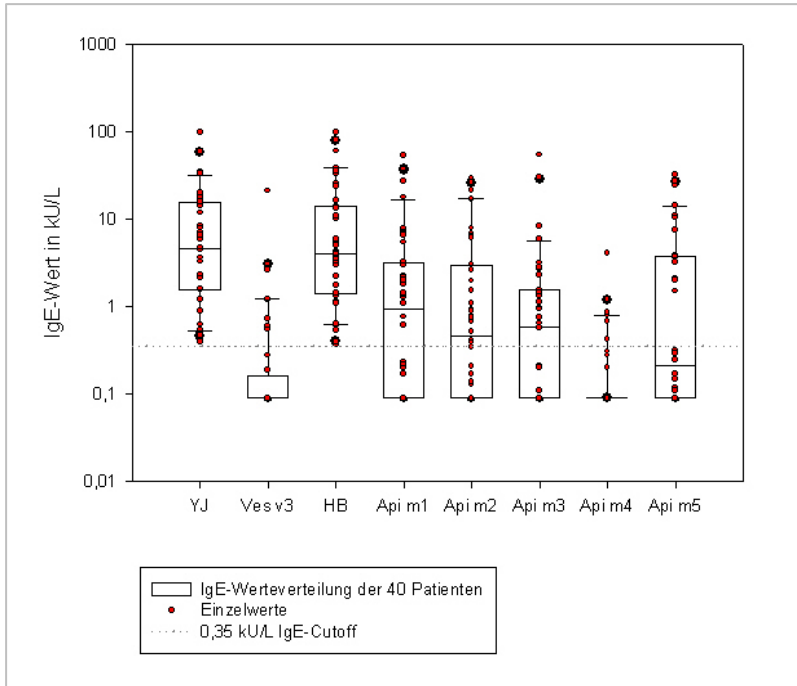
	YJ	Ves v3	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Maximum	22,10	,55	,22	,12	,38	,21	,09	,31
Perzentil 95	22,10	,55	,22	,12	,38	,21	,09	,31
Perzentil 75	9,61	,09	,09	,09	,09	,09	,09	,09
Median	2,00	,09	,09	,09	,09	,09	,09	,09
Perzentil 25	1,10	,09	,09	,09	,09	,09	,09	,09
Perzentil 05	,60	,09	,00	,09	,09	,09	,09	,09
Minimum	,60	,09	,00	,09	,09	,09	,09	,09

	YJ	Ves v3	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Mittelwert	6,797	,146	,086	,092	,112	,099	,09	,117
Standardabweichung	8,086	,139	,060	,008	,081	,034	,00	,068
Varianz	65,390	,019	,004	,000	,006	,001	,00	,005

Bei den doppelpositiven Patienten zeigte sich für die sIgE-Werte von Bienengift und den entsprechenden Allergenen eine ähnliche Verteilung wie bei den Bienengiftallergikern, ebenso zeigten die sIgE-Werte für Wespengift und Ves v 3 eine vergleichbare Verteilung wie bei den Wespengiftallergikern. Jedoch waren die sIgE-Werte für Bienen- bzw. Wespengift im Durchschnitt höher als bei den Patienten, die jeweils nur auf eines der beiden Insekten positiv getestet wurden. So lagen z.B. Mittelwert und Median der sIgE-Werte bei Testung mit Bienengift bei 13,61 bzw. 4,06 kU/L (bei den Bienengiftallergikern nur 12,25 bzw. 2,33 kU/L) und bei der Testung mit Wespengift bei 11,41 bzw. 4,62 kU/L (bei den Wespengiftallergikern nur 6,80 bzw. 2,00 kU/L). Gleiches galt für die Mittelwerte der sIgE-Messungen bei den Dipeptidylpeptidasen IV Ves v 3 (0,86 kU/L bei den Doppelpositiven und nur 0,15 kU/L bei den Wespengiftallergikern) und Api m 5 (4,06 bzw. 3,68 kU/L). Bei den meisten Allergenen des Bienengiftes zeigten jedoch die Bienengiftallergiker höhere Werte als die doppelpositiven Patienten: bei Api m 1 lag der Mittelwert der sIgE-Messung bei den Bienengiftallergikern bei 9,85 kU/L, bei den doppelpositiven Patienten nur bei 4,93 kU/L. Bei Api m 2 lagen die Mittelwerte bei 12,74 bzw. 3,94 kU/L, bei Api m 3 erzielten die Bienengiftallergiker einen Mittelwert von 5,07 kU/L und die doppelpositiven Patienten von 3,18 kU/L. Bei Api m 4 war kein Unterschied im Mittelwert festzustellen (beide bei 0,30 kU/L).

Abbildung 4:

IgE-Reaktivität von doppelpositiven Patienten (Patientenkollektiv 1)



	YJ	Ves v3	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Maximum	100,00	21,20	100,00	54,53	29,63	55,00	4,07	32,30
Perzentil 95	47,40	2,87	71,10	32,47	23,99	19,31	1,04	25,85
Perzentil 75	15,20	,14	13,95	3,14	2,89	1,55	,09	3,75
Median	4,62	,09	4,06	,94	,47	,59	,09	,21
Perzentil 25	1,59	,09	1,44	,09	,09	,09	,09	,09
Perzentil 05	,47	,09	,47	,09	,09	,09	,09	,09
Minimum	,40	,09	,37	,09	,09	,09	,09	,09

	YJ	Ves v3	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Mittelwert	11,413	,861	13,607	4,926	3,937	3,182	,292	4,059
Standardabweichung	18,669	3,362	22,266	11,065	7,558	9,728	,663	7,783
Varianz	348,517	11,305	495,792	122,438	57,123	94,633	,440	60,568

4.1.2. Gegenüberstellung von Bienengiftallergikern und Doppelpositiven

Zur näheren Untersuchung der oben beschriebenen Unterschiede bzgl. der Verteilung der sIgE-Reaktivitäten von Bienengiftallergikern und doppelpositiven Patienten aus dem Patientenkollektiv 1 wurde ein direkter Vergleich der gemessenen sIgE-Werte bei Testung der jeweiligen Patienten mit Bienengift und dem Hauptallergen Api m 1 durchgeführt. Zudem wurde noch bzgl. der Dipeptidylpeptidase IV Api m 5 verglichen, da hier im Gegensatz zu den anderen Allergenen bei den Doppelpositiven durchschnittlich höhere Werte festgestellt wurden.

Zur besseren Übersicht erfolgte zuerst die direkte graphische Gegenüberstellung der entsprechenden Boxplots, wodurch die Unterschiede bei Median und der Verteilung der Werte zwischen den reinen Bienengiftallergikern und den Doppelpositiven verdeutlicht werden konnten. Anschließend erfolgte die statistische Analyse der Unterschiede bei den Verteilungen

mittels Mann-Whitney-U-Test. Hierbei konnte jedoch weder für die Werteverteilung bei Testung mit Bienengift ($p = 0,491$) noch für die Testungen mit Api m 1 ($p = 0,160$) oder Api m 5 ($p = 0,929$) ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

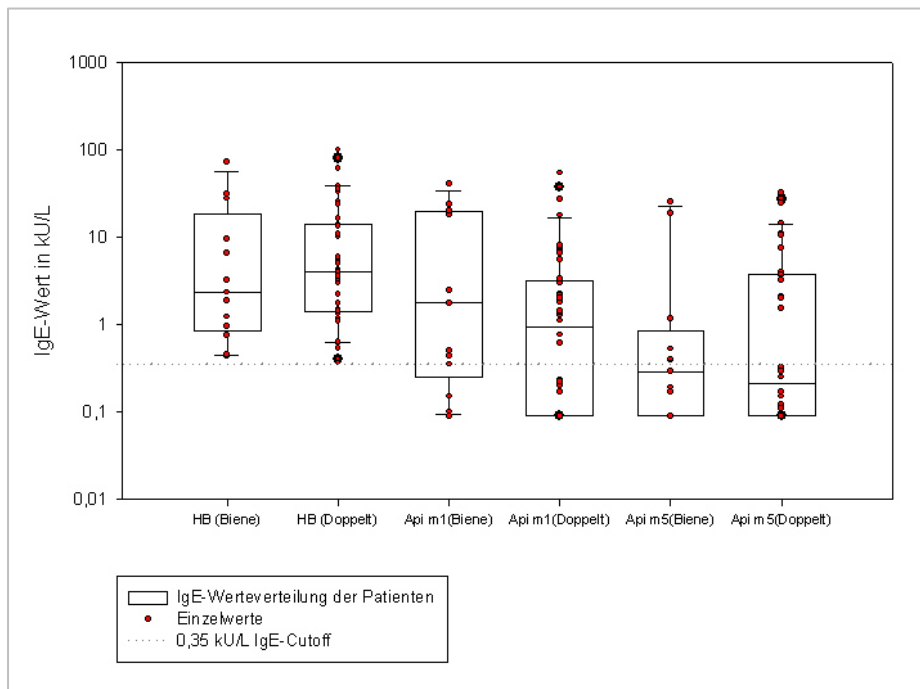


Abbildung 4:

Vergleich der IgE-Reaktivität von 13 Bienengiftallergikern mit der von 40 doppelpositiven Patienten (Patientenkollektiv 1)

Statistik für Test^a

	slgE HB-Venom
Mann-Whitney-U	226,000
Wilcoxon-W	317,000
Z	-,703
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,482
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,491
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,245
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004

Ränge

Allergietyp		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
slgE HB-Venom	Bienengiftallergiker	13	24,38	317,00
	Doppelpositive	40	27,85	1114,00
	Gesamt	53		

Statistik für Test^a

	slgE Api m 1
Mann-Whitney-U	192,000
Wilcoxon-W	1012,000
Z	-1,422
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,155
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,160
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,080
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,003

Ränge

Allergietyp		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
slgE Api m 1	Bienengiftallergiker	13	32,23	419,00
	Doppelpositive	40	25,30	1012,00
	Gesamt	53		

Statistik für Test^a

	slgE Api m 5
Mann-Whitney-U	255,500
Wilcoxon-W	1075,500
Z	-,096
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,924
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,929
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,462
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004

Ränge

Allergietyp		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
slgE Api m 5	Bienengiftallergiker	13	27,35	355,50
	Doppelpositive	40	26,89	1075,50
	Gesamt	53		

a. Gruppenvariable: Allergietyp

4.1.3. Gegenüberstellung von Wespengiftallergikern und Doppelpositiven

Die gleiche Analyse wurde mit den Verteilungen der sIgE-Werte der Testungen mit Wespengift und Ves v 3 bei den Wespengiftallergikern und doppelpositiven Patienten des Patientenkollektivs 1 durchgeführt.

Auch hier konnte trotz der in der graphischen Darstellung ersichtlichen verschiedenen Verteilungsmuster kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Werte für die Testung mit Wespengift lag die Irrtumswahrscheinlichkeit bei 0,557, beim Vergleich der Werte aus der Testung mit Ves v 3 bei 0,675.

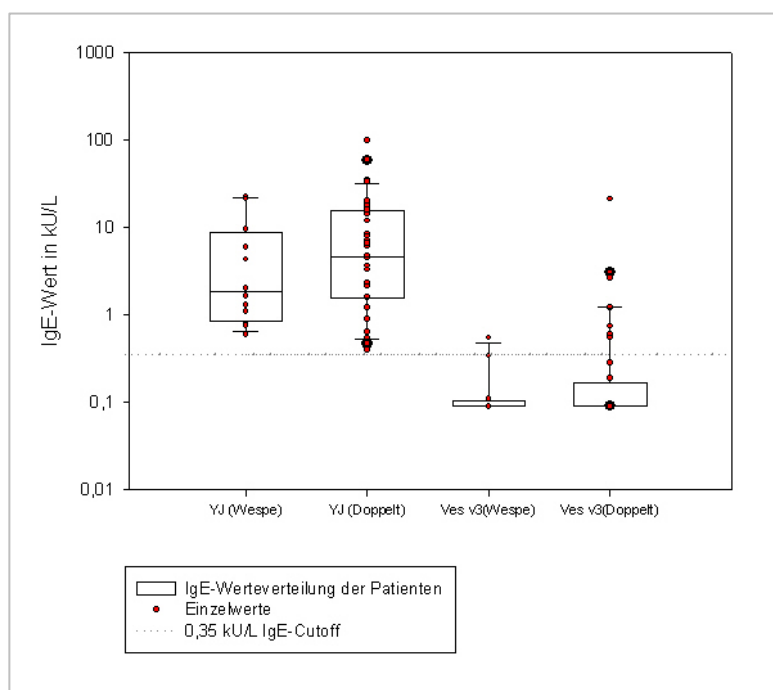


Abbildung 5:

Vergleich der IgE-Reaktivität von 13 Wespengiftallergikern mit der von 40 doppelpositiven Patienten (Patientenkollektiv 1)

Statistik für Test ^a		Ränge				
	slgE YJ-Venom		N	Mittlerer Rang	Rangsumme	
Mann-Whitney-U	231,000	slgE YJ-Venom	Wespengiftallergiker	13	24,77	322,00
Wilcoxon-W	322,000		Doppelpositive	40	27,73	1109,00
Z	-,600		Gesamt	53		
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,549	Statistik für Test ^a				
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,557		slgE Ves v 3			
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,278	Mann-Whitney-U	244,000			
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,003	Wilcoxon-W	335,000			
		Z	-,438			
		Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,661			
		Exakte Signifikanz (2-seitig)	,675			
		Exakte Signifikanz (1-seitig)	,326			
		Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004			

a. Gruppenvariable: Allergietyp

Ränge		Ränge			
	slgE Ves v 3		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
slgE Ves v 3	Wespengiftallergiker		13	25,77	335,00
	Doppelpositive		40	27,40	1096,00
	Gesamt		53		

a. Gruppenvariable: Allergietyp

4.2. Vergleich von einfach- und doppelpositiven Patienten in Bezug auf die Klasseneinteilung mittels verschiedener Testverfahren

Da im direkten Vergleich der sIgE-Reaktivitäten von Bienen- bzw. Wespengiftallergikern mit den doppelpositiv getesteten Patienten trotz der aufgefallenen Abweichungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, erfolgte anschließend ein erneuter Vergleich zwischen den jeweiligen Patientengruppen. Jedoch wurden hier nicht die absoluten sIgE-Werte, sondern lediglich ihre Zuordnung zu den standardisierten semiquantitativen IgE-Klassen berücksichtigt. Da eine solche Zuteilung zu festen Klassen gemäß der Reaktionsstärke auch bei der Durchführung und Auswertung von Hauttestungen (Prick- bzw. I.C.-Testung) angewendet wird, wurden die Patientengruppen auch bezüglich ihrer Reaktion bei einem durchgeführten Intrakutantest verglichen. Die Untersuchung wurde mit den unter 4.1. beschriebenen Patientengruppen aus dem Patientenkollektiv 1 durchgeführt, weshalb bei den gemäß ihrer sIgE-Werte doppelpositiven Patienten z.T. auch negative Ergebnisse bei dem Hauttest auftreten.

4.2.1. IgE-Klassenverteilung von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Bienengift (Honey Bee Venom)

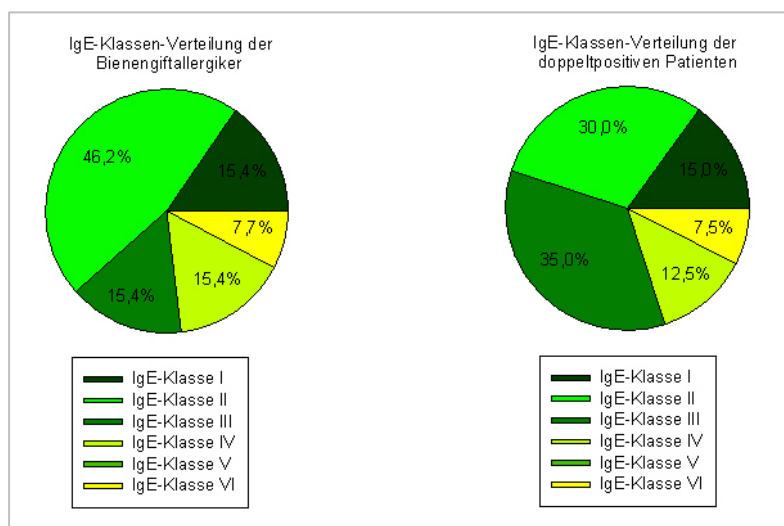


Abbildung 6:

Übersicht über die IgE-Klassenverteilung bei Testung mit Bienengift (13 Bienengiftallergiker und 40 doppelpositive Patienten aus Kollektiv 1)

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,068 ^a	4	,723	,779
Likelihood-Quotient	2,209	4	,697	,773
Exakter Test nach Fisher	2,449			,680
Anzahl der gültigen Fälle	53			

a. 6 Zellen (60,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,98.

Bei der Verteilung der Testergebnisse der serologischen Testung mit Bienengift auf die einzelnen IgE-Klassen findet sich bei den Bienengiftallergikern mit 46,2% ein deutlich höherer Prozentsatz mit einem Ergebnis der Klasse II. Im Gegensatz hierzu weisen bei den doppelpositiven Patienten mit 35,0% wesentlich mehr Patienten einen sIgE-Wert der Klasse III auf als bei den Bienengiftallergikern. Bei den anderen Klassen zeigen sich in der graphischen Darstellung keine relevanten Unterschiede. Jedoch konnte mittels Chi-Quadrat-Test kein signifikanter Unterschied in der Gesamtheit der Klassenverteilung nachgewiesen werden ($p = 0,779$). Da jedoch 60% der Zellen bei der Berechnung eine erwartete Häufigkeit kleiner 5 aufwiesen, wurde ergänzend noch ein Fisher-Exact-Test durchgeführt. Auch hiermit konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,680$).

4.2.2. IgE-Klassenverteilung von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Wespengift (Yellow Jacket Venom)

Analog zur oben aufgeführten Auswertung wurde der Vergleich der Klassenverteilung auch bei den Wespengiftallergikern und Doppelpositiven aus Patientenkollektiv 1 bei Testung mit Wespengift durchgeführt.

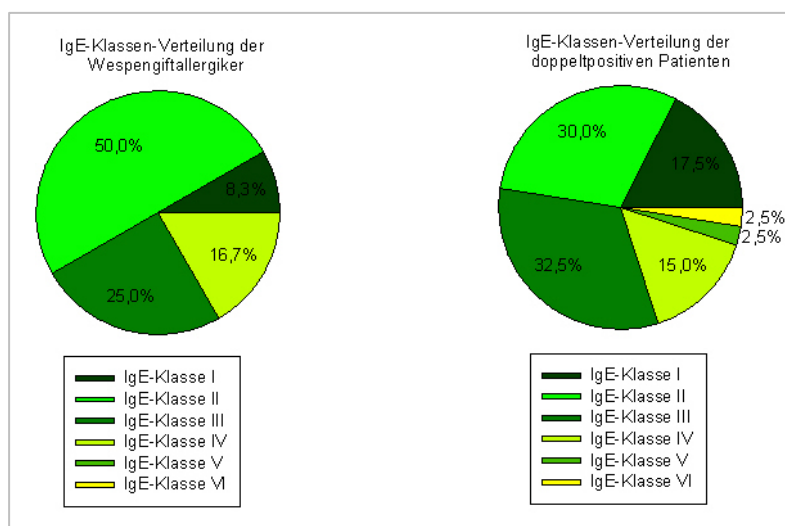


Abbildung 7:

Übersicht über die IgE-Klassenverteilung bei Testung mit Wespengift (13 Wespengiftallergiker und 40 doppelpositive Patienten aus Kollektiv 1)

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,356 ^a	5	,798	,811
Likelihood-Quotient	2,799	5	,731	,811
Exakter Test nach Fisher	2,552			,822
Anzahl der gültigen Fälle	52			

a. 8 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,23.

Auch hier wiesen die Wespengiftallergiker deutlich mehr sIgE-Werte der Klasse II als die doppelpositiv getesteten Patienten auf, bei diesen traten jedoch häufiger sIgE-Werte der Klasse I und III auf. Auch hier konnte jedoch weder mittels Chi-Quadrat-Test ($p = 0,811$) noch mittels des genaueren Tests nach Fisher ($p = 0,822$) ein signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden.

4.2.3. Vergleich der Intrakutantest-Ergebnisse von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Bienengift (Honey Bee Venom)

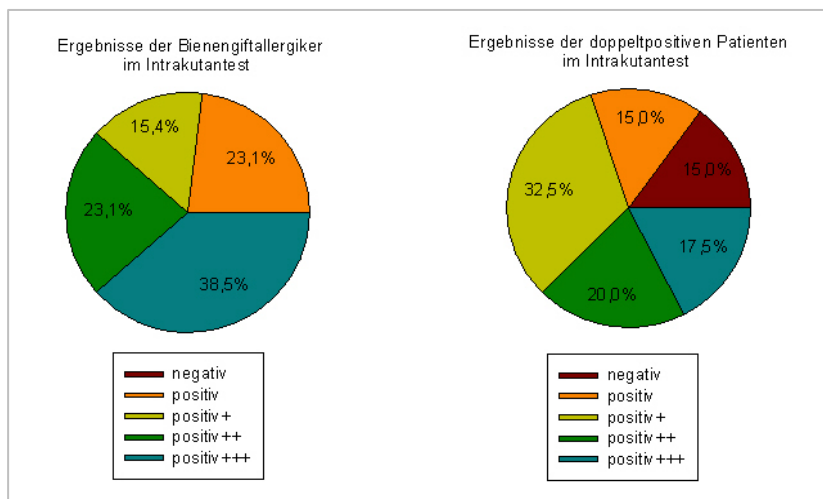


Abbildung 8:

Testergebnisse bei Durchführung eines Intrakutantests mit Bienengift (13 Bienengiftallergiker und 40 doppelpositive Patienten aus Kollektiv 1)

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,291 ^a	4	,259	,269
Likelihood-Quotient	6,623	4	,157	,225
Exakter Test nach Fisher	4,972			,279
Anzahl der gültigen Fälle	53			

a. 6 Zellen (60,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,47.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Intrakutantests von Bienengiftallergikern und doppelpositiven Patienten (siehe Abb. 9) ist in der graphischen Darstellung zu sehen, dass bei den reinen Bienengiftallergikern deutlich mehr Patienten (38,5% im Vergleich zu 17,5% bei den doppelpositiven Patienten) bereits eine positive Reaktion bei der höchsten Verdünnungsstufe ($0,0001 \mu\text{g/l} = \text{pos+++}$) aufweisen. Bei den in der sIgE-Testung doppelpositiven Patienten sind hingegen häufig positive Reaktionen erst bei einer Verdünnung von $0,01 \mu\text{g/l}$ (= pos+) nachzuweisen. Hinzu kommt, dass einige der mittels des serologischen Tests doppelpositiv bewerteten Patienten im Intrakutantest eine negative Reaktion aufweisen.

Auch dieser Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p = 0,269$ im Chi-Quadrat-Test bzw. $p = 0,279$ im Fisher-Exact-Test).

4.2.4. Vergleich der Intrakutantest-Ergebnisse von einfach- und doppelpositiven Patienten bei Testung mit Wespengift (Yellow Jacket Venom)

Analog wurden auch die Testergebnisse der Intrakutantests mit Wespengift in den verschiedenen Verdünnungsstufen der Wespengiftallergiker und der mittels sIgE-Testung doppelpositiv getesteten Patienten aus dem Patientenkollektiv 1 verglichen.

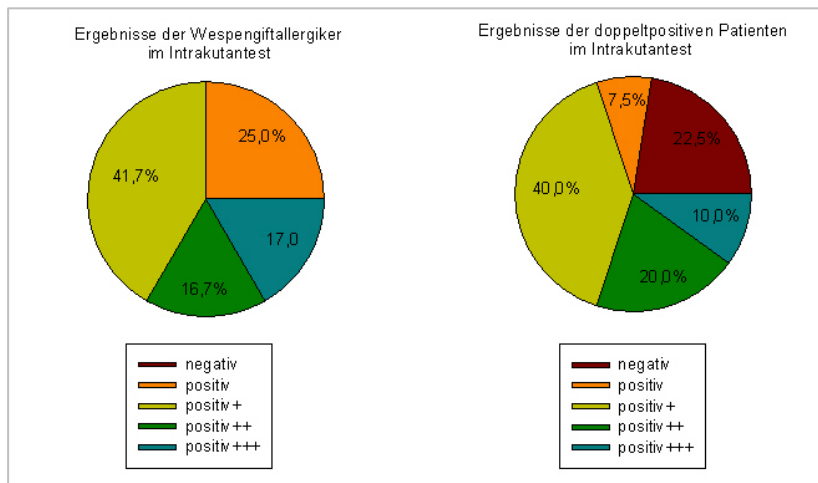


Abbildung 9:

Testergebnisse bei Durchführung eines Intrakutantests mit Wespengift (13 Wespengiftallergiker und 40 doppelpositive Patienten aus Kollektiv 1)

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,565 ^a	4	,234	,242
Likelihood-Quotient	7,165	4	,127	,194
Exakter Test nach Fisher	5,630			,203
Anzahl der gültigen Fälle	52			

a. 7 Zellen (70,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,38.

Hier zeigte sich in der graphischen Darstellung nur ein wesentlicher Unterschied in der Verteilung bzgl. der Patienten, die gerade noch bei der geringsten Verdünnung positiv reagierten (25,0% bei den Wespengiftallergikern gegen 7,5% bei den Doppelpositiven), und der Patienten, die im Hauttest negativ blieben (22,5%, nur bei den im sIgE-Test doppelpositiv bewerteten Patienten vorkommend). Jedoch konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientenkollektiven mittels Chi-Quadrat-Test ($p = 0,242$) oder mittels des genaueren Tests nach Fisher ($p = 0,203$) nachgewiesen werden.

4.3. Auswertung der doppelpositiven Testergebnisse

4.3.1. Allgemeines

Bei oben aufgeführtem Vergleich der unterschiedlichen Patientengruppen des Patientenkollektivs 1 bezüglich ihrer Sensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift, die mittels sIgE-Bestimmung im Serum festgestellt wurden, und der Auswertung der Ergebnisse im Hauttest fiel auf, dass viele der mittels sIgE-Bestimmung doppelpositiv getesteten Patienten im Hauttest entweder auf Bienengift (15,0%) oder auf Wespengift (22,5%) keine positive Reaktion zeigten. Insgesamt wiesen 15 der 40 mittels sIgE-Bestimmung gegen Bienen- und Wespengift doppelpositiv bewerteten Patienten im Hauttest keine Doppelpositivität auf. 13 dieser Patienten zeigten im entscheidenden sIgE-Test (sIgE-Test mit dem Gift, das im Hauttest negativ blieb) maximal eine Reaktion der Klasse II, nur bei zweien lag eine Reaktion der Klasse III vor. 11 dieser 15 Patienten hatten bei der Bestimmung des spezifischen sIgE-Wertes deutlich höhere Werte (mindestens eine IgE-Klasse höher) für das Gift erzielt, das auch später im Hauttest positiv getestet wurde. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob ein Teil der mittels sIgE-Bestimmung doppelpositiv getesteten Patienten lediglich eine Kreuzreaktion auf einzelne Allergene von Bienen- bzw. Wespengift aufweist und keine wirkliche Doppelsensibilisierung besteht. Aus diesem Grund erfolgte die nähere Untersuchung der doppelpositiven Patienten mit der Frage nach den Ursachen der Doppelpositivität und nach der Häufigkeit von Kreuzreaktionen. Da nicht für alle der oben beschriebenen 40 doppelpositiven Patienten sämtliche hierfür notwendigen Parameter bestimmt wurden, konnte die Untersuchung nur mit 34 dieser Patienten durchgeführt werden.

4.3.2. Häufigkeit von echten Doppelsensibilisierungen und Kreuzreaktionen

Unter den mittels des gesamten Bienen- und Wespengifts doppelpositiv getesteten Patienten wurden die Patienten als echt doppelsensibilisiert gewertet, die in den ergänzend durchgeführten serologischen Tests mit den Phadia-Produkten i208 (rApi m 1) und i209 (rVes v 5) in beiden Fällen bei einem Cutoff von 0,35 kU/L eine positive Reaktion aufwiesen. Dies kann damit begründet werden, dass sowohl rApi m 1 als auch rVes v 5 keine entsprechenden homologen Proteine im Gift des jeweils anderen Insekts besitzen und zudem keine CCDs aufweisen, die weitere falsch positive Ergebnisse verursachen könnten.

Bei den restlichen Patienten, die oben genanntes Kriterium für eine echte Doppeltsensibilisierung nicht aufwiesen, wurde nach anderen Ursachen für das doppelpositive Testergebnis gesucht. So wurde eine Kreuzreaktion auf die Dipeptidylpeptidase IV-Proteine Api m 5 und Ves v 3 angenommen, wenn der jeweilige Patient bei mindestens einem der beiden Allergene über dem Cutoff von 0,35 kU/L und bei dem zweiten mindestens über dem Cutoff von 0,1 kU/L lag. Bei den übrigen Patienten wurde eine Reaktion auf die Hyaluronidasen vermutet, wenn keines der bisher angeführten Kriterien zutraf und die sIgE-Bestimmung für Api m 2 mindestens 0,35 kU/L ergab. Die restlichen Patienten wurden dann noch bezüglich einer möglichen Reaktion auf die CCDs untersucht, hierbei war eine Differenz zwischen den sIgE-Werten bei Testung mit Api m 3, das einmal mittels Tni- (mit CCDs) und zum anderen mittels Sf9-Insektenzellen (ohne CCDs) hergestellt wurde, um mindestens eine IgE-Klasse entscheidend.

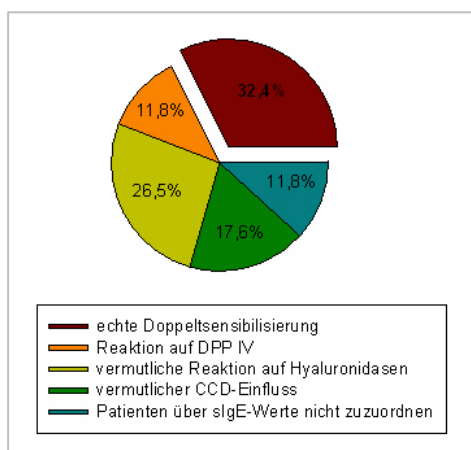


Abbildung 10:

34 sIgE-doppeltpositive Patienten (Kollektiv 1) - echte Doppeltsensibilisierung?

Bei den mittels sIgE-Bestimmung für Bienen- und Wespengift doppelpositiv getesteten Patienten des Patientenkollektivs 1 wiesen immerhin 32,4% eine echte Doppeltsensibilisierung auf, die mittels positiver Reaktion auf rApi m 1 und rVes v 5 nachgewiesen wurde. Bei insgesamt 55,9% konnte eine Kreuzreaktion nachgewiesen bzw. angenommen werden. 11,8% konnten über ihre sIgE-Werte keiner der beschriebenen Gruppen zugeordnet werden.

Da in den unter 4.2. durchgeführten Vergleichen auffiel, dass einige der mittels sIgE-Bestimmung doppelpositiven Patienten im durchgeführten Intrakutantest keine Doppeltpositivität aufwiesen, wurden anschließend noch jene Patienten separat untersucht, die sowohl mittels sIgE-Bestimmung als auch mittels Hauttest positiv auf beide Insektengifte getestet wurden, um zu sehen, ob die ergänzende Untersuchung mit dem Hauttest hilft, den Anteil an echt doppeltsensibilisierten Patienten an den doppelpositiv getesteten Patienten zu

erhöhen – also den Anteil an eigentlich fälschlicherweise doppelpositiv getesteten Patienten zu reduzieren.

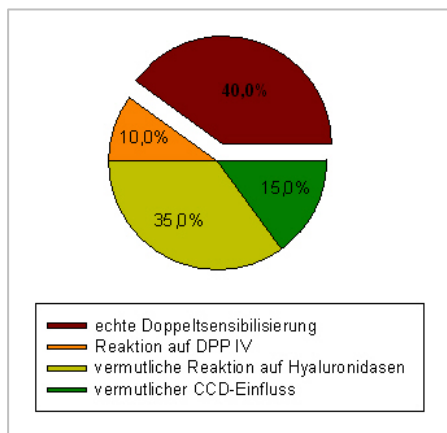


Abbildung 11:

20 sIgE- und Hauttest-doppelpositive Patienten (Kollektiv 1) - echte Doppelsensibilisierung?

Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den nur mittels sIgE-Bestimmung doppelpositiv getesteten Patienten ein mit 40,0% deutlich erhöhter Anteil an Patienten, die eine echte Doppelsensibilisierung aufweisen. Bei den restlichen 60,0% konnte eine Kreuzreaktion auf homologe Proteine oder CCDs als Ursache des doppelpositiven Testergebnisses nachgewiesen bzw. hinreichend angenommen werden. Patienten, die keiner dieser Gruppen zugeordnet werden konnten, kamen hier – im Gegensatz zur Auswertung der nur mittels sIgE-Bestimmung doppelpositiv bewerteten Patienten – nicht vor.

4.4. Genauigkeit der Allergietestung mit rekombinanten Allergenen

Nachdem immer mehr rekombinante Allergene für die Allergiediagnostik zur Verfügung stehen, stellt sich die Frage, ob eine reine Diagnostik über diese Allergene genauso viele wirkliche Allergiker erfasst – also positiv testet – wie die sIgE-Bestimmung mit dem gesamten Gift. Dies ist vor allem auch deshalb interessant, da die sIgE-Bestimmung mittels der Allergene im Gegensatz zu der mit dem Gesamtgift genauere Rückschlüsse über eine evtl. vorliegende Kreuzreaktion zulässt. Jedoch könnten bei einer reinen Diagnostik mittels der Einzelallergene Allergiker falsch negativ getestet werden. Untersucht wurden hierfür insgesamt 148 Bienengiftallergiker, die sowohl aus Kollektiv 1 (53 Patienten) als auch aus Kollektiv 2 (95 Patienten) rekrutiert wurden. Voraussetzung war eine nachgewiesene Sensibilisierung gegen

Bienengift (Honey Bee Venom; Cutoff 0,35 kU/L) sowie das Vorhandensein von sIgE-Bestimmungen für die Allergene Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4 und Api m 5.

4.4.1. Vergleich der Reaktionsstärken

Zuerst wurden die durchschnittlich erzielten sIgE-Werte in kU/L der Patienten bei der Testung mit dem Bienengift mit den Testungen der einzelnen Allergene verglichen.

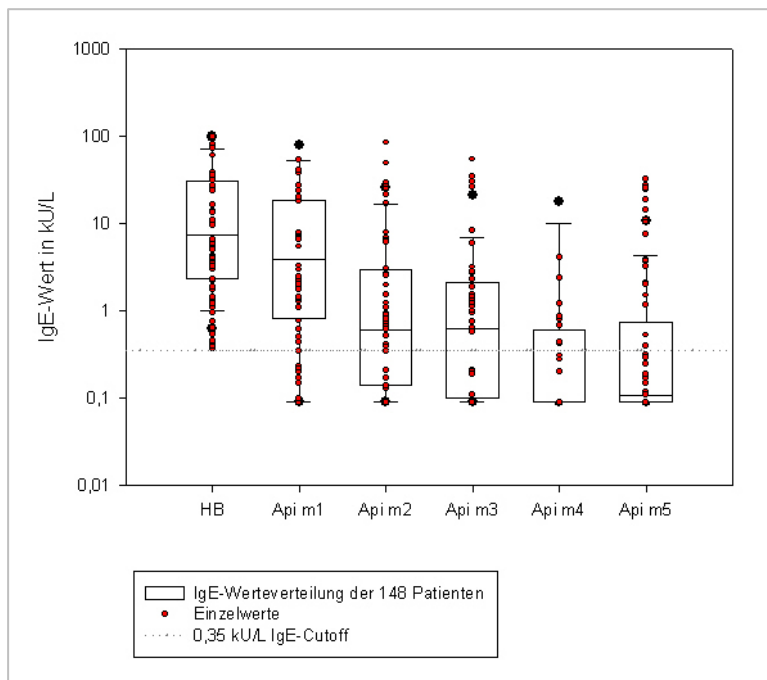


Abbildung 12:
Reaktion von 148 Bienengift-allergikern auf die einzelnen Allergene (Kollektiv 1+2)

	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Maximum	100,00	100,00	85,36	55,00	60,70	32,30
Perzentil 95	97,80	77,70	25,13	15,80	15,90	10,50
Perzentil 75	29,95	18,71	2,92	2,11	,55	,74
Median	7,48	3,89	,60	,62	,09	,11
Perzentil 25	2,44	,83	,14	,11	,09	,09
Perzentil 05	,64	,09	,09	,09	,09	,09
Minimum	,37	,00	,00	,09	,09	,09

	HB	Api m1	Api m2	Api m3	Api m4	Api m5
Mittelwert	21,323	14,622	4,689	3,140	3,016	1,871
Standardabweichung	28,002	23,816	11,818	7,858	9,309	5,089
Varianz	784,135	567,201	139,656	61,748	86,658	25,896

Bereits in der Übersicht mittels Boxplots war zu sehen, dass bei der Testung mit dem Bienengift (HB) durchschnittlich die höchsten sIgE-Werte erzielt wurden. Nur knapp dahinter lagen die Werte für das Hauptallergen Api m 1, während die IgE-Werte für Api m 4 und Api m 5 sogar zu über der Hälfte (Median: 0,11 kU/L) unterhalb des Cutoffs von 0,35 kU/L lagen.

Statistik für Test^a

	HB - Api m1	HB - Api m2	HB - Api m3	HB - Api m4	HB - Api m5
Z	-9,355 ^b	-9,330 ^b	-10,092 ^b	-9,541 ^b	-9,428 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000	,000	,000

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf negativen Rängen.

Statistik für Test^a

	Api m1 - Api m2	Api m1 - Api m3	Api m1 - Api m4	Api m1 - Api m5
Z	-6,746 ^b	-7,758 ^b	-8,109 ^b	-8,068 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000	,000

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf negativen Rängen.

Statistik für Test^a

	Api m2 - Api m3	Api m2 - Api m4	Api m2 - Api m5	Api m3 - Api m4	Api m3 - Api m5	Api m4 - Api m5
Z	-,730 ^b	-4,718 ^b	-5,072 ^b	-3,972 ^b	-4,794 ^b	-,500 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,465	,000	,000	,000	,000	,617

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf negativen Rängen.

c. Basiert auf positiven Rängen.

In den ergänzend durchgeführten statistischen Berechnungen wurde mittels Wilcoxon-Test gezeigt, dass die für die einzelnen Allergen gemessenen sIgE-Werte in allen Fällen durchschnittlich signifikant niedriger ausfallen als die sIgE-Werte der Testung mit dem Bienengift ($p = 0,000$ bei allen Vergleichen). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass bei der Testung mit dem Hauptallergen Api m 1 signifikant höhere sIgE-Werte als bei den Testungen mit den übrigen Allergenen erzielt werden ($p = 0,000$ in allen Fällen). Zwischen den durchschnittlich erzielten sIgE-Werten bei Testung mit Api m 2 und Api m 3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,465$), ebenso zwischen den für die Allergene Api m 4 und Api m 5 gemessenen Werten ($p = 0,617$). Jedoch lagen die durchschnittlichen sIgE-Werte bei den Testungen mit Api m 4 und Api m 5 signifikant unterhalb der Werte bei den Testungen mit Api m 2 und Api m 3 ($p = 0,000$). Dies spiegelte sich auch in der Untersuchung der Differenzen zwischen den bei der Testung mit Bienengift und den bei Testung mit den einzelnen Allergenen gemessenen sIgE-Werten wieder.

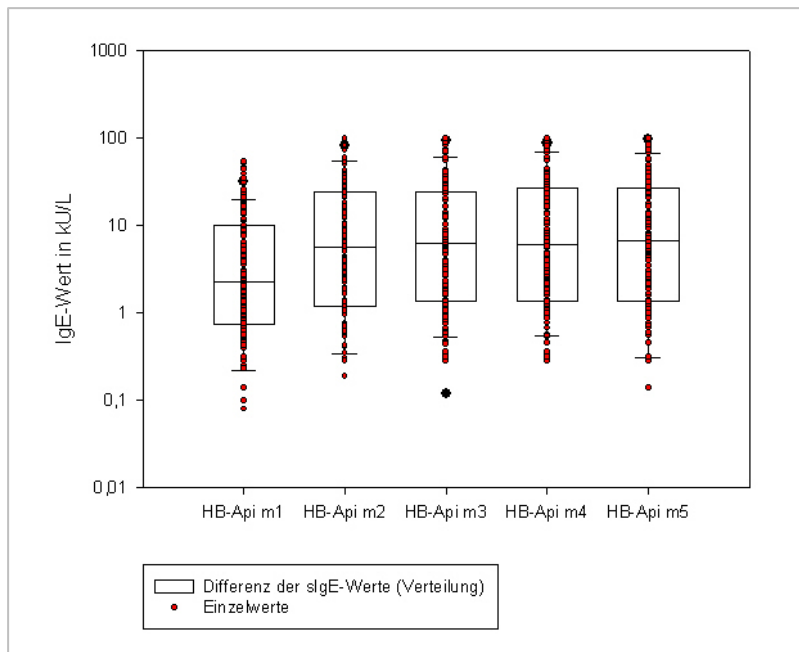


Abbildung 13:

Vergleich der sIgE-Reaktion auf Bienengift mit der auf einzelne Allergene bei 148 Bienengift-allergikern (Kollektiv 1+2)

	HB-Api m1	HB-Api m2	HB-Api m3	HB-Api m4	HB-Api m5
Maximum	54,19	99,87	99,91	99,91	99,91
Perzentil 95	31,31	82,20	88,80	85,20	96,71
Perzentil 75	9,85	24,08	24,69	26,38	27,22
Median	2,26	5,62	6,20	6,04	6,79
Perzentil 25	,74	1,22	1,36	1,37	1,36
Perzentil 05	-,20	-1,01	,28	,28	-2,54
Minimum	-31,79	-75,88	-25,22	-29,10	-17,67

	HB-Api m1	HB-Api m2	HB-Api m3	HB-Api m4	HB-Api m5
Mittelwert	6,701	16,634	18,182	18,307	19,452
Standardabweichung	11,239	26,780	26,550	27,546	27,960
Varianz	126,313	717,188	704,904	758,765	781,781

Der graphisch bereits gut sichtbare Unterschied zwischen der Differenz der sIgE-Werte von Bienengift und Api m 1 und den Differenzen der sIgE-Werte von Bienengift und den anderen Allergenen konnte auch mittels Wilcoxon-Test bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass der Unterschied der sIgE-Werte von Api m 1 und Bienengift signifikant geringer ist als bei den übrigen Allergenen ($p = 0,000$).

	Differenz Api m1 zu HB - Differenz Api m2 zu HB	Differenz Api m1 zu HB - Differenz Api m3 zu HB	Differenz Api m1 zu HB - Differenz Api m4 zu HB	Differenz Api m1 zu HB - Differenz Api m5 zu HB
Z	-6,744 ^b	-7,761 ^b	-8,110 ^b	-8,069 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000	,000

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf positiven Rängen.

Ergänzend durchgeführte Berechnungen mittels Wilcoxon-Test zeigten zudem – entsprechend zu den oben aufgeführten Ergebnissen – deutlich geringere Differenzen zwischen den sIgE-Werten von Api m 2 bzw. Api m 3 und Bienengift als beim Vergleich Api m 4 bzw. Api m 5

und Bienengift ($p = 0,000$). Die durchschnittlichen sIgE-Werte von Api m 2 und Api m 3 unterschieden sich bezüglich ihrer Differenz zu den sIgE-Werten bei der Testung mit Bienengift nicht signifikant ($p = 0,466$), ebenso wiesen auch die sIgE-Werte bei den serologischen Testungen mit Api m 4 und Api m 5 keinen diesbezüglichen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,623$).

Statistik für Test^a

	Differenz Api m2 zu HB - Differenz Api m3 zu HB	Differenz Api m2 zu HB - Differenz Api m4 zu HB	Differenz Api m2 zu HB - Differenz Api m5 zu HB	Differenz Api m3 zu HB - Differenz Api m4 zu HB	Differenz Api m3 zu HB - Differenz Api m5 zu HB	Differenz Api m4 zu HB - Differenz Api m5 zu HB
Z	-,729 ^b	-4,720 ^b	-5,072 ^b	-3,972 ^b	-4,790 ^b	-,492 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,466	,000	,000	,000	,000	,623

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf positiven Rängen.

c. Basiert auf negativen Rängen.

Insgesamt zeigte sich, dass die Testung mit Api m 1 von allen Einzelallergenen in Bezug auf die erzielten sIgE-Werte am nächsten an die Ergebnisse einer Testung mit dem kompletten Bienengift kommt. Um aber zu klären, ob die reine Testung mit dem Hauptallergen Api m 1 bzw. eine Testung mit allen Einzelallergenen mit einer ähnlichen Sensitivität die Bienengiftallergiker erfasst wie die Testung mit Bienengift selbst, ist eine Untersuchung der Gesamtzahl der mittels dieser Testungen erfassten Bienengiftallergiker notwendig.

4.4.2. Anteil der von rekombinanten Allergenen erfassten Allergikern

Anhand der 148 Patienten aus den Patientenkollektiven 1 und 2, die positiv auf Bienengift (sIgE-Wert von mindestens 0,35 kU/L) getestet wurden, wurde untersucht, wie viele dieser Patienten durch eine Testung mit den rekombinanten Allergenen Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4 und Api m 5 erfasst werden. Auch bei der Testung mit den rekombinanten Allergenen war ein Cutoff von 0,35 kU/L für ein als positiv gewertetes Ergebnis angewandt worden. Verwendet wurden die Daten von 108 Patienten mit Monosensibilisierung gegen Bienengift und von 40 Patienten mit einer Allergie gegen Bienen- und Wespengift.

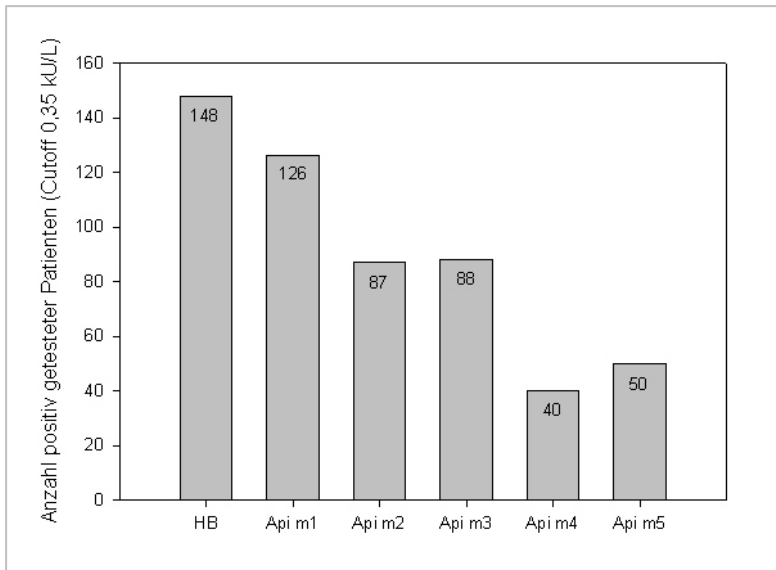


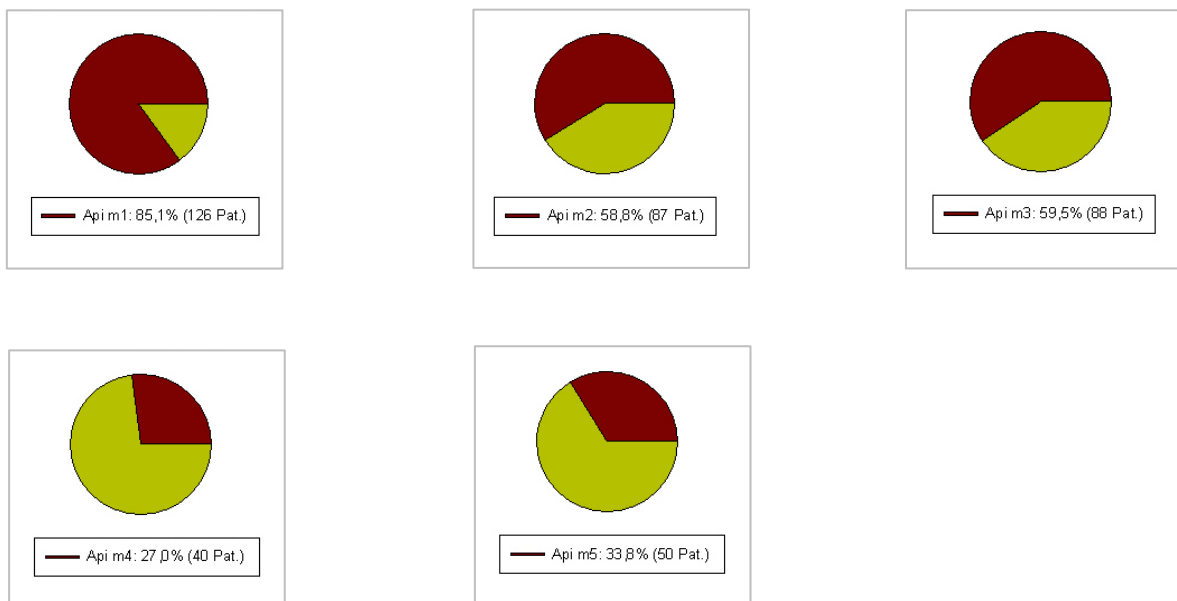
Abbildung 14:

Testung von 148 Bienengiftallergikern mit rekombinanten Bienengiftallergenen (Kollektiv 1+2)

Von 148 Bienengiftallergikern wurden durch Api m 1 die meisten Patienten erfasst. Eine Reaktion auf Api m 4 zeigte sich bei den wenigsten Patienten. Nur wenige mehr wurden durch eine Testung mit Api m 5 als positiv gewertet. Durch die Allergene Api m 2 und Api m 3 wurden immerhin jeweils etwas über die Hälfte der Patienten positiv getestet.

Abbildung 15:

Prozentualer Anteil der mittels Einzelallergenen erfassten Bienengiftallergiker (ges. 148 Pat. aus Kollektiv 1+2)



Anhand beider Graphiken zeigt sich eindeutig, dass Api m 1 als Hauptallergen mit Abstand den größten Teil der Bienengiftallergiker erfasst (126 von 148 Patienten, insgesamt 85,1%).

durchgeführter IgE-Test * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
durchgeführter IgE-Test	Api m1	Anzahl	22	126	148
		Erwartete Anzahl	11,0	137,0	148,0
	nat. Venom	Anzahl	0	148	148
		Erwartete Anzahl	11,0	137,0	148,0
Gesamt		Anzahl	22	274	296
		Erwartete Anzahl	22,0	274,0	296,0

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	23,766 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	21,655	1	,000		
Likelihood-Quotient	32,267	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	296				

- a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 11,00.
 b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Jedoch zeigte die statistische Berechnung mittels Chi-Quadrat-Test bzw. exaktem Test nach Fisher eindeutig, dass ein signifikanter Unterschied ($p = 0,000$) zwischen der Testung mit Api m 1 und der mit Bienengiftextrakt besteht. Aus diesem Grund wurde anschließend noch untersucht, mit wie vielen weiteren einzelnen Allergenen noch zusätzlich getestet werden muss, um keinen signifikanten Unterschied mehr zur Testung mit dem reinen Bienengift zu haben.

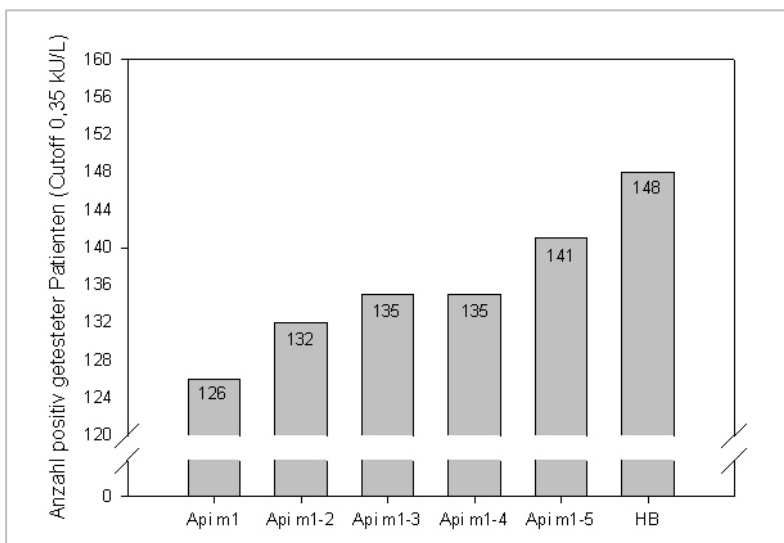


Abbildung 16:

Anteil der durch eine Testung mit einem oder mehreren Allergenen erfassten Bienengiftallergiker (Cutoff 0,35 kU/L);

gesamt 148 Patienten aus Kollektiv 1+2

Hier zeigte sich, dass sich durch eine Testung mit allen fünf Einzelallergenen der Anteil an positiv getesteten Bienengiftallergikern bei einem Cutoff von 0,35 kU/L von 85,1% bei der Testung nur mit Api m 1 auf 95,3% (insgesamt 141 der 148 Bienengiftallergiker) erhöhen lässt.

Jedoch wurden auch durch die Testung mit allen fünf einzelnen Allergenen noch signifikant weniger Bienengiftallergiker positiv getestet als mit dem Bienengift selbst ($p = 0,015$).

durchgeführter IgE-Test * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
durchgeführter IgE-Test	Api m1-5	Anzahl	7	141	148
		Erwartete Anzahl	3,5	144,5	148,0
	nat. Venom	Anzahl	0	148	148
		Erwartete Anzahl	3,5	144,5	148,0
Gesamt		Anzahl	7	289	296
		Erwartete Anzahl	7,0	289,0	296,0

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	7,170 ^a	1	,007	,015	,007
Kontinuitätskorrektur ^b	5,267	1	,022		
Likelihood-Quotient	9,874	1	,002	,015	,007
Exakter Test nach Fisher				,015	,007
Anzahl der gültigen Fälle	296				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Es stellt sich noch die Frage, ob sich dies bei der Anwendung eines Cutoffs von 0,1 kU/L genauso verhält oder ob in diesem Fall ausreichend Patienten durch die Allergendiagnostik erfasst werden, sodass kein signifikanter Unterschied zur Testung mit Bienengift mehr besteht. Bei Anwendung des Cutoffs von 0,1 kU/L für die Testung mit den rekombinanten Allergenen zeigen sich im gleichen Patientenkollektiv (Kriterium für die Bewertung als Bienengiftallergiker bleibt weiterhin ein sIgE-Wert von min. 0,35 kU/L bei Testung mit dem natürlichen Bienengiftextrakt) folgende Ergebnisse:

Durch die alleinige Testung mit Api m 1 werden bereits 88,7% (133 von 148) der Bienengiftallergiker erfasst. Bei ergänzender Diagnostik mit Api m 2 werden bei einem Cutoff von 0,1 kU/L 94,0% (141 von 148) erfasst, bei Testung mit allen fünf Einzelallergenen kann der Anteil an positiv getesteten Bienengiftallergikern auf 97,3% (146 von 148) gesteigert werden und liegt somit etwas über dem Wert bei Anwendung des Cutoffs von 0,35 kU/L (95,3%, 141 der 148 Patienten).

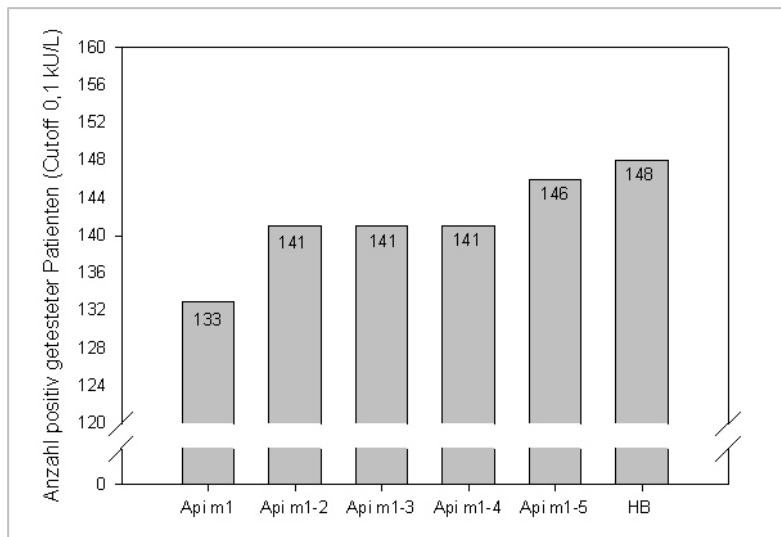


Abbildung 17:

Anteil der durch eine Testung mit einem oder mehreren Allergenen erfassten Bienengiftallergikern (Cutoff 0,1 kU/L);

gesamt 148 Patienten aus Kollektiv 1+2

durchgeführter IgE-Test * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
durchgeführter IgE-Test	Api m1	Anzahl	15	133	148
		Erwartete Anzahl	7,5	140,5	148,0
nat. Venom		Anzahl	0	148	148
		Erwartete Anzahl	7,5	140,5	148,0
Gesamt		Anzahl	15	281	296
		Erwartete Anzahl	15,0	281,0	296,0

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	15,801 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	13,764	1	,000		
Likelihood-Quotient	21,596	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	296				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 7,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

durchgeführter IgE-Test * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
durchgeführter IgE-Test	Api m1-2	Anzahl	7	141	148
		Erwartete Anzahl	3,5	144,5	148,0
nat. Venom		Anzahl	0	148	148
		Erwartete Anzahl	3,5	144,5	148,0
Gesamt		Anzahl	7	289	296
		Erwartete Anzahl	7,0	289,0	296,0

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	7,170 ^a	1	,007	,015	,007
Kontinuitätskorrektur ^b	5,267	1	,022		
Likelihood-Quotient	9,874	1	,002	,015	,007
Exakter Test nach Fisher				,015	,007
Anzahl der gültigen Fälle	296				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

durchgeführter IgE-Test * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
durchgeführter IgE-Test	Api m1-5	Anzahl	2	146	148
		Erwartete Anzahl	1,0	147,0	148,0
nat. Venom		Anzahl	0	148	148
		Erwartete Anzahl	1,0	147,0	148,0
Gesamt		Anzahl	2	294	296
		Erwartete Anzahl	2,0	294,0	296,0

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,014 ^a	1	,156	,498	,249
Kontinuitätskorrektur ^b	,503	1	,478		
Likelihood-Quotient	2,786	1	,095	,498	,249
Exakter Test nach Fisher				,498	,249
Anzahl der gültigen Fälle	296				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Jedoch genügt auch hier die alleinige Testung der Patienten mit Api m 1 nicht aus, um vergleichbare Ergebnisse wie bei der Testung mit Bienengift zu erreichen. Auch eine Testung mit Api m 1 und Api m 2 zeigte sich als nicht ausreichen. Es konnte noch immer ein signifikanter Unterschied mittels Fisher-Exact-Test nachgewiesen werden ($p = 0,015$). Erst bei Anwendung aller fünf Einzelallergene zusammen konnte ein mit der sIgE-Bestimmung gegen Bienengift vergleichbares Ergebnis erzielt werden, hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Testverfahren mehr nachgewiesen werden ($p = 0,498$).

4.5. Untersuchung des Einflusses von kreuzreaktiven Kohlenhydratseitenketten (cross-reactive carbohydrate determinants, CCDs) auf das Testergebnis

Die IgE-Reaktivität von Patienten gegenüber den kreuzreaktiven Kohlenhydratseitenketten (CCDs) kann gerade bei der Bewertung von doppelt positiv getesteten Patienten eine wesentliche Rolle spielen und auch diagnostische Lücken in der Komponentendiagnostik mit CCD-freien rekombinanten Allergenen erklären. Die Voraussetzung ist jedoch eine genaue Kenntnis über ihren Einfluss bei der Testung mit dem Gesamtextrakt und mit einzelnen Allergenen. Dies kann zum einen über den Vergleich der IgE-Reaktivitäten von verschiedenen gewonnenen Allergenen mit der IgE-Reaktivität bei Verwendung des Gesamtextraktes geschehen, zum anderen durch die Verwendung von CCD-Markern.

4.5.1. Vergleich der IgE-Reaktivitäten von verschiedenen gewonnenen Allergenen

In diesem Zusammenhang erfolgte eine Untersuchung aller Patienten aus dem Kollektiv 3, die neben der eindeutigen Anamnese für eine anaphylaktische Reaktion nach einem Bienenstich auch spezifische IgE-Werte von mindestens 0,35 KU/L für den Bienengiftextrakt aufwiesen. Bei ihnen wurden die IgE-Reaktivitäten bei Testung mit natürlichem Api m 1 (nApi m 1) sowie rekombinant hergestelltem Api m 1 (rApi m 1) und die so erreichte Sensitivität der jeweiligen Testung miteinander verglichen. Bei dem rekombinant hergestellten Api m 1 wurden zudem bei der Auswertung zwei verschiedene Produkte verglichen. Es handelte sich um glykosyliertes rApi m 1, das entweder in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) oder in *Trichoplusia ni* (Tni) Insektenzellen hergestellt wurde, wobei das Sf9-Präparat keine CCDs enthält, während diese im Tni-Präparat enthalten sind.

Untersucht wurden bei insgesamt 83 Patienten Unterschiede im Hinblick auf die absolut erzielten sIgE-Werte, die Gesamtzahl an positiv getesteten Patienten und die Verteilung der Reaktionsstärken gemessen an den aufgetretenen IgE-Klassen.

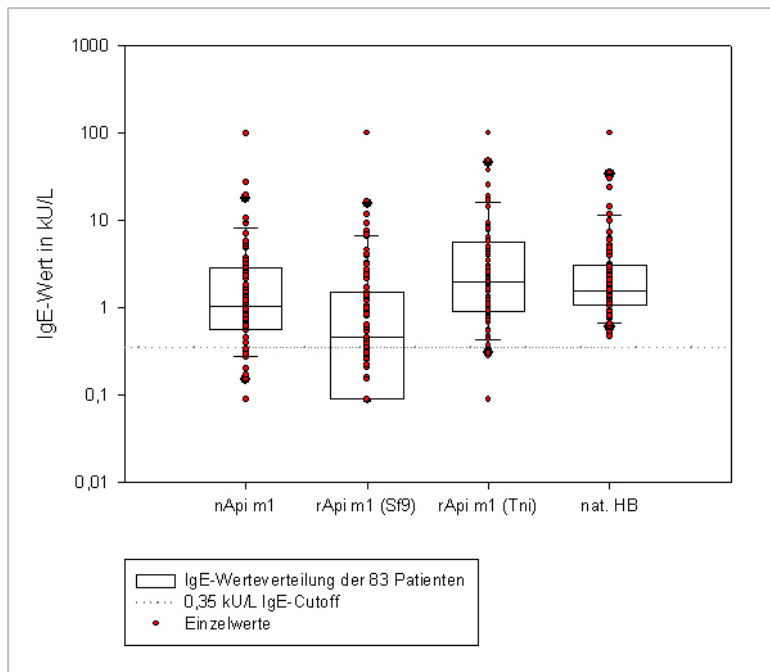


Abbildung 18:

Vergleich der sIgE-Werte von verschieden hergestelltem Api m 1 und dem natürlichen Bienengift anhand von 83 Bienengiftallergikern aus dem Patientenkollektiv 3

	nApi m 1	rApi m 1 (Sf9)	rApi m 1 (Tni)	nat. HB-Venom
Maximum	100,00	100,00	100,00	100,00
Perzentil 95	10,70	11,60	37,70	30,50
Perzentil 75	2,87	1,51	5,67	3,10
Median	1,04	,46	1,95	1,55
Perzentil 25	,56	,09	,92	1,07
Perzentil 05	,16	,09	,35	,61
Minimum	,09	,09	,09	,47

	nApi m 1	rApi m 1 (Sf9)	rApi m 1 (Tni)	nat. HB-Venom
Mittelwert	4,77	5,04	8,03	6,99
Standardabweichung	15,55	18,70	19,47	19,04
Varianz	241,95	349,52	379,11	362,42

In der graphischen Darstellung ist bereits deutlich zu sehen, dass bei der Testung der Patienten mit rApi m 1, das in Tni-Insektenzellen hergestellt wurde und daher CCDs enthält, und mit dem vollständigen Bienengiftextrakt im Durchschnitt (Mittelwerte 8,03 bzw. 6,99 kU/L) die höheren sIgE-Werte erzielt werden als bei Testung mit nApi m 1 oder rApi m 1 aus Sf9-Insektenzellen (Mittelwerte 4,77 bzw. 5,04 kU/L). Dies wird bei Betrachtung der Werteverteilung noch eindeutiger. So liegen 75% der gemessenen sIgE-Werte bei Testung mit rApi m 1 (Sf9) bei maximal 1,51 kU/L, während bei der Messung mit rApi m 1 (Tni) 25% der Werte über 5,67 kU/L liegen.

Durch die statistische Auswertung (Wilcoxon-Test) der in der graphischen Darstellung sichtbaren Unterschiede zwischen den Testergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass bei sIgE-Bestimmung mittels des natürlichen Bienengifts signifikant höhere Werte auftreten als bei der sIgE-Bestimmung mittels nApi m 1 ($p = 0,000$) oder rApi m 1 aus Sf9-Insektenzellen ($p = 0,000$). Zwischen der Testung mit natürlichem Bienengift und dem CCD-haltigen rApi m 1 aus Tni-Insektenzellen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,594$). Beim direkten Vergleich der verschiedenen Api m 1-Präparate untereinander traten bei den

IgE-Wertbestimmungen mit nApi m 1 und rApi m 1 (Sf9) signifikant niedrigere Werte auf als bei Testung mit rApi m 1 (Tni) ($p = 0,000$ in beiden Fällen). Die Testung mit rApi m 1 (Sf9) zeigte zudem signifikant niedrigere Werte als die Testung mit nApi m 1 ($p = 0,001$).

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
nat. HB-Venom - nApi m 1	Negative Ränge	18 ^a	32,83	591,00
	Positive Ränge	64 ^b	43,94	2812,00
	Bindungen	1 ^c		
	Gesamt	83		
nat. HB-Venom - rApi m 1 (Sf9)	Negative Ränge	4 ^d	40,50	162,00
	Positive Ränge	76 ^e	40,50	3078,00
	Bindungen	3 ^f		
	Gesamt	83		
nat. HB-Venom - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	35 ^g	49,49	1732,00
	Positive Ränge	45 ^h	33,51	1508,00
	Bindungen	3 ⁱ		
	Gesamt	83		

Statistik für Test ^a			
	nat. HB-Venom - nApi m 1	nat. HB-Venom - rApi m 1 (Sf9)	nat. HB-Venom - rApi m 1 (Tni)
Z	-5,134 ^b	-6,993 ^b	-,537 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,591
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,594
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000	,297
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000	,001

a. Wilcoxon-Test

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
nApi m 1 - rApi m 1 (Sf9)	Negative Ränge	31 ^a	32,03	993,00
	Positive Ränge	50 ^b	46,56	2328,00
	Bindungen	2 ^c		
	Gesamt	83		
nApi m 1 - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	71 ^d	42,56	3021,50
	Positive Ränge	10 ^e	29,95	299,50
	Bindungen	2 ^f		
	Gesamt	83		
rApi m 1 (Sf9) - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	75 ^g	40,23	3017,00
	Positive Ränge	3 ^h	21,33	64,00
	Bindungen	5 ⁱ		
	Gesamt	83		

Statistik für Test ^a			
	nApi m 1 - rApi m 1 (Sf9)	nApi m 1 - rApi m 1 (Tni)	rApi m 1 (Sf9) - rApi m 1 (Tni)
Z	-3,143 ^b	-6,408 ^c	-7,354 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,002	,000	,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,001	,000	,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,001	,000	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000	,000

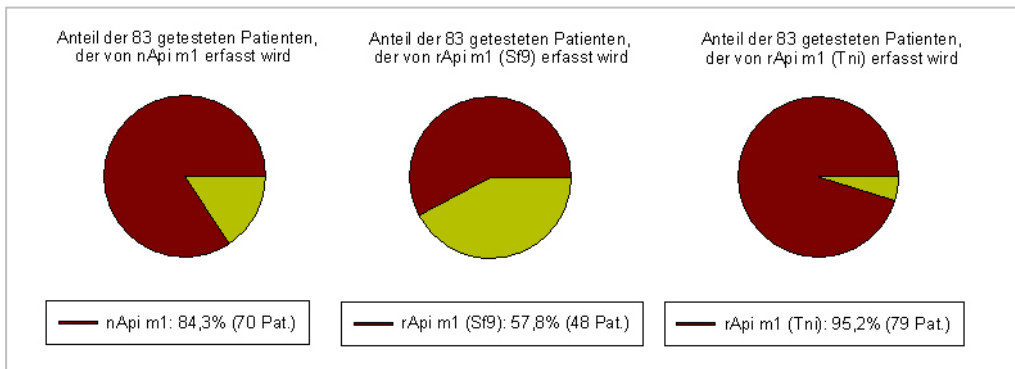
a. Wilcoxon-Test

Anschließend erfolgte der Vergleich bezüglich der absoluten Anzahl von bei einem Cutoff von 0,35 kU/L positiv getesteten Patienten.

Hier wurden durch die Testung mit rApi m 1 (Sf9), bei der durchschnittlich die signifikant niedrigsten Werte bei der IgE-Bestimmung erzielt wurden, auch die wenigsten Patienten positiv getestet. So wurden durch das rApi m 1 (Sf9) mit 48 der 83 ausgewerteten Patienten nur 57,8% positiv getestet, während durch die Testung mit nApi m 1 bereits 70 der Patienten (84,3%) als positiv gewertet werden. Bei der Testung mit rApi m 1 (Tni) wurden dagegen über 95% der Patienten (79 von 83) positiv getestet.

Abbildung 19:

Übersicht über die mittels verschieden gewonnenem Api m 1 positiv getesteten Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift (83 Patienten aus dem Patientenkollektiv 3)



Analog zum Vergleich der gemessenen sIgE-Werte werden durch die Testung mit nApi m 1 und rApi m 1 (Sf9) ein deutlicher Anteil der Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift nicht positiv getestet. Dieser Unterschied zur Testung mit dem Bienengiftgesamtextrakt ist bei beiden Allergenen signifikant ($p = 0,000$ bei beiden Testungen). Hingegen findet sich auch hier bei Testung mit rApi m 1 (Tni) kein signifikanter Unterschied mehr zur Testung mit dem Bienengift ($p = 0,120$). Vergleicht man die einzelnen Api m 1-Präparate untereinander, so werden mittels der Testung durch rApi m 1 (Tni) signifikant mehr Patienten positiv bewertet als bei den Testungen mit nApi m 1 ($p = 0,038$) und rApi m 1 aus Sf9-Insektenzellen ($p = 0,000$). Bei der Testung mit rApi m 1 (Sf9) werden zudem signifikant weniger Patienten positiv getestet als durch nApi m 1 ($p = 0,000$).

angewendetes Allergen * Testergebnis Kreuztabelle

angewendetes Allergen	nat. HB-Venom	Anzahl	Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
	nApi m1	Anzahl	0	83	83
		Erwartete Anzahl	6,5	76,5	83,0
Gesamt		Anzahl	13	70	83
		Erwartete Anzahl	6,5	76,5	83,0
		Anzahl	13	153	166
		Erwartete Anzahl	13,0	153,0	166,0

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	14,105 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	12,018	1	,001		
Likelihood-Quotient	19,128	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	166				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,50.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

angewendetes Allergen * Testergebnis Kreuztabelle

angewendetes Allergen	nat. HB-Venom	Anzahl	Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
	rApi m1 (Sf9)	Anzahl	0	83	83
		Erwartete Anzahl	17,5	65,5	83,0
		Anzahl	35	48	83
		Erwartete Anzahl	17,5	65,5	83,0
Gesamt		Anzahl	35	131	166
		Erwartete Anzahl	35,0	131,0	166,0

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	44,351 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	41,853	1	,000		
Likelihood-Quotient	57,986	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	166				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 17,50.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

	angewendetes Allergen	nat. HB-Venom	Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
		Anzahl	0	83	83
		Erwartete Anzahl	2,0	81,0	83,0
	rApi m1 (Tri)	Anzahl	4	79	83
		Erwartete Anzahl	2,0	81,0	83,0
Gesamt		Anzahl	4	162	166
		Erwartete Anzahl	4,0	162,0	166,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,099 ^a	1	,043	,120	,060
Kontinuitätskorrektur ^b	2,306	1	,129		
Likelihood-Quotient	5,644	1	,018	,120	,060
Exakter Test nach Fisher				,120	,060
Anzahl der gültigen Fälle	166				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

	angewendetes Allergen	nat. HB-Venom	Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
		Anzahl	0	83	83
		Erwartete Anzahl	6,5	76,5	83,0
	nApi m1	Anzahl	13	70	83
		Erwartete Anzahl	6,5	76,5	83,0
Gesamt		Anzahl	13	153	166
		Erwartete Anzahl	13,0	153,0	166,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	14,105 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	12,018	1	,001		
Likelihood-Quotient	19,128	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	166				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 6,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

	angewendetes Allergen	nat. HB-Venom	Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
		Anzahl	0	83	83
		Erwartete Anzahl	17,5	65,5	83,0
	rApi m1 (Sf9)	Anzahl	35	48	83
		Erwartete Anzahl	17,5	65,5	83,0
Gesamt		Anzahl	35	131	166
		Erwartete Anzahl	35,0	131,0	166,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	44,351 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	41,853	1	,000		
Likelihood-Quotient	57,986	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	166				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 17,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

	angewendetes Allergen	nat. HB-Venom	Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
		Anzahl	0	83	83
		Erwartete Anzahl	2,0	81,0	83,0
	rApi m1 (Tri)	Anzahl	4	79	83
		Erwartete Anzahl	2,0	81,0	83,0
Gesamt		Anzahl	4	162	166
		Erwartete Anzahl	4,0	162,0	166,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,099 ^a	1	,043	,120	,060
Kontinuitätskorrektur ^b	2,306	1	,129		
Likelihood-Quotient	5,644	1	,018	,120	,060
Exakter Test nach Fisher				,120	,060
Anzahl der gültigen Fälle	166				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Zum Abschluss wurde dann noch die Verteilung der gemessenen sIgE-Werte auf die verschiedenen IgE-Klassen verglichen, um Unterschiede in Bezug auf die durchschnittlichen Reaktionsstärken genauer beurteilen zu können.

Hier ist in der graphischen Auswertung zu sehen, dass bei allen getesteten Präparaten die IgE-Klasse II am häufigsten vertreten ist. Weiter wurden bei allen Präparaten noch zahlreiche Ergebnisse der IgE-Klassen I und III erzielt, jedoch wenige Werte in höheren Klassen.

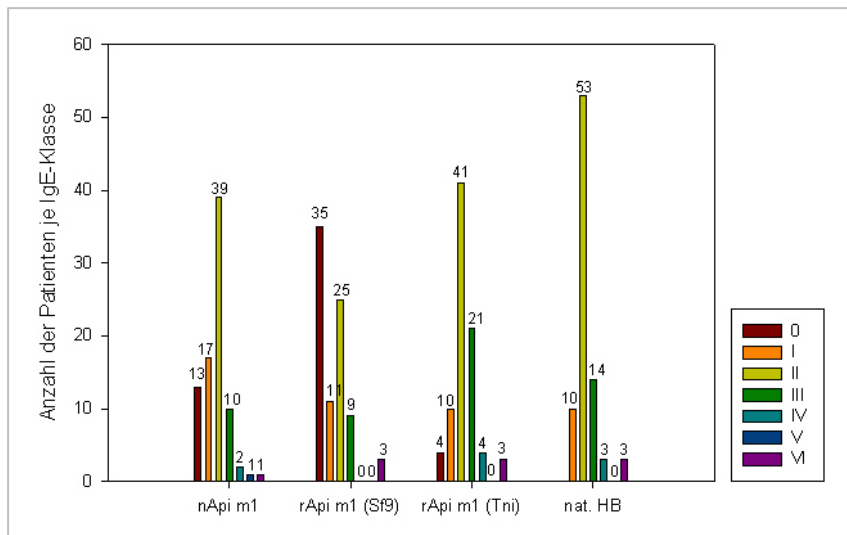


Abbildung 20:

Vergleich von verschieden hergestelltem Api m 1 und natürlichem Bienengift in Bezug auf die IgE-Klassen-Einteilung der hierdurch gemessenen sIgE-Werte anhand von 83 Bienengiftallergikern (Kollektiv 3)

Die hauptsächlich auffallenden Unterschiede sind die Bewertungen der Patienten als positiv oder negativ (vgl. vorangehende Abbildungen). Zudem erreichten gerade beim Vergleich von nApi m 1 und dem CCD-freien rApi m 1 (Sf9) durch nApi m1 deutlich mehr Patienten IgE-Werte, die innerhalb der Klassen I und II liegen. Bei Testung mit dem CCD-haltigen rApi m1 (Tni) und der Testung mit dem Gesamtextrakt zeigen sich vor allem bezüglich der IgE-Werte im Bereich von 0,71-3,50 kU/L (entspricht Klasse II) die größten Unterschiede zur Testung mit dem CCD-freien rApi m1 (Sf9).

4.5.2. Vergleich der IgE-Reaktivitäten von verschiedenen gewonnenen Allergenen unter Berücksichtigung der CCD-Reaktivität

Da sich bei den unter 4.5.1. aufgeführten Ergebnissen ein deutlicher Einfluss der CCDs auf die jeweiligen Testergebnisse zeigte, erfolgte anschließend die Aufteilung in CCD-negative Patienten und Patienten mit einem hohen Anteil an CCD-spezifischem IgE. Diese Aufteilung erfolgte anhand der erzielten sIgE-Werte bei Testung mit dem CCD-Marker MUXF3. Bei Werten < 0,35 kU/L wurden die Patienten der CCD-negativen Gruppe zugeordnet, bei Werten von 0,71 kU/L oder höher (entspricht einer IgE-Klasse II oder höher) der Gruppe mit einer hohen CCD-Reaktivität. Hierbei ergab sich für 27 Patienten eine Zuordnung zur Gruppe mit hohem CCD-spezifischen IgE und für 44 Patienten eine Zuordnung zur Gruppe der CCD-

negativen Patienten. Auf die restlichen der 83 ausgewerteten Bienengiftallergiker aus dem Patientenkollektiv 3 traf keines der beiden Kriterien zu.

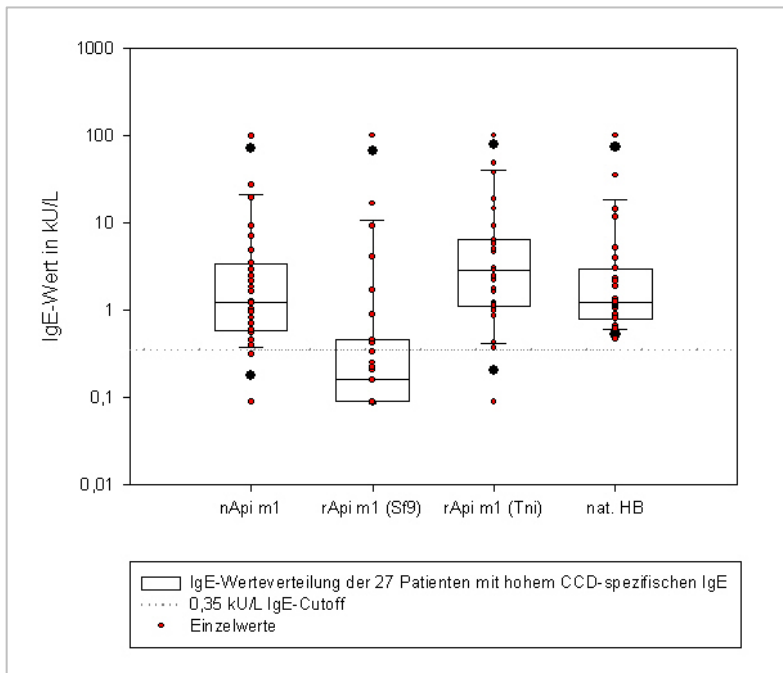


Abbildung 34:

Vergleich der sIgE-Werte von verschieden hergestelltem Api m 1 und dem natürlichen Bienengift bei 27 Patienten aus Kollektiv 3 mit hohem CCD-spezifischen IgE

	nApi m 1	rApi m 1 (Sf9)	rApi m 1 (Tni)	nat. HB-Venom
Maximum	99,50	100,00	100,00	100,00
Perzentil 95	27,10	16,70	48,00	35,30
Perzentil 75	3,43	,46	6,47	2,99
Median	1,22	,16	2,86	1,22
Perzentil 25	,59	,09	1,13	,80
Perzentil 05	,31	,09	,37	,60
Minimum	,09	,09	,09	,47

	nApi m 1	rApi m 1 (Sf9)	rApi m 1 (Tni)	nat. HB-Venom
Mittelwert	7,12	5,05	10,39	7,28
Standardabweichung	19,46	19,31	21,19	19,85
Varianz	378,84	372,99	448,87	393,92

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
nat. HB-Venom - nApi m 1	Negative Ränge	10 ^a	15,10	151,00
	Positive Ränge	17 ^b	13,35	227,00
	Bindungen	0 ^c		
	Gesamt	27		
nat. HB-Venom - rApi m 1 (Sf9)	Negative Ränge	0 ^d	,00	,00
	Positive Ränge	26 ^e	13,50	351,00
	Bindungen	1 ^f		
	Gesamt	27		
nat. HB-Venom - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	17 ^g	15,65	266,00
	Positive Ränge	9 ^h	9,44	85,00
	Bindungen	1 ⁱ		
	Gesamt	27		

Statistik für Test ^a			
	nat. HB-Venom - nApi m 1	nat. HB-Venom - rApi m 1 (Sf9)	nat. HB-Venom - rApi m 1 (Tni)
Z	-,913 ^b	-4,457 ^b	-2,299 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,361	,000	,022
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,374	,000	,020
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,187	,000	,010
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,006	,000	,001

a. Wilcoxon-Test

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
nApi m 1 - rApi m 1 (Sf9)	Negative Ränge	5 ^a	7,00	35,00
	Positive Ränge	21 ^b	15,05	316,00
	Bindungen	1 ^c		
	Gesamt	27		
nApi m 1 - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	24 ^d	13,63	327,00
	Positive Ränge	2 ^e	12,00	24,00
	Bindungen	1 ^f		
	Gesamt	27		
rApi m 1 (Sf9) - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	24 ^g	12,50	300,00
	Positive Ränge	0 ^h	,00	,00
	Bindungen	3 ⁱ		
	Gesamt	27		

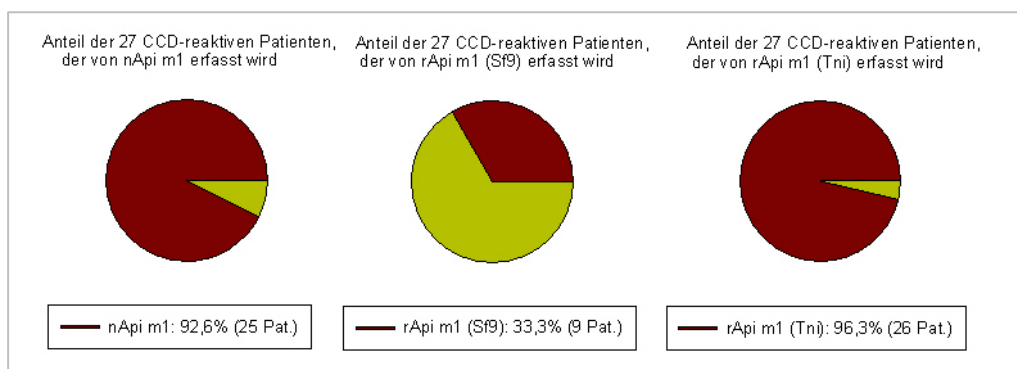
Statistik für Test ^a			
	nApi m 1 - rApi m 1 (Sf9)	nApi m 1 - rApi m 1 (Tni)	rApi m 1 (Sf9) - rApi m 1 (Tni)
Z	-3,569 ^b	-3,848 ^c	-4,286 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000	,000

a. Wilcoxon-Test

Bei den Patienten mit hohen Werten an CCD-spezifischem IgE wurden ähnlich wie bei der Betrachtung aller Patienten bei den Messungen mit nApi m 1 und rApi m 1 (Tni) signifikant höhere sIgE-Werte erzielt als bei Testung mit dem CCD-freien rApi m 1 (Sf9). Auch bestand auch hier ein signifikanter Unterschied der Testung mit rApi m 1 (Sf9) zu der Testung mit dem natürlichen Bienengift in Bezug auf die gemessenen IgE-Werte ($p = 0,000$). Jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den IgE-Werten bei Testung mit dem natürlichen nApi m 1 und denen bei Testung mit dem Bienengiftextrakt ($p = 0,374$). Die gemessenen sIgE-Werte für rApi m 1 (Tni) lagen hingegen sogar signifikant über den sIgE-Werten für den Bienengiftextrakt ($p = 0,020$), allerdings wurde einer der Patienten dennoch durch die Testung mit rApi m 1 (Tni) nicht erfasst.

Abbildung 35:

Übersicht über die mittels verschieden gewonnenem Api m 1 positiv getesteten Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift – Betrachtung von 27 Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE aus Patientenkollektiv 3



Beim Vergleich bzgl. der absoluten Anzahl an positiv getesteten Patienten werden bei den 27 Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE wie auch bei Betrachtung aller 83 Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift bei Testung mit dem CCD-freien rApi m 1 (Sf9) signifikant weniger Patienten erfasst, als bei Testung mit nApi m 1 ($p = 0,000$) und dem CCD-haltigen rApi m 1 (Tni) ($p = 0,000$). Ebenso erfasst die Testung mit rApi m 1 (Sf9) insgesamt einen deutlichen Anteil der 27 Patienten nicht. Im Gegensatz zur Untersuchung aller 83 Patienten zeigt sich bei den deutlich CCD-reaktiven Patienten jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Testung mit nApi m 1 und rApi m 1 (Tni) ($p = 1,000$). Auch werden hier durch nApi m 1 nur unwesentlich weniger Patienten positiv getestet als mit dem Bienengift ($p = 0,491$). Mittels rApi m 1 (Tni) werden auch hier wieder fast alle Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift erfasst, es besteht kein signifikanter Unterschied zur Testung mit dem Bienengiftgesamtextrakt ($p = 1,000$).

angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten) * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten)	nat. HB-Venom	Anzahl	0	27	27
		Erwartete Anzahl	1,0	26,0	27,0
	nApi m1	Anzahl	2	25	27
		Erwartete Anzahl	1,0	26,0	27,0
Gesamt	Anzahl	2	52	54	
	Erwartete Anzahl	2,0	52,0	54,0	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,077 ^a	1	,150	,491	,245
Kontinuitätskorrektur ^b	,519	1	,471		
Likelihood-Quotient	2,850	1	,091	,491	,245
Exakter Test nach Fisher				,491	,245
Anzahl der gültigen Fälle	54				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten) * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten)	nat. HB-Venom	Anzahl	0	27	27
		Erwartete Anzahl	9,0	18,0	27,0
	rApi m1 (Sf9)	Anzahl	18	9	27
		Erwartete Anzahl	9,0	18,0	27,0
Gesamt	Anzahl	18	36	54	
	Erwartete Anzahl	18,0	36,0	54,0	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	27,000 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	24,083	1	,000		
Likelihood-Quotient	34,372	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	54				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 9,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten) * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten)	nat. HB-Venom	Anzahl	0	27	27
		Erwartete Anzahl	,5	26,5	27,0
	rApi m1 (Tni)	Anzahl	1	26	27
		Erwartete Anzahl	,5	26,5	27,0
Gesamt	Anzahl	1	53	54	
	Erwartete Anzahl	1,0	53,0	54,0	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,019 ^a	1	,313	1,000	,500
Kontinuitätskorrektur ^b	,000	1	1,000		
Likelihood-Quotient	1,405	1	,236	1,000	,500
Exakter Test nach Fisher				1,000	,500
Anzahl der gültigen Fälle	54				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten) * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten)	nApi m1	Anzahl	0	27	27
		Erwartete Anzahl	9,0	18,0	27,0
	rApi m1 (Sf9)	Anzahl	18	9	27
		Erwartete Anzahl	9,0	18,0	27,0
Gesamt	Anzahl	18	36	54	
	Erwartete Anzahl	18,0	36,0	54,0	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	20,329 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	17,868	1	,000		
Likelihood-Quotient	22,558	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	54				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 10,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten) * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten)	nApi m1	Anzahl	0	27	27
		Erwartete Anzahl	,5	26,5	27,0
	rApi m1 (Tni)	Anzahl	1	26	27
		Erwartete Anzahl	,5	26,5	27,0
Gesamt	Anzahl	1	53	54	
	Erwartete Anzahl	1,0	53,0	54,0	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,353 ^a	1	,552	1,000	,500
Kontinuitätskorrektur ^b	,000	1	1,000		
Likelihood-Quotient	,359	1	,549	1,000	,500
Exakter Test nach Fisher				1,000	,500
Anzahl der gültigen Fälle	54				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten) * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-reaktive Patienten)	rApi m1 (Sf9)	Anzahl	18	9	27
		Erwartete Anzahl	9,5	17,5	27,0
	rApi m1 (Tni)	Anzahl	1	26	27
		Erwartete Anzahl	9,5	17,5	27,0
Gesamt	Anzahl	19	35	54	
	Erwartete Anzahl	19,0	35,0	54,0	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	23,468 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	20,788	1	,000		
Likelihood-Quotient	27,121	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	54				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 9,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Anschließend erfolgte die Betrachtung der 44 Bienengiftallergiker aus Patientenkollektiv 3 mit einem CCD-spezifischen IgE von < 0,35 kU/L.

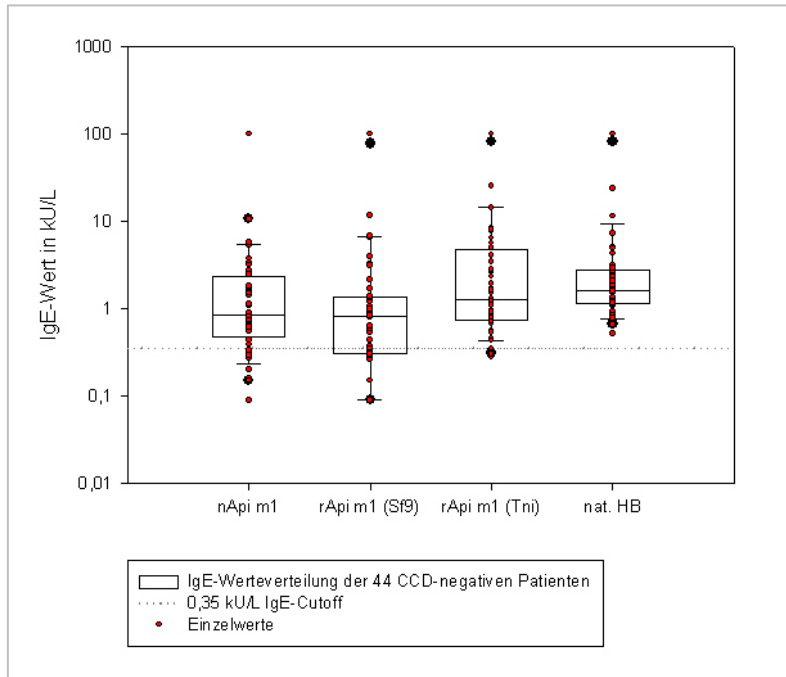


Abbildung 36:
Vergleich der sIgE-Werte von verschieden hergestelltem Api m 1 und dem natürlichen Bienengift bei 44 CCD-negativen Patienten aus Kollektiv 3

	nApi m 1	rApi m 1 (Sf9)	rApi m 1 (Tni)	nat. HB-Venom
Maximum	100,00	100,00	100,00	100,00
Perzentil 95	10,50	11,60	25,30	24,10
Perzentil 75	2,17	1,33	4,55	2,76
Median	,85	,82	1,27	1,61
Perzentil 25	,50	,30	,76	1,13
Perzentil 05	,16	,09	,35	,67
Minimum	,09	,09	,28	,52

	nApi m 1	rApi m 1 (Sf9)	rApi m 1 (Tni)	nat. HB-Venom
Mittelwert	4,01	5,87	7,69	7,14
Standardabweichung	14,99	20,89	20,93	20,86
Varianz	224,76	436,39	438,01	434,95

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
nat. HB-Venom - nApi m 1	Negative Ränge	6 ^a	16,67	100,00
	Positive Ränge	37 ^b	22,86	846,00
	Bindungen	1 ^c		
	Gesamt	44		
nat. HB-Venom - rApi m 1 (Sf9)	Negative Ränge	3 ^d	21,67	65,00
	Positive Ränge	39 ^e	21,49	838,00
	Bindungen	2 ^f		
	Gesamt	44		
nat. HB-Venom - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	15 ^g	26,77	401,50
	Positive Ränge	27 ^h	18,57	501,50
	Bindungen	2 ⁱ		
	Gesamt	44		

Statistik für Test ^a			
	nat. HB-Venom - nApi m 1	nat. HB-Venom - rApi m 1 (Sf9)	nat. HB-Venom - rApi m 1 (Tni)
Z	-4,504 ^b	-4,833 ^b	-,625 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,532
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,538
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000	,269
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000	,002

a. Wilcoxon-Test

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
nApi m 1 - rApi m 1 (Sf9)	Negative Ränge	22 ^a	20,09	442,00
	Positive Ränge	21 ^b	24,00	504,00
	Bindungen	1 ^c		
	Gesamt	44		
nApi m 1 - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	38 ^d	22,63	860,00
	Positive Ränge	5 ^e	17,20	86,00
	Bindungen	1 ^f		
	Gesamt	44		
rApi m 1 (Sf9) - rApi m 1 (Tni)	Negative Ränge	39 ^g	21,92	855,00
	Positive Ränge	3 ^h	16,00	48,00
	Bindungen	2 ⁱ		
	Gesamt	44		

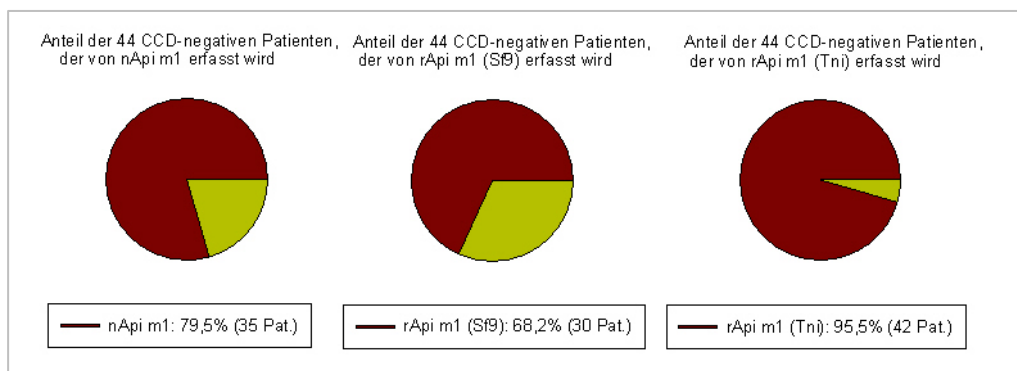
Statistik für Test ^a			
	nApi m 1 - rApi m 1 (Sf9)	nApi m 1 - rApi m 1 (Tni)	rApi m 1 (Sf9) - rApi m 1 (Tni)
Z	-,374 ^b	-4,673 ^c	-5,045 ^c
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,708	,000	,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,715	,000	,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,358	,000	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,004	,000	,000

a. Wilcoxon-Test

Wie bereits in der Darstellung der Werteverteilung gut zu sehen ist, zeigte sich für die CCD-negativen Patienten eine deutlich bessere Übereinstimmung der Ergebnisse der Testungen mit nApi m 1 und dem CCD-freien rApi m 1 (Sf9) als bei Betrachtung aller Patienten oder der CCD-reaktiven Patienten. Der Unterschied bzgl. der IgE-Werteverteilung von nApi m 1 und rApi m 1 (Sf9) ist bei den CCD-negativen Patienten nicht mehr signifikant ($p = 0,715$). Zudem zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen der Testung mit nApi m 1 und dem gesamten Bienengift bzgl. der gemessenen sIgE-Werte ($p = 0,000$), der bei Betrachtung der CCD-reaktiven Patienten nicht vorlag. Jedoch wurden auch hier bei der Testung mit dem CCD-haltigen rApi m 1 (Tni) signifikant höhere Werte als bei Testung mit den beiden anderen Allergenen gemessen ($p = 0,000$ bei beiden Vergleichen), obwohl die Patienten bei Testung mit dem CCD-Marker MUXF3 nur sehr niedrige Werte erzielten oder sogar keinerlei CCD-spezifisches IgE nachgewiesen werden konnte. Allerdings lagen die hier gemessenen sIgE-Werte im Mittel unterhalb der bei den Patienten mit hohen CCD-spezifischen IgE-Werten gemessenen Werte für rApi m 1 (Tni).

Abbildung 37:

Übersicht über die mittels verschieden gewonnenem Api m 1 positiv getesteten Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift – Betrachtung von 44 CCD-negativen Patienten aus Patientenkollektiv 3



Bei Betrachtung der insgesamt durch die einzelnen Allergene erfassten Patienten mit Bienengiftsensibilisierung wurden immerhin 8 Patienten, die bei Testung mit nApi m 1 als positiv gewertet wurden, nicht von der Testung mit rApi m 1 (Sf9) erfasst. Hingegen wiesen 3 Patienten sIgE-Werte von $> 0,35$ kU/L gegen rApi m 1 (Sf9) auf, blieben bei Testung mit nApi m 1 aber negativ. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Testungen festgestellt werden ($p = 0,332$). Beide dieser Testungen erfassten jedoch signifikant weniger Patienten als bei Testung mit Bienengift ($p = 0,002$ bzw. $0,000$) oder mit rApi m 1 (Tni) ($p = 0,049$ bzw. $0,002$). Allerdings fiel der Unterschied zwischen den Testungen mit nApi

m 1 und rApi m 1 (Tni) nur sehr knapp signifikant aus. Kein signifikanter Unterschied konnte jedoch zwischen der Testung mit dem gesamten Bienengift und der Testung mit dem CCD-haltigen rApi m 1 (Tni) festgestellt werden ($p = 0,494$), obwohl die hier ausgewerteten Patienten kein oder nur wenig CCD-spezifisches IgE aufwiesen. Hier stellt sich die Frage, wie gut die gemessenen CCD-spezifischen IgE-Werte mit den wirklichen Unterschieden zwischen den Messungen mit in Sf9- bzw. in Tni-Insektenzellen hergestellten Allergenen korrelieren.

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-negative Patienten)	nat. HB-Venom	Anzahl	0	44	44
		Erwartete Anzahl	4,5	39,5	44,0
	nApi m 1	Anzahl	9	35	44
		Erwartete Anzahl	4,5	39,5	44,0
Gesamt	Anzahl	9	79	88	
		Erwartete Anzahl	9,0	79,0	88,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	10,025 ^a	1	,002	,002	,001
Kontinuitätskorrektur ^b	7,921	1	,005		
Likelihood-Quotient	13,504	1	,000	,002	,001
Exakter Test nach Fisher				,002	,001
Anzahl der gültigen Fälle	88				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,50.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-negative Patienten)	nat. HB-Venom	Anzahl	0	44	44
		Erwartete Anzahl	7,0	37,0	44,0
	rApi m 1 (Sf9)	Anzahl	14	30	44
		Erwartete Anzahl	7,0	37,0	44,0
Gesamt	Anzahl	14	74	88	
		Erwartete Anzahl	14,0	74,0	88,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	16,849 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	14,355	1	,000		
Likelihood-Quotient	22,073	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	88				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 7,00.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-negative Patienten)	nat. HB-Venom	Anzahl	0	44	44
		Erwartete Anzahl	1,0	43,0	44,0
	rApi m 1 (Tni)	Anzahl	2	42	44
		Erwartete Anzahl	1,0	43,0	44,0
Gesamt	Anzahl	2	86	88	
		Erwartete Anzahl	2,0	86,0	88,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,047 ^a	1	,153	,494	,247
Kontinuitätskorrektur ^b	,512	1	,474		
Likelihood-Quotient	2,819	1	,093	,494	,247
Exakter Test nach Fisher				,494	,247
Anzahl der gültigen Fälle	88				

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-negative Patienten)	nApi m 1	Anzahl	9	35	44
		Erwartete Anzahl	11,5	32,5	44,0
	rApi m 1 (Sf9)	Anzahl	14	30	44
		Erwartete Anzahl	11,5	32,5	44,0
Gesamt	Anzahl	23	65	88	
		Erwartete Anzahl	23,0	65,0	88,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,472 ^a	1	,225	,332	,166
Kontinuitätskorrektur ^b	,942	1	,332		
Likelihood-Quotient	1,481	1	,224	,332	,166
Exakter Test nach Fisher				,332	,166
Anzahl der gültigen Fälle	88				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 11,50.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-negative Patienten)	nApi m 1	Anzahl	9	35	44
		Erwartete Anzahl	5,5	38,5	44,0
	rApi m 1 (Tni)	Anzahl	2	42	44
		Erwartete Anzahl	5,5	38,5	44,0
Gesamt	Anzahl	11	77	88	
		Erwartete Anzahl	11,0	77,0	88,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,091 ^a	1	,024	,049	,025
Kontinuitätskorrektur ^b	3,740	1	,053		
Likelihood-Quotient	5,455	1	,020	,049	,025
Exakter Test nach Fisher				,049	,025
Anzahl der gültigen Fälle	88				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 5,50.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
angewendetes Allergen (CCD-negative Patienten)	rApi m1 (Sf9)	Anzahl	14	30	44
		Erwartete Anzahl	8,0	36,0	44,0
	rApi m1 (Tni)	Anzahl	2	42	44
		Erwartete Anzahl	8,0	36,0	44,0
Gesamt		Anzahl	16	72	88
		Erwartete Anzahl	16,0	72,0	88,0

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	11,000 ^a	1	,001	,002	,001
Kontinuitätskorrektur ^b	9,243	1	,002		
Likelihood-Quotient	12,133	1	,000	,002	,001
Exakter Test nach Fisher				,002	,001
Anzahl der gültigen Fälle	88				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 8,00.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

4.5.3. Korrelation der Höhe des CCD-spezifischen IgEs (MUXF3) mit dem wirklichen CCD-Einfluss bei Testung mit rekombinanten Allergenen

Um diese Korrelation näher zu untersuchen, wurden bei allen Patienten aus dem Kollektiv 3 die sIgE-Werte für rApi m 1 (Sf9) und rApi m 1 (Tni) bzgl. ihres Unterschiedes zueinander untersucht und anschließend dieser Unterschied in Korrelation mit dem gemessenen CCD-spezifischen IgE-Wert (gemessen mit MUXF3) gebracht. Für diese Auswertung konnten die Werte von insg. 96 Patienten verwendet werden. Zudem lagen bei insg. 98 Patienten aus diesem Kollektiv neben den CCD-spezifischen IgE-Werten (MUXF3) die IgE-Werte für rApi m 2 (Sf9) und rApi m 2 (Tni) vor, sodass auch hier der Vergleich der gemessenen IgE-Werte durchgeführt und anschließend die Korrelation mit den IgE-Werten bei Testung mit MUXF3 berechnet wurde. Verglichen wurden die Testergebnisse von Sf9- und Tni-Gruppe jeweils anhand der Höhe der gemessenen IgE-Werte, der Menge an bei einem Cutoff von 0,35 kU/L positiv getesteten Patienten und bezüglich ihrer Differenz (sIgE-Wert bei Messung mit aus Tni-Insektenzellen stammendem rekombinanten Allergen abzüglich sIgE-Wert bei Messung mit aus Sf9-Insektenzellen stammendem Allergen). Anschließend erfolgte die Überprüfung der Korrelation zwischen den berechneten Differenzen und dem gemessenen Wert für das CCD-spezifische IgE.

4.5.3.1. Auswertung der CCD-Reaktivität von 96 Patienten mittels rApi m 1 (Sf9), rApi m 1 (Tni) und MUXF3

Hier ist bei der direkten Gegenüberstellung der beiden Präparate im Boxplot deutlich zu sehen, dass bei der Testung der Patienten mittels rApi m 1 aus Tni-Insektenzellen durchschnittlich höhere IgE-Werte erzielt wurden als bei der Testung mit rApi m 1 aus Sf9-Insektenzellen.

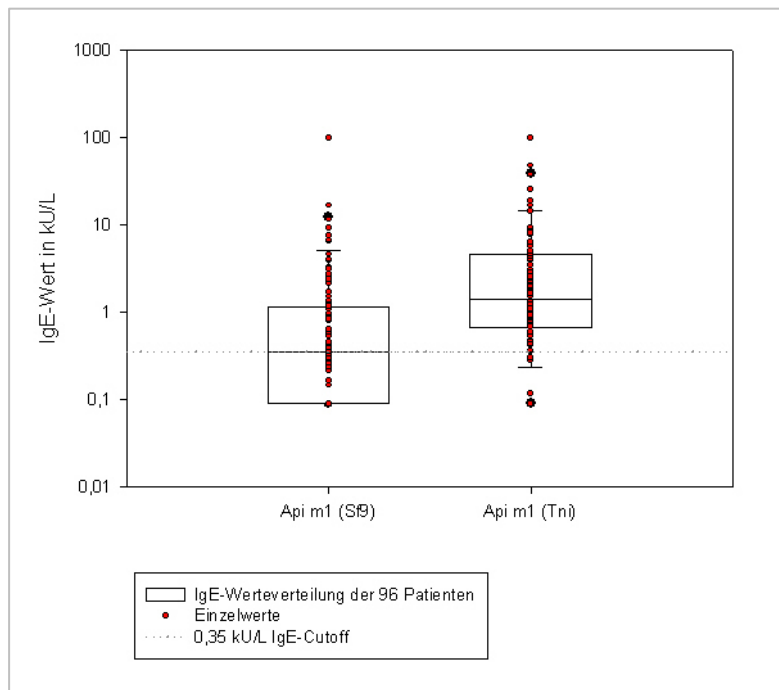


Abbildung 38:

Direkter Vergleich von rApi m 1 aus Tni- und Sf9-Insektenzellen anhand von 96 Patienten aus Kollektiv 3

	Api m1 (Sf9)	Api m1 (Tni)
Maximum	100,00	100,00
Perzentil 95	11,60	37,70
Perzentil 75	1,14	4,67
Median	,35	1,44
Perzentil 25	,09	,68
Perzentil 05	,09	,09
Minimum	,09	,09

	Api m1 (Sf9)	Api m1 (Tni)
Mittelwert	4,370	7,003
Standardabweichung	17,452	18,279
Varianz	304,575	334,119

So weisen die Testergebnisse mit rApi m 1 (Tni) einen Mittelwert von 7,00 kU/L auf, während bei der Testung mit rApi m 1 (Sf9) lediglich ein Mittelwert von 4,37 kU/L vorliegt. Gleiches gilt für die Spannweiten von 25. und 75. Perzentile: Die mittleren 50% der gemessenen Werte liegen bei der Testung mit rApi m 1 (Tni) mit 0,68 – 4,67 kU/L deutlich höher als bei der Testung mit rApi m 1 (Sf9) (0,09 – 1,14 kU/L). Besonders deutlich ist der Unterschied bei Betrachtung der 95. Perzentile. Diese liegt bei der Testung mit rApi m 1 (Tni) bei 37,70 kU/L, während bei der Testung mit rApi m 1 (Sf9) lediglich ein Wert von 11,60 kU/L erreicht wird.

In der anschließend durchgeführten statistischen Auswertung dieser Gegenüberstellung mittels Wilcoxon-Test zeigte sich, dass der bereits in der graphischen Darstellung gut zu sehende Unterschied zwischen den Ergebnissen der oben beschriebenen Testung mit rApi m 1 aus Sf9-Insektenzellen und mit rApi m 1 aus Tni-Insektenzellen statistisch signifikant ist. Mit einer

Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,000$ kann in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass durch die Testung mit rApi m 1 (Tni) höhere sIgE-Werte erzielt werden.

Statistik für Test^a

	Api m1 (Tni) - Api m1 (Sf9)
Z	-7,657 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf negativen Rängen.

Dieser Unterschied war auch beim direkten Vergleich der beiden Präparate im Hinblick auf die Gesamtzahl der jeweils bei einem Cutoff von 0,35 kU/L positiv getesteten Patienten zu sehen. Es wurden durch die Testung mit rApi m 1 (Tni) deutlich mehr Patienten positiv getestet als mit rApi m 1 (Sf9). Durch die Testung mit rApi m 1 (Tni) wurden mit 84 Patienten insgesamt 36 Patienten mehr positiv gewertet als bei der Testung mit rApi m 1 (Sf9). Dies konnte im Chi-Quadrat-Test auch als signifikant nachgewiesen werden ($p = 0,000$).

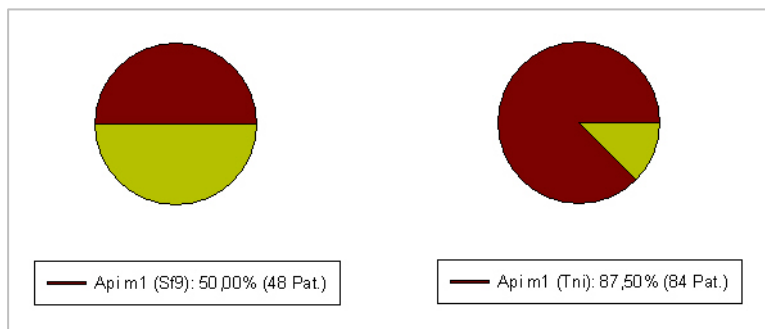


Abbildung 39:

Vergleich der bei einem Cutoff von 0,35 kU/L durch rApi m 1 (Sf9) und rApi m 1 (Tni) anteilig positiv getesteten Patienten

(gesamt: 96 Pat. aus Kollektiv 3)

Kreuztabelle

Api m1	Sf9	Anzahl	Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
Api m1	Sf9	Anzahl	48	48	96
		Erwartete Anzahl	30,0	66,0	96,0
		% innerhalb von Api m1	50,0%	50,0%	100,0%
		Tni	12	84	96
Tni	Tni	Anzahl	12	84	96
		Erwartete Anzahl	30,0	66,0	96,0
		% innerhalb von Api m1	12,5%	87,5%	100,0%
		Gesamt	60	132	192
Gesamt	Gesamt	Anzahl	60	132	192,0
		Erwartete Anzahl	60,0	132,0	192,0
		% innerhalb von Api m1	31,3%	68,8%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	31,418 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	29,697	1	,000	,000	,000
Likelihood-Quotient	33,073	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	192				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 30,00.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Anschließend erfolgte die direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Testverfahren bei jedem getesteten Patienten.

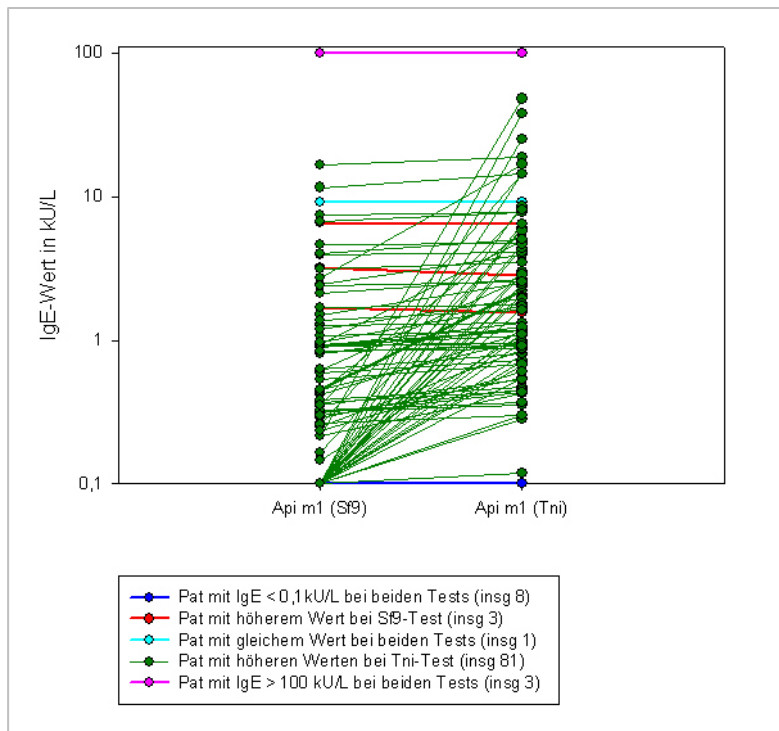


Abbildung 40:

Direkte Gegenüberstellung der bei der Testung mit rApi m 1 (Tni) und rApi m 1 (Sf9) erzielten Werte

(gesamt: 96 Pat. aus Kollektiv 3)

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Api m 1 (Tni) - Api m 1 (Sf9)	Negative Ränge	3 ^a	22,67	68,00
	Positive Ränge	81 ^b	43,23	3502,00
	Bindungen	12 ^c		
	Gesamt	96		

Insgesamt 81 von 96 Patienten aus dem Patientenkollektiv 3 erzielten bei der Testung mit rApi m 1 (Tni) einen höheren Wert als bei der Testung mit rApi m 1 (Sf9) erzielt wurde. Nur bei 3 der 96 Patienten wurden höhere Werte bei der Testung mittels rApi m 1 (Sf9) erreicht. Insgesamt wurde bei 12 Patienten in beiden Auswertungen der gleiche IgE-Wert erzielt. So wiesen 3 Patienten bei beiden Auswertungen ein spezifisches IgE von > 100 kU/L auf, ein Patient hatte bei beiden Testungen einen sIgE-Wert von 9,22 kU/L. Die restlichen 8 Patienten mit gleichen Werten hatten bei beiden Testungen jeweils einen sIgE-Wert von unter 0,1 kU/L.

Da sich bei Betrachtung dieser Ergebnisse ein eindeutiger CCD-Einfluss bei dem untersuchten Patientenkollektiv zeigen konnte, wurde anschließend untersucht, ob sich bei den einzelnen Patienten aus der Höhe des mittels MUXF3 gemessenen CCD-spezifischen IgE-Wertes der Unterschied zwischen den Testungen mit dem CCD-freien rApi m 1 (Sf9) und dem CCD-

haltigen rApi m 1 (Tni) vorhersagen lässt. Hierzu wurde für jeden Patienten die Differenz zwischen den für die rekombinanten Allergene bei ihm gemessenen sIgE-Werten in Korrelation zum beim Patienten vorliegenden Wert für das CCD-spezifische IgE gebracht. Dies erfolgte zum einen anhand einer graphischen Gegenüberstellung und zum anderen mittels durchgeführter Korrelationsanalyse.

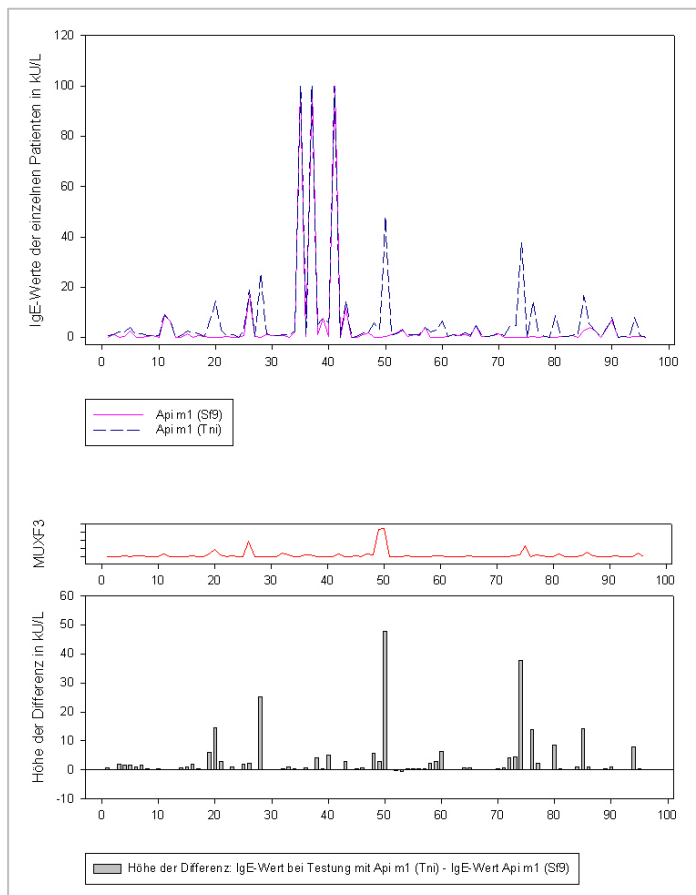


Abbildung 41:

Betrachtung der Differenz zwischen den sIgE-Werten der Testungen mit rApi m 1 (Tni) und rApi m 1 (Sf9) sowie des entsprechenden CCD-spezifischen sIgE-Wertes (gemessen mit MUXF3)

(gesamt: 96 Pat. aus Kollektiv 3)

In der graphischen Darstellung ist erneut deutlich zu erkennen, dass die bei der Testung mit rApi m 1 (Tni) gemessenen sIgE-Werte zum größten Teil höher als die bei der Testung mit rApi m 1 (Sf9) erreichten Werte sind. Hier finden sich zum Teil sogar Differenzen die mehr als 20,0 kU/L betragen. Zudem deutet sich in der Grafik an, dass in diesem Fall ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Differenz und dem Wert der MUXF3-Messung vorliegt. So weist der Patient mit der höchsten Differenz (> 47 kU/L) auch den höchsten CCD-spezifischen IgE-Wert (34,5 kU/L) auf, während man in der Grafik bei den Patienten mit eher niedrigen CCD-spezifischen IgE-Werten eher keine sichtbaren Differenzen von > 5 kU/L findet.

Dieser Zusammenhang konnte in der anschließend durchgeführten Korrelationsanalyse bestätigt werden. Bei der Berechnung der Korrelation wurden alle Patienten, die für beide Allergene einen sIgE-Wert < 0,1 kU/L aufwiesen, ausgeschlossen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern. Es zeigte sich, dass zwischen der Höhe des sIgE-Wertes für MUXF3 (Bromelain) und der Höhe der Differenz zwischen den sIgE-Werten bei Testung mit rApi m 1 (Tni) und rApi m 1 (Sf9) ein positiver Zusammenhang besteht. Dies zeigte sich auch anhand der ermittelten Regressionsgeraden, jedoch waren zum Teil deutliche Ausreißer in der graphischen Darstellung zu finden. Mittels der ergänzend durchgeführten statistischen Tests konnten Korrelationskoeffizienten von 0,272 (Kendalls Tau-b) bzw. von 0,358 (Spearman Rho) berechnet werden, die signifikant waren ($p = 0,000$). Somit lag in diesem Fall eine schwache positive Korrelation vor, die statistisch signifikant war.

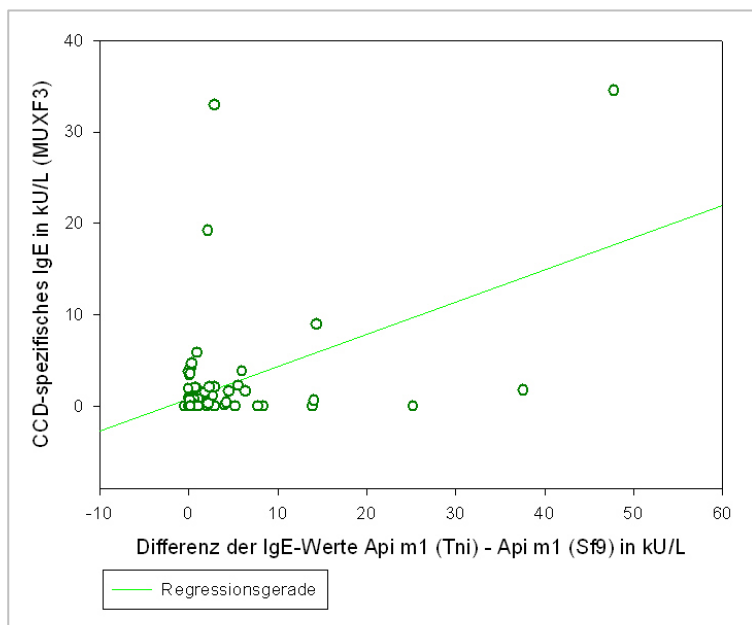


Abbildung 42:

Korrelation von gemessenem CCD-spezifischen IgE-Wert (MUXF3) und der Differenz der Ergebnisse aus den Testungen mit rApi m 1 (Tni) und rApi m 1 (Sf9)

(gesamt: 96 Pat. aus Kollektiv 3)

Korrelationen

			MUXF3 Bromelin	Differenz der IgE-Werte Api m1 Tni - Api m1 Sf9
Kendall-Tau-b	MUXF3 Bromelin	Korrelationskoeffizient	1,000	,272**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	88	88
	Differenz der IgE-Werte Api m1 Tni - Api m1 Sf9	Korrelationskoeffizient	,272**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	88	88
Spearman-Rho	MUXF3 Bromelin	Korrelationskoeffizient	1,000	,358**
		Sig. (2-seitig)	.	,001
		N	88	88
	Differenz der IgE-Werte Api m1 Tni - Api m1 Sf9	Korrelationskoeffizient	,358**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,001	.
		N	88	88

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

4.5.3.2. Auswertung der CCD-Reaktivität von 98 Patienten mittels rApi m 2 (Sf9), rApi m 2 (Tni) und MUXF3

Auch bei dieser Auswertung ist bei der direkten Gegenüberstellung der beiden Präparate im Boxplot deutlich zu sehen, dass bei der Testung der Patienten mittels des rekombinanten, CCD-haltigen Allergens aus Tni-Insektenzellen durchschnittlich höhere sIgE-Werte erzielt wurden als bei der Testung mit dem in Sf9-Insektenzellen hergestellten, CCD-freien Allergen.

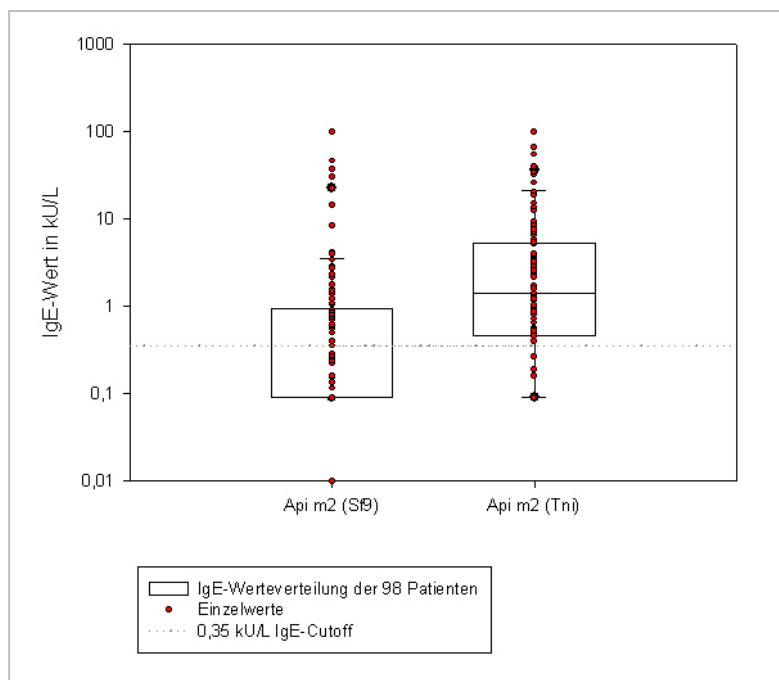


Abbildung 43:

Direkter Vergleich von rApi m 2 aus Tni- und Sf9-Insektenzellen anhand von 98 Patienten aus Kollektiv 3

	Api m2 (Sf9)	Api m2 (Tni)
Maximum	100,00	100,00
Perzentil 95	22,50	36,00
Perzentil 75	,91	5,18
Median	,09	1,40
Perzentil 25	,09	,48
Perzentil 05	,09	,09
Minimum	,01	,09

	Api m2 (Sf9)	Api m2 (Tni)
Mittelwert	3,146	6,816
Standardabweichung	12,145	14,999
Varianz	147,513	224,967

Bei den Testergebnissen der Auswertung mit rApi m 2 (Tni) liegt ein Mittelwert von 6,82 kU/L vor, während bei der Testung mit rApi m 2 (Sf9) lediglich ein Mittelwert von 3,15 kU/L erreicht wird. Auch bei Betrachtung der Perzentilen sowie des Medians wurden bei der Testung der Patientenseren mit rApi m 2 (Tni) deutlich höhere Werte erzielt. So liegt hier der Median bei 1,40 kU/L, während bei der Auswertung mit rApi m 2 (Sf9) nur ein Median von 0,09 kU/L vorliegt. Bei der 75. Perzentile steht einem Wert von 5,18 kU/L bei der Testung mit rApi m 2 (Tni) lediglich ein Wert von 0,91 kU/L bei der Testung mit rApi m 2 (Sf9) gegenüber, für die

95. Perzentile ergab die Auswertung entsprechend 36,00 kU/L im Vergleich zu lediglich 22,50 kU/L.

Statistik für Test^a

	Api m2 (Tni) - Api m2 (Sf9)
Z	-7,163 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000
Exakte Signifikanz (2- seitig)	,000
Exakte Signifikanz (1- seitig)	,000
Punkt- Wahrscheinlichkeit	,000

a. Wilcoxon-Test

b. Basiert auf negativen Rängen.

Die anschließend durchgeführte statistische Auswertung dieser Gegenüberstellung mittels Wilcoxon-Test bestätigte, dass der bereits in der graphischen Darstellung gut zu sehende Unterschied zwischen den Ergebnissen der oben beschriebenen Testung mit rApi m 2 aus Sf9-Insektenzellen und rApi m 2 aus Tni-Insektenzellen statistisch signifikant ist. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,000$ kann auch in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass durch die Testung mit rApi m 2 (Tni) durchschnittlich höhere sIgE-Werte erzielt werden.

Ergänzend wurde auch hier der direkte Vergleich der beiden Präparate im Hinblick auf die Gesamtzahl der jeweils bei einem Cutoff von 0,35 kU/L positiv getesteten Patienten durchgeführt. Es wurden durch die Testung mit rApi m 2 (Tni) mit 77 Patienten deutlich mehr Patienten positiv getestet als bei der Testung mit rApi m 2 (Sf9), bei der nur 36 Patienten als positiv bewertet wurden. Dieser Unterschied konnte mittels Chi-Quadrat-Test auch als statistisch signifikant bewiesen werden ($p = 0,000$).

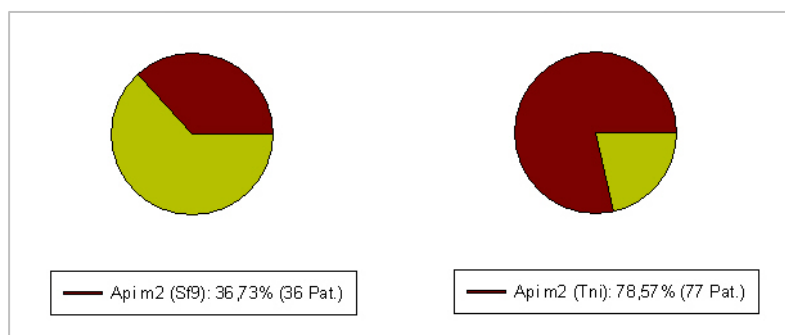


Abbildung 44:

Vergleich der bei einem Cutoff von 0,35 kU/L durch rApi m 2 (Sf9) und rApi m 2 (Tni) positiv getesteten Patienten

(gesamt: 98 Pat. aus Kollektiv 3)

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
Api m2 Sf9	Anzahl	62	36	98	
	Erwartete Anzahl	41,5	56,5	98,0	
	% innerhalb von Api m2	63,3%	36,7%	100,0%	
Tni	Anzahl	21	77	98	
	Erwartete Anzahl	41,5	56,5	98,0	
	% innerhalb von Api m2	21,4%	78,6%	100,0%	
Gesamt	Anzahl	83	113	196	
	Erwartete Anzahl	83,0	113,0	196,0	
	% innerhalb von Api m2	42,3%	57,7%	100,0%	

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz ...	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	35,129 ^a	1	,000	,000	,000
Kontinuitätskorrektur ^b	33,436	1	,000		
Likelihood-Quotient	36,391	1	,000	,000	,000
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Anzahl der gültigen Fälle	196				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 41,50.
b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

Auch hier wurde ergänzend die direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den beiden Testverfahren für jeden einzelnen getesteten Patienten durchgeführt.

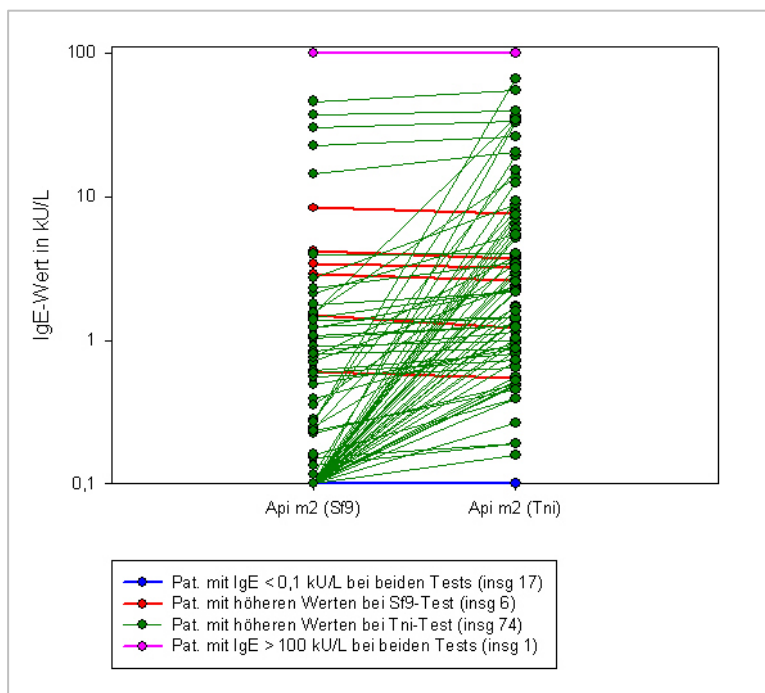


Abbildung 45:

Direkte Gegenüberstellung der bei der Testung mit rApi m 2 (Tni) und rApi m 2 (Sf9) erzielten Werte

(gesamt: 96 Pat. aus Kollektiv 3)

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Api m2 (Tni) - Api m2 (Sf9)	Negative Ränge	6 ^a	21,08	126,50
	Positive Ränge	74 ^b	42,07	3113,50
	Bindungen	18 ^c		
	Gesamt	98		

Es wurde bei 74 der insgesamt 98 Patienten bei der Testung mit rApi m 2 (Tni) ein höherer sIgE-Wert als bei der Testung mit rApi m 2 (Sf9) erzielt. Lediglich 6 der 98 Patienten zeigten bei der Testung mit rApi m 2 (Sf9) höhere Werte. Insgesamt wurde bei 18 Patienten in beiden Auswertungen der gleiche sIgE-Wert erzielt. Dies war bei einem Patienten der Fall, der bei beiden Testungen einen sIgE-Wert von > 100 kU/L aufwies, sowie bei 17 Patienten, die bei beiden Testungen jeweils einen sIgE-Wert von unter 0,1 kU/L hatten.

Entsprechend der vorhergehenden Auswertung wurden auch hier die Differenzen zwischen den sIgE-Werten für rApi m 2 (Sf9) und rApi m 2 (Tni) dargestellt und dem beim jeweiligen Patienten mittels MUXF3 gemessenen CCD-spezifischen IgE-Wert gegenübergestellt.

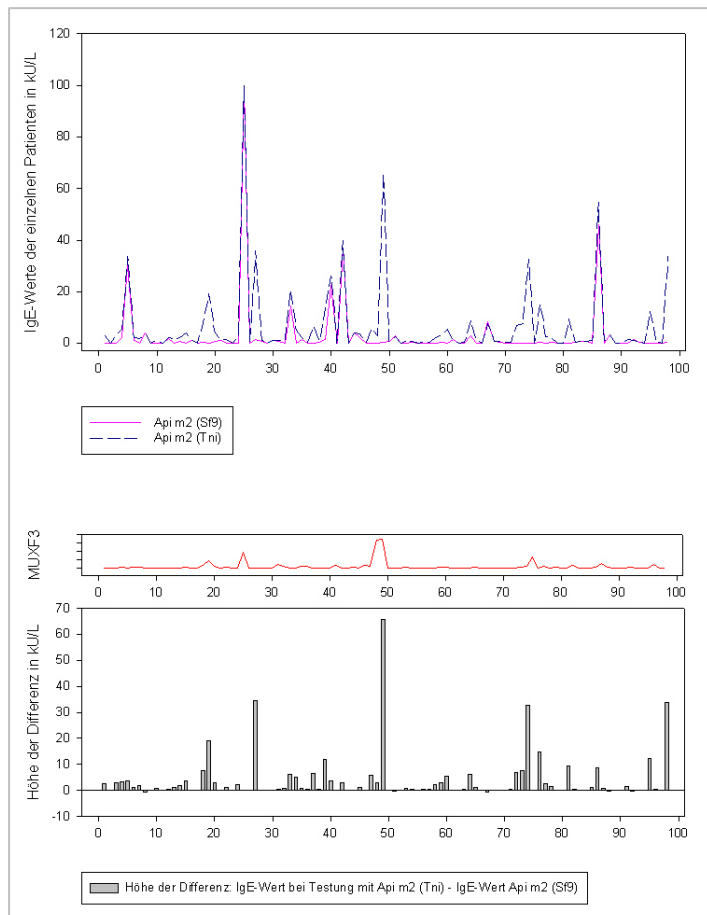


Abbildung 46:

Betrachtung der Differenz zwischen den sIgE-Werten der Testungen mit rApi m 2 (Tni) und rApi m 2 (Sf9) sowie des entsprechenden CCD-spezifischen sIgE-Wertes (gemessen mit MUXF3)

(gesamt: 96 Pat. aus Kollektiv 3)

In der graphischen Darstellung war deutlich zu erkennen, dass die bei der Testung mit rApi m 2 (Tni) gemessenen sIgE-Werte zum größten Teil höher als die bei der Testung mit rApi m 2 (Sf9) gemessenen Werte ausfallen. Auch bei diesem Patientenkollektiv fanden sich einige Differenzen, die mehr als 20,0 kU/L betragen. In einem Fall lag die größte Differenz sogar bei über 60,0 kU/L, der entsprechende Patient wies einen sIgE-Wert von 34,5 kU/L bei Testung mit MUXF3 auf. Ein weiterer Patient mit einem CCD-spezifischen sIgE von knapp 9 kU/L hatte bei Testung mit rApi m 2 (Tni) einen sIgE-Wert, der 19 kU/L über dem sIgE-Wert für rApi m 2 (Sf9) lag. Ebenso zeichnet es sich in der Grafik ab, dass Patienten mit niedrigem CCD-spezifischen IgE eher geringere Differenzen aufweisen.

In der anschließend durchgeführten Korrelationsanalyse konnte auch hier eine positive Korrelation zwischen der Höhe des CCD-spezifischen sIgE-Wertes (gemessen mit MUXF3) und der Höhe der Differenz zwischen den sIgE-Werten bei Testung mit CCD-haltigem und CCD-freiem Allergen bewiesen werden. Zur Berechnung waren erneut alle Patienten mit einem sIgE-Wert von $< 0,1$ kU/L bei beiden Testungen mit den rekombinanten Allergenen ausgeschlossen worden.

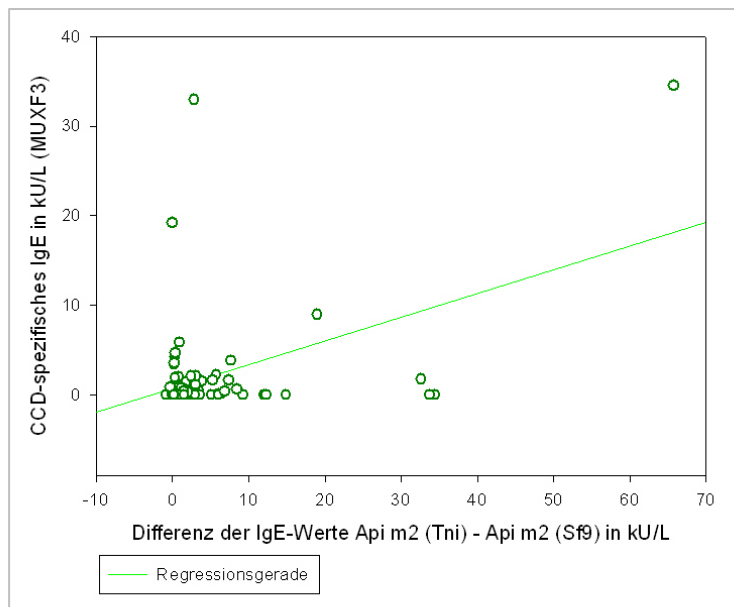


Abbildung 47:

Korrelation von gemessenem CCD-spezifischen IgE-Wert (MUXF3) und der Differenz der Ergebnisse aus den Testungen mit rApi m 2 (Tni) und rApi m 2 (Sf9)

(gesamt: 96 Pat. aus Kollektiv 3)

Korrelationen

			MUXF3 Bromelin	Differenz der IgE-Werte Api m2 Tni - Api m2 Sf9
Kendall-Tau-b	MUXF3 Bromelin	Korrelationskoeffizient	1,000	,106
		Sig. (2-seitig)	.	,180
		N	81	81
	Differenz der IgE-Werte Api m2 Tni - Api m2 Sf9	Korrelationskoeffizient	,106	1,000
		Sig. (2-seitig)	,180	.
		N	81	81
Spearman-Rho	MUXF3 Bromelin	Korrelationskoeffizient	1,000	,146
		Sig. (2-seitig)	.	,194
		N	81	81
	Differenz der IgE-Werte Api m2 Tni - Api m2 Sf9	Korrelationskoeffizient	,146	1,000
		Sig. (2-seitig)	,194	.
		N	81	81

Es zeigte sich, dass zwischen der Höhe des für MUXF3 gemessenen sIgE-Wertes und der Höhe der Differenz zwischen den sIgE-Werten bei Testung mit rApi m 2 (Tni) und rApi m 2 (Sf9) ein schwacher positiver Zusammenhang besteht, der mittels der berechneten Regressionsgeraden graphisch dargestellt werden konnte. Auch hier fanden sich jedoch wieder einige deutliche Ausreißer in der Grafik. Mittels der ergänzend durchgeführten statistischen Tests konnten Korrelationskoeffizienten von 0,106 (Kendalls Tau-b) bzw. von 0,146 (Spearman's Rho) berechnet werden. Diese schwach positive Korrelation konnte jedoch bei

einem Signifikanzniveau von 0,05 nicht als statistisch signifikant anerkannt werden, da bei beiden statistischen Tests eine zu hohe Irrtumswahrscheinlichkeit ($p = 0,180$ bzw. $0,194$) vorlag.

4.6. Vergleich von ImmunoCAP- und Immulite-System bezüglich ihrer Sensitivität

Im Folgenden wurden die beiden aktuell in der Routinediagnostik für die komponentenbasierte Diagnostik verwendeten Immunoassaysysteme in Bezug auf ihre Sensitivität bei Testung mittels rApi m 1 miteinander verglichen. Dabei handelt es sich um das ImmunoCAP-System Phadia UniCAP250 (Thermo Fisher Scientific) und das Immulite-System Immulite2000 (Siemens). Für die Auswertung wurden nur Patienten verwendet, die mittels Bestimmung des sIgE-Wertes gegen Bienengift bei einem Cutoff von $0,35$ kU/L positiv getestet wurden und einen positiven Intrakutantest mit Bienengift aufwiesen (insgesamt 38 Patienten aus dem 1. Patientenkollektiv). Verglichen wurden die Testergebnisse aus den serologischen Untersuchungen mit den beiden verschiedenen rApi m 1-Allergenen bezüglich der absoluten Höhe der gemessenen sIgE-Werte sowie der Anzahl an dadurch positiv getesteten Patienten (Cutoff $0,35$ kU/L).

In der graphischen Darstellung der gemessenen sIgE-Werte ist bereits gut sichtbar, dass sowohl bei Messung mit dem Immulite-System als auch bei Messung mit dem ImmunoCAP mittels rApi m 1 deutlich weniger Patienten positiv getestet werden als bei Testung mit dem Bienengiftgesamtextrakt. Auch werden bei Anwendung des ImmunoCAP-Systems durchschnittlich niedrigere sIgE-Werte gemessen als mittels Immulite. So lagen die bei Testung mittels des Gesamtextrakts gemessenen sIgE-Werte durchschnittlich bei $12,80$ kU/L, bei Testung mit rApi m 1 wurde mittels Immulite im Mittel ein sIgE-Wert von $6,54$ kU/L gemessen, mittels ImmunoCAP ein sIgE-Wert von $2,42$ kU/L. Mehr als die Hälfte der mittels ImmunoCAP gemessenen Werte lag sogar unterhalb des Cutoffs (Median: $0,28$ kU/L).

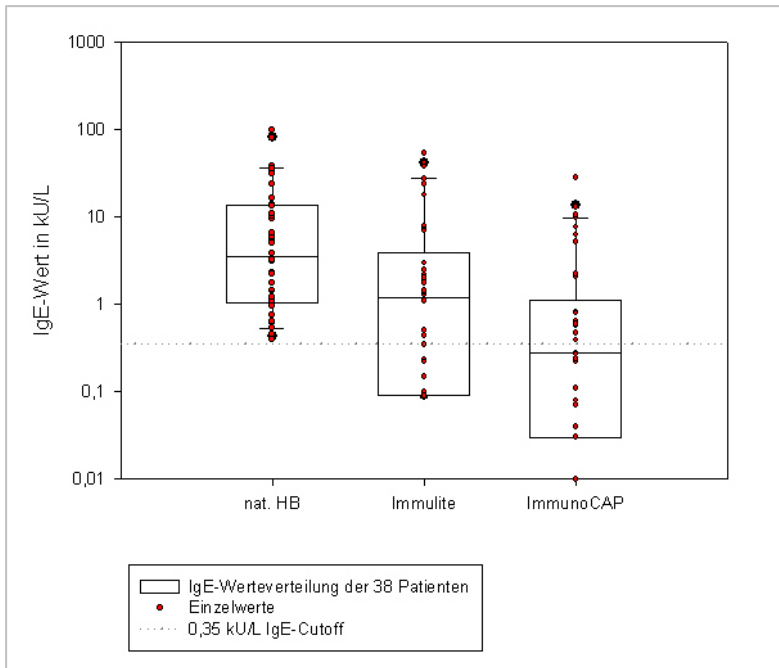


Abbildung 48:
Vergleich von ImmunoCAP und Immulite bezüglich der Verteilung der gemessenen sIgE-Werte für Api m 1 bei 38 Bienengiftallergikern aus Kollektiv 1

	nat. HB-Venom	Api m 1 Immulite	Api m 1 ImmunoCAP
Maximum	100,00	54,53	28,05
Perzentil 95	81,40	41,27	12,93
Perzentil 75	13,80	2,97	,81
Median	3,57	1,20	,28
Perzentil 25	1,09	,09	,03
Perzentil 05	,44	,09	,00
Minimum	,40	,09	,00

	nat. HB-Venom	Api m 1 Immulite	Api m 1 ImmunoCAP
Mittelwert	12,80	6,54	2,42
Standardabweichung	21,56	13,07	5,40
Varianz	464,83	170,80	29,17

Ränge		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Api m 1 Immulite - nat. HB-Venom	Negative Ränge	34 ^a	19,29	656,00
	Positive Ränge	4 ^b	21,25	85,00
	Bindungen	0 ^c		
	Gesamt	38		
Api m 1 ImmunoCAP - nat. HB-Venom	Negative Ränge	37 ^d	19,46	720,00
	Positive Ränge	1 ^e	21,00	21,00
	Bindungen	0 ^f		
	Gesamt	38		
Api m 1 ImmunoCAP - Api m 1 Immulite	Negative Ränge	34 ^g	20,53	698,00
	Positive Ränge	4 ^h	10,75	43,00
	Bindungen	0 ⁱ		
	Gesamt	38		

Statistik für Test ^a			
	Api m 1 Immulite - nat. HB-Venom	Api m 1 ImmunoCAP - nat. HB-Venom	Api m 1 ImmunoCAP - Api m 1 Immulite
Z	-4,140 ^b	-5,069 ^b	-4,750 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000	,000

a. Wilcoxon-Test
b. Basiert auf positiven Rängen.

Dass diese Unterschiede signifikant sind, konnte in der statistischen Auswertung bewiesen werden. So konnte mittels Wilcoxon-Test nachgewiesen werden, dass sowohl bei Anwendung des Immulite-Systems als auch beim ImmunoCAP mittels rApi m 1 signifikant niedrigere sIgE-Werte als bei der Testung mit dem natürlichen Bienengift erzielt werden ($p = 0,000$ in beiden Fällen). Zudem konnte mittels Wilcoxon-Test gezeigt werden, dass bei der Testung mit dem ImmunoCAP-System signifikant niedrigere Werte als bei der Testung mittels Immulite erzielt werden ($p = 0,000$).

Anschließend wurde noch verglichen, welcher Anteil der für die Auswertung verwendeten 38 Bienengiftallergiker durch das jeweilige Testsystem mittels rApi m 1 erfasst wird.

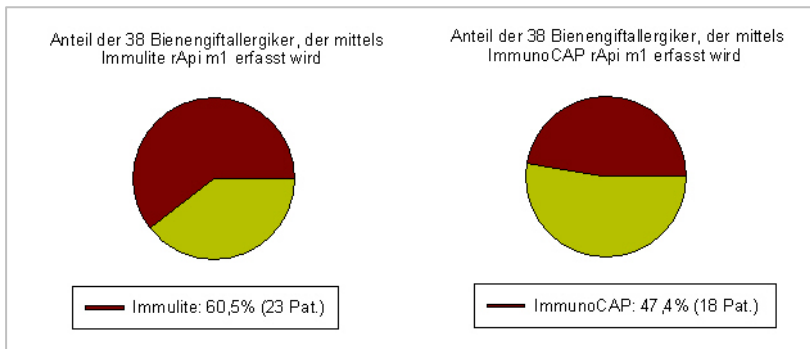


Abbildung 49:

Vergleich der Sensitivität von ImmunoCAP- und Immulite-System anhand von 38 Patienten aus Kollektiv 1

Bei der Testung mittels Immulite-System wurden durch rApi m 1 insgesamt 23 der 38 Patienten positiv getestet (60,5%), während durch das ImmunoCAP-System nur 18 Patienten ein positives Testergebnis erzielten (47,4%). Dieser Unterschied konnte jedoch in der statistischen Auswertung auch bei einseitiger Betrachtung nicht als signifikant nachgewiesen werden ($p = 0,179$).

Angewendetes System * Testergebnis Kreuztabelle

			Testergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
Angewendetes System	ImmunoCAP	Anzahl	20	18	38
		Erwartete Anzahl	17,5	20,5	38,0
		% innerhalb von Angewendetes System	52,6%	47,4%	100,0%
	Immulite	Anzahl	15	23	38
		Erwartete Anzahl	17,5	20,5	38,0
		% innerhalb von Angewendetes System	39,5%	60,5%	100,0%
Gesamt	Anzahl	35	41	76	
	Erwartete Anzahl	35,0	41,0	76,0	
	% innerhalb von Angewendetes System	46,1%	53,9%	100,0%	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,324 ^a	1	,250	,357	,179
Kontinuitätskorrektur ^b	,847	1	,357		
Likelihood-Quotient	1,328	1	,249	,357	,179
Exakter Test nach Fisher				,357	,179
Anzahl der gültigen Fälle	76				

a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 17,50.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

5. Diskussion

Um gerade vor einer notwendigen spezifischen Immuntherapie genau klären zu können welches Insekt der Auslöser der anaphylaktischen Reaktion war, stehen neben der Anamnese aktuell mit Prick- und Intrakutantestung, der Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper gegen die Insektengifte und ihre einzelnen Allergene und dem Basophilenaktivierungstest zahlreiche diagnostische Möglichkeiten zur Verfügung. Jedoch finden sich trotzdem noch immer viele strittige Fälle mit positiven Testergebnissen sowohl für Bienen- als auch Wespengift, in denen die Bestimmung des auslösenden Insekts nicht eindeutig möglich ist (Tomsitz et al. 2017). Zwar hat die über die Jahre immer besser entwickelte Komponentendiagnostik in vielen solchen Fällen zur Unterscheidung zwischen einer echten, klinisch relevanten Doppeltsensibilisierung und einer reinen Kreuzreaktion geführt und in letzterem Fall das auslösende Insekt identifiziert, jedoch stellen auch hier noch zu häufig diagnostische Lücken oder Einflüsse durch CCDs ein Problem bei der korrekten Unterscheidung zwischen reinen Bienen- und Wespengiftallergikern sowie echt doppeltsensibilisierten Patienten dar.

Um solche diagnostischen Lücken oder mögliche Fehlinterpretationen möglichst gering zu halten, ist eine umfassende Kenntnis über die Sensibilisierungsmuster der einzelnen Patientengruppen und die möglichen Auslöser von klinisch nicht relevanten Kreuzreaktionen nötig.

Mittels der unter 4.1. durchgeführten, vergleichenden Gegenüberstellung der IgE-Reaktivitäten von reinen Bienen- und Wespengiftallergikern sowie von doppelpositiv getesteten Patienten kann ein erster Eindruck über die verschiedenen Sensibilisierungsmuster vermittelt werden. Wie zu erwarten lagen bei den reinen Wespengiftallergikern die spezifischen IgE-Werte für die Rekombinanten des Bienengifts in nahezu allen Fällen deutlich unterhalb des Cutoffs von 0,35 kU/L. Lediglich bei einem Patienten war für Api m 2 ein Wert knapp über dem Cutoff gemessen worden (0,38 kU/L). Da es sich hierbei um ein homologes Protein der Hyaluronidase Ves v 2 handelt (Hemmer et al. 2004), kann eine Kreuzreaktion der Hyaluronidasen die Ursache für den positiven Antikörpernachweis gegen Api m 2 bei einem reinen Wespengiftallergiker sein. Bei der Betrachtung der Bienengiftallergiker hingegen fanden sich mehrere Patienten mit Werten über 0,35 kU/L für spezifisches IgE gegen Ves v 3. Da diese im Maximum jedoch einen Wert von 0,87 kU/L erreichten, können auch diese durch Kreuzreaktionen aufgrund der Verwandtschaft von Ves v 3 und Api m 5 (Blank et al. 2010) erklärt werden. Im Durchschnitt lagen die bei den Bienengiftallergikern aufgetretenen Werte für Ves v 3 jedoch unterhalb des

Cutoffs. Allerdings zeigten auch die reinen Wespengiftallergiker ähnlich geringe Sensibilisierungsraten gegen Ves v 3 (Durchschnittlich 0,09 kU/L, maximal 0,55 kU/L), was unterstreicht, dass es sich hierbei nicht um ein Hauptallergen handelt. Ähnliches zeigte sich auch für Api m 4 bei Betrachtung der Bienengiftallergiker: im Gegensatz zu den Werten bei den Hauptallergenen Api m 1, Api m 2, Api m 3 und Api m 5 wurden hier im Durchschnitt spezifische IgE-Werte unterhalb des Cutoffs (0,293 kU/L) und im Maximum ein Wert von 2,38 kU/L gemessen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kohler et al, die ebenfalls nur eine moderate Sensibilisierungsrate für Api m 4 feststellten und dieses somit nicht zu den Hauptallergenen zählten (Kohler et al. 2014). Durchschnittlich wurden bei den Bienengiftallergikern die höchsten Werte für Api m 1 gemessen, was dessen Rolle als diagnostisch wichtigstes Allergen unterstreicht. Ähnliche Verteilungen der sIgE-Werte zeigten sich bei den doppelpositiven Patienten, jedoch lagen hier die sIgE-Werte für Bienen- und Wespengift durchschnittlich höher als bei den reinen Bienen- bzw. Wespengiftallergikern. Im direkten Vergleich (siehe 4.1.2.) konnte dieser Unterschied jedoch nicht als signifikant bewiesen werden. Ebenso waren die sIgE-Werte für die beiden Dipeptidylpeptidasen IV Ves v 3 und Api m 5 durchschnittlich höher als bei den reinen Bienen- bzw. Wespengiftallergikern, was auf das Vorhandensein von Kreuzreaktionen auf die homologen Proteine in der Gruppe der doppelpositiv getesteten Patienten hinweist. In der direkten Gegenüberstellung konnte jedoch auch hier trotz der bereits in der graphischen Darstellung zum Teil gut sichtbaren Unterschiede nicht gezeigt werden, dass diese festgestellten erhöhten Werte bei den doppelpositiv getesteten Patienten für die Dipeptidylpeptidasen signifikant sind. Zudem wurden in der direkten Gegenüberstellung noch die sIgE-Werte für das in der Routinediagnostik wichtige Api m 1 zwischen Bienengiftallergikern und Doppelpositiven verglichen. Hier zeigten sich durchschnittlich höhere sIgE-Werte für Api m 1 bei den reinen Bienengiftallergikern, dies ist auch in der graphischen Darstellung klar ersichtlich. Jedoch war auch dies nicht signifikant. Als mögliche Ursache für die hier aufgeführten zwar graphisch gut sichtbaren, jedoch nicht signifikant nachweisbaren Unterschiede ist sicherlich die kleine Fallzahl der reinen Bienen- (13) bzw. Wespengiftallergiker (13) anzuführen.

Um diese Unterschiede weiter zu differenzieren, wurden anschließend die Verteilungen der gemessenen Werte auf die verschiedenen semiquantitativen IgE-Klassen miteinander verglichen (siehe 4.2.). Dieser Vergleich ergab jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einfach- und doppelpositiv getesteten Patienten.

Bei dem ergänzend durchgeführten Vergleich der Ergebnisse im Intrakutantest (4.2.3. und 4.2.4.) konnte jedoch in der graphischen Darstellung deutlich gezeigt werden, dass sowohl die reinen Bienen- als auch die reinen Wespengiftallergiker häufiger als die doppelpositiven Patienten bereits bei den niedrigsten Verdünnungsstufen eine positive Reaktion aufweisen. Dieser graphisch sichtbare Unterschied war jedoch ebenfalls nicht signifikant, auch hier könnte die zu geringe Fallzahl bei den einfachpositiven Patienten die Ursache sein. Negative Ergebnisse im Intrakutantest kamen nur bei Patienten vor, die mittels der sIgE-Antikörper doppelpositiv getestet wurden. Sowohl dies als auch die häufigere Reaktion auf die niedrigste Verdünnungsstufe bei den einfachpositiven Patienten unterstreicht sicher die Feststellung von Sturm et al, dass die Hauttestungen im Gegensatz zu den Antikörperbestimmungen kaum oder sogar gar nicht durch CCDs beeinflusst werden (Sturm, Jin et al. 2011).

5.1. Ursachen von doppelpositiven Testergebnissen in der serologischen Diagnostik

In der Literatur werden die Raten an Patienten mit Doppelpositivität bei Routinediagnostik mittels sIgE-Bestimmung gegen Bienen- und Wespengift zwischen 30% und 59% angegeben (Egner et al. 1998, Müller et al. 2009). Jedoch ist dieser Doppelpositivität häufig keine klinische Bedeutung beizumessen und systemische Reaktionen werden trotz entsprechender Sensibilisierung nicht durch beide Insektengifte ausgelöst (Sturm et al. 2014). In dem hier untersuchten Patientenkollektiv waren es sogar 60,6%, bei denen mittels der reinen Antikörperbestimmung durch die Gesamtextrakte keine eindeutige Aussage zum ursächlichen Insekt getroffen werden konnte. Dies unterstreicht, dass die Komponentendiagnostik für eine folgende Therapieplanung unerlässlich ist, um unnötige Hyposensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift zu vermeiden (Brehler et al. 2013), die mit einem erhöhten Risiko für Nebenwirkungen und für neu auftretende Sensibilisierungen verbunden sind und zudem erhöhte Kosten verursachen (Blank et al. 2018). Da auch die Komponentendiagnostik nicht immer eindeutige Aussagen liefert, ist es sicherlich von großer Bedeutung die Häufigkeiten von reinen, klinisch relevanten Kreuzallergien bzw. von den verschiedensten Auslösern von Kreuzreaktionen in größeren Patientenkollektiven zu kennen, um strittige Ergebnisse bei einzelnen Individuen besser interpretieren und bzgl. der Entscheidung über die notwendige Hyposensibilisierung werten zu können. Um hierzu noch weitere und evtl. genauere Daten

liefern zu können, wurden alle in diesem Patientenkollektiv doppelpositiv getesteten Patienten auf die möglichen Ursachen dieser positiven Reaktionen untersucht.

Als Patienten mit echter Doppeltsensibilisierung wurden alle Patienten eingeordnet, die neben einer positiven Reaktion auf beide Gesamtextrakte auch positiv sowohl auf rApi m 1 und rVes v 5 (Phadia i208 und i209, CCD-frei) getestet wurden (Cutoff 0,35 kU/L), da es für beide Proteine keine Homologen im jeweils anderen Insektengift gibt. Somit kann aufgrund der CCD-freien Herstellung der rekombinanten Allergene ausgeschlossen werden, dass hierbei fälschlicherweise Patienten mit Kreuzreaktionen erfasst werden. In dem hier untersuchten Kollektiv lag die Rate von sicher vorliegenden echten Doppeltsensibilisierungen bei 32,4% der doppelpositiv getesteten Patienten.

Bei den restlichen Patienten müssen auch Kreuzreaktionen als Ursache des doppelpositiven Ergebnisses angenommen werden. Hier ist jedoch eine eindeutige Bestimmung nicht möglich, sondern es handelt sich lediglich um eine Interpretation der Ergebnisse. Von Kreuzreaktionen muss ausgegangen werden, wenn bei Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift und Wespengift nur für eines der beiden Insektengifte sIgE-Antikörper gegen Hauptallergene gefunden werden (Blank et al. 2010, Hemmer et al. 2001, Ollert et al. 2015). Hohes spezifisches IgE gegen Allergene mit entsprechenden homologen Proteinen im jeweils anderen Insektengift spricht für eine diesbezügliche Kreuzreaktion. Kritisiert wurde diese Interpretation jedoch von einigen Kollegen, die einen großen Einfluss von CCDs postulieren, da diese bei bis zu 75% der doppelpositiven Patienten nachgewiesen werden können (Jappe et al. 2006). So wurden in einer Studie 65% der positiven Reaktionen auf die Hyaluronidase Ves v 2 komplett auf CCD-Kreuzreaktionen zurückgeführt, während wohl nur 8% durch die Peptidepitope allein ausgelöst wurden (Jin et al. 2010). Diese Vermutung, dass Kreuzreaktionen auf die Hyaluronidasen zum größten Teil nur durch CCDs ausgelöst werden, wurde zudem von der Beobachtung unterstützt, dass die Sensibilisierungsraten gegen CCD-freies Api m 2 bei reinen Bienengiftallergikern genauso hoch sind wie bei Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift, während bei doppeltsensibilisierten Patienten deutlich erhöhte Sensibilisierungsraten für die Dipeptidylpeptidase rApi m 5 im Vergleich zu reinen Bienengiftallergikern gefunden und als Zeichen für das Vorhandensein von Kreuzreaktionen aufgrund der homologen Proteinepitope gewertet wurden (Arzt et al. 2017).

In dem hier aufgearbeiteten Patientenkollektiv wurde eine Kreuzreaktion auf die Dipeptidylpeptidasen rApi m 5 und rVes v 3 angenommen, wenn der jeweilige Patient bei

mindestens einem der beiden Allergene über dem Cutoff von 0,35 kU/L und bei dem zweiten mindestens über dem Cutoff von 0,1 kU/L lag. Dies traf auf 11,8% der mittels Komponentendiagnostik untersuchten doppelpositiven Patienten zu – unabhängig von CCDs, da CCD-freie rekombinante Allergene verwendet wurden. Bei insgesamt 26,5% der doppelpositiven Patienten im untersuchten Kollektiv spielte die Reaktion auf die Hyaluronidase rApi m 2 vermutlich eine wesentliche Rolle: diese wiesen eine positive Reaktion auf rApi m 2 auf (bei Cutoff 0,35 kU/L, ebenfalls CCD-freie Herstellung), konnten hingegen nicht als eindeutig echt doppelt sensibilisiert eingeordnet werden und zeigten auch keine positive Reaktion auf die Dipeptidylpeptidasen. Zusammen zeigten sich somit bei insg. 38,3% der doppelpositiven Patienten deutliche Hinweise auf für die klinische Beurteilung relevante Kreuzreaktionen durch homologe Proteine, weshalb diese in der Diagnostik nicht vernachlässigt werden sollten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Blank et al., die den Dipeptidylpeptidasen Api m 5 und Ves v 3 eine relevante klinische Rolle in der Diagnostik der Insektengiftallergie zuschreiben (Blank et al. 2010). Die oben aufgeführten Ergebnisse legen jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen von Jin et al. eine wesentlich größere Rolle der Hyaluronidasen unabhängig von CCDs bei Kreuzreaktionen nahe, die in der klinischen Diagnostik nicht vernachlässigt werden sollte. Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass bei den doppelpositiven Patienten in diesem Kollektiv durchschnittlich niedrigere Sensibilisierungsraten gegen CCD-freies Api m 2 (sIgE-Mittelwert von 3,94 kU/L) als bei den reinen Bienengiftallergikern (sIgE-Mittelwert von 12,74 kU/L) vorlagen, weshalb insgesamt von einer eher geringeren Rolle der Hyaluronidasen im Vergleich zu den Dipeptidylpeptidasen als Auslöser von Kreuzreaktionen ausgegangen werden muss. Bei Letzteren konnten im Gegensatz zu Api m 2 sowohl für CCD-freies Api m 5 (durchschnittliche sIgE-Werte von 4,06 kU/L bei den Doppelpositiven und von 3,68 kU/L bei den reinen Bienengiftallergikern) als auch für CCD-freies Ves v 3 (durchschnittliche sIgE-Werte von 0,86 kU/L bei den Doppelpositiven und von 0,15 kU/L bei den reinen Wespengiftallergikern) höhere Sensibilisierungsraten bei den doppelpositiven Patienten nachgewiesen werden.

Hinweise für eine Kreuzreaktion lediglich auf Grundlage der CCDs fanden sich in diesem Kollektiv nur bei 17,6% der doppelpositiv getesteten Patienten. Bei 11,8% dieser Patienten konnte mittels der durchgeführten Diagnostik kein Hinweis auf die Ursache der doppelpositiven Reaktion gefunden werden.

Angeführt werden muss zudem noch, dass die Anzahl der Patienten mit echter Doppelt sensibilisierung wahrscheinlich noch über den hier sicher mindestens vorliegenden

32,4% liegt, da gemäß verschiedener Studien nur ca. 84,5-89,9% der Wespengiftallergiker durch rVes v 5 (Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011, Vos et al. 2013) und nur ca. 72,2-81,7% der Bienengiftallergiker durch rApi m 1 erfasst werden (Frick et al. 2016, Kohler et al. 2014). Entsprechend muss bei dieser Auswertung auch angenommen werden, dass bei einigen Patienten trotz Hinweisen auf eine Kreuzreaktion durch homologen Proteine oder durch CCDs dennoch eine echte Doppeltsensibilisierung vorliegt. Diese zu geringe Sensitivität der Diagnostik nur mit rVes v 5 und rApi m 1 kann durch den ergänzenden Einsatz weiterer Hauptallergene in der Komponentendiagnostik gesteigert werden. So wurde z.B. berichtet, dass bei bis zu 65% der Api m 1-negativen doppeltpositiven Patienten durch eine ergänzende Diagnostik mit rApi m 3 und rApi m 10 doch eine Bienengiftallergie nachgewiesen werden kann (Frick et al. 2015). Bei den Wespengiftallergikern steigt durch die ergänzende Anwendung von rVes v 1 der Anteil der in der Komponentendiagnostik erfassten Patienten von lediglich bis zu 89,9% durch rVes v 5 alleine auf bis zu 96,3% an (Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011, Korosec et al. 2012).

Zusammenfassend ist daher zu sagen, dass neben dem Erkennen und Interpretieren von Hinweisen auf Kreuzreaktionen bei der Diagnostik einer Insektengiftallergie vor allem eine möglichst lückenlose, sehr sensitive Erfassung von echten Sensibilisierungen entscheidend ist. Hierbei spielen nach wie vor die beiden Hauptallergene Api m 1 und Ves v 5 eine entscheidende Rolle, da diese neben einer hohen Sensitivität (bis zu 79% bei Testung von Bienengiftallergikern mit rApi m 1 und bis zu 90% bei Testung von Wespengiftallergikern mit rVes v 5) auch eine sehr hohe Spezifität aufweisen (Hofmann, Pfender, Weckesser, Huss-Marp et al. 2011). Deren alleinige Anwendung zur Identifikation von Bienen- bzw. Wespengiftallergikern wird jedoch als ungenügend bewertet, da nur durch die Testung mit rApi m 1 und rVes v 5 noch viele Insektengiftallergiker unerkannt bleiben würden. Dies trifft vor allem bei den Bienengiftallergikern zu. So untersuchten Sturm et al. 40 Bienengiftallergiker und stellten fest, dass bei der Testung mit rApi m 1 sogar 32,5% nicht erkannt werden. Bei ergänzender Anwendung von rApi m 2 und nApi m 4 konnten lediglich 17,5% der Bienengiftallergiker nicht erkannt werden (Sturm, Hemmer et al. 2011). Die Autoren forderten daher eine Ausweitung der Standarddiagnostik von einer reinen Testung mit lediglich rApi m 1 auf zumindest die ergänzende Anwendung von rApi m 2, wiesen jedoch ausdrücklich darauf hin, dass die Anwendung weiterer rekombinanter Allergene die Testgenauigkeit beim Screening auf eine Bienengiftallergie weiter erhöhen würde.

5.2. Diagnostische Lücke bei der Testung mit rekombinanten Allergenen

Diese von Sturm et al. hervorgehobene diagnostische Lücke bei der Anwendung der Komponentendiagnostik (Sturm, Hemmer et al. 2011) muss möglichst geringgehalten werden, um keine relevanten Sensibilisierungen zu übersehen und im klinischen Alltag eine möglichst korrekte Therapieentscheidung treffen zu können. Bei der Diagnose einer echten Wespengiftallergie mittels der rekombinanten Allergene kann diese durch die parallele Diagnostik mit rVes v 1 und rVes v5 auf unter 4% gesenkt werden (Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011). Somit erreicht man hier durch Testung mit den beiden kommerziell erhältlichen Allergenen eine sehr hohe Sensitivität, die sogar höher ist als bei der unspezifischeren Testung mit dem gesamten Wespengiftextrakt, durch die nur ca. 83-94% der Patienten mit Wespengiftallergie erfasst werden (Bokanovic et al. 2014, Vos et al. 2013).

Bei den Bienengiftallergikern hingegen fällt die diagnostische Lücke größer aus, hier werden selbst bei der Testung mit rApi m1, rApi m2 und nApi m4 noch immer 17,5% nicht erfasst (Sturm, Hemmer et al. 2011), was den Einsatz weiterer rekombinanter Allergene zur Erhöhung der Sensitivität nahelegt. Eine entsprechende Untersuchung wurde von Kohler et al. 2014 durchgeführt, bei der 144 Bienengiftallergiker mit rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, nApi m 4, rApi m 5 und rApi m 10 getestet wurden. Durch die Anwendung dieser 6 Allergene konnten bei einem Cutoff von 0,35 kU/L 94,4% der Bienengiftallergiker korrekt diagnostiziert werden (min. ein positives Testergebnis auf eines der Allergene), die Sensitivität der Testung konnte somit deutlich gesteigert werden.

Zur Überprüfung dieser Prozentsätze und der damit verbundenen Forderung nach einer konsequenten Testung mittels eines Panels an CCD-freien Bienengiftallergenen zur Sicherung der Diagnose einer Bienengiftallergie erfolgte eine vergleichbare Untersuchung an dem hier vorliegenden Patientenkollektiv (siehe 4.4.2.).

Hierbei wurden 148 Patienten mit Bienengiftallergie bzgl. ihrer Sensibilisierungsraten auf die einzelnen Allergene untersucht. Bei Anwendung des Cutoffs von 0,35 kU/L wiesen 85,1% der hier untersuchten Bienengiftallergiker eine Sensibilisierung gegen rApi m 1, 58,8% gegen rApi m 2, 59,5% gegen rApi m 3, 27,0% gegen nApi m 4 und 33,8% gegen rApi m 5 auf. In der Literatur finden sich beschriebene Sensibilisierungsraten von 72,2-81,7% für rApi m 1, 47,9-52,2% für rApi m 2, 49,6-50,0% für rApi m 3, 22,9-28% für nApi m 4 und 58,3-61,7% für rApi m 5 (Bilo et al. 2005, Frick et al. 2016, Kohler et al. 2014). Somit zeigten sich im hier untersuchten Kollektiv höhere IgE-Reaktivitäten für rApi m 1, rApi m 2 und rApi m 3 als in

Vergleichsstudien berichtet, wodurch die Rolle dieser drei Allergene als Hauptallergene des Bienengifts sicherlich betont wird. Die IgE-Reaktivität von nApi m 4 lag mit 27,0% im erwarteten niedrigen Bereich, jedoch wiesen mit lediglich 33,8% auch vergleichsweise wenige der hier untersuchten 148 Bienengiftallergiker eine Sensibilisierung gegen rApi m 5 auf.

Bei Anwendung der Kombination aller o.g. Allergene zur Diagnostik konnten bei Anwendung des Cutoffs von 0,35 kU/L insgesamt 141 der 148 Bienengiftallergiker erfasst werden, dies entspricht einer diagnostischen Sensitivität von 95,3%. Dies liegt sogar über der von Kohler et al. erreichten Sensitivität von 94,4%, obwohl in dieser Studie die Bienengiftallergiker noch zusätzlich mit rApi m 10 getestet wurden (Kohler et al. 2014). Allerdings wurden auch hier durch die Komponentendiagnostik noch immer signifikant weniger Bienengiftallergiker als mit der Testung mittels des reinen Bienengiftextrakts erfasst, durch die in entsprechenden Studien bis zu 98-100% der von einer Bienengiftallergie betroffenen Patienten positiv getestet werden (Leimgruber et al. 1993, Müller et al. 2009). Vorteil der Komponentendiagnostik mit CCD-freien Allergenen ist jedoch sicherlich die höhere Spezifität im Gegensatz zur Testung mit dem Bienengiftextrakt. Zudem wurden in einer Studie bei Patienten mit anaphylaktischer Reaktion nach einem Bienenstich und einem entsprechenden positiven Hauttest, die dennoch bei einem Cutoff von 0,35 kU/L keine Reaktion auf den Bienengiftextrakt zeigten, in 66,7% positive Reaktionen auf rApi m 3 und in 22,2% auf rApi m 1 gefunden und somit eine Bienengiftallergie diagnostiziert (Cifuentes et al. 2014). Hierdurch zeigte sich, dass auch die Sensitivität der Testung mit dem Bienengiftgesamtextrakt eingeschränkt ist und eine ergänzende Komponentendiagnostik sicherlich stets durchgeführt werden sollte. Fraglich bleibt darüber hinaus, ob der oben beschriebene Unterschied in der Sensitivität zwischen der Testung mit dem reinen Bienengiftextrakt und der Komponentendiagnostik bei ergänzender Anwendung von rApi m 10 auch noch bestanden hätte. Zudem muss diskutiert werden, ob nicht in einigen Fällen auch die Anwendung des sensitiveren Cutoffs von 0,1 kU/L sinnvoll wäre.

Dies ist vor allem bei Insektengiftallergikern mit erhöhten basalen Serumtryptasewerten und/oder einer diagnostizierten Mastozytose wichtig, da bei diesen aufgrund niedrigerer Gesamt-IgE-Werte gehäuft falsch-negative Hauttestungen und negative sIgE-Tests auftreten (Müller et al. 1990, Potier et al. 2009). So konnte bei Patienten mit einer klinisch eindeutigen Wespengiftallergie und einer begleitenden Mastzellerkrankung nur durch die Anwendung des Cutoffs von 0,1 kU/L sowie durch die ergänzende Komponentendiagnostik mit rVes v 1 und rVes v 5 (ebenfalls mit Cutoff 0,1 kU/L) die Wespengiftallergie serologisch nachgewiesen werden. Ohne Komponentendiagnostik und bei einem Cutoff von 0,35 kU/L wurden lediglich

bei 87,8% der betroffenen Patienten sIgE-Reaktivitäten gegen Wespengift nachgewiesen, durch die ergänzende Anwendung der Komponentendiagnostik blieben bei einem Cutoff von 0,35 kU/L noch immer 8,2% der Wespengiftallergiker mit begleitender Mastzellerkrankung unerkannt (Michel et al. 2016). Dies spricht für die Anwendung des erniedrigten Cutoffs bei Hochrisikopatienten mit begleitenden Mastzellerkrankungen sowie bei Patienten mit eindeutiger klinischer Anamnese und fehlendem Korrelat in der standardmäßigen Testung. Zudem sollte bei der Entscheidung, ob ein erniedrigter Cutoff von 0,1 KU/L angewendet wird, die Höhe des Gesamt-IgE betrachtet werden. So haben spezifische IgE-Werte eine deutlich höhere Signifikanz, wenn sie bei niedrigem Gesamt-IgE statt bei sehr hohen Gesamt-IgE-Werten auftreten (Bokanovic et al. 2014).

Unstrittig ist sicherlich, dass die Herabsetzung des Cutoffs auf 0,1 kU/L mit einer erhöhten Sensitivität einhergeht. Im Rahmen dieser Auswertung konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung des Cutoffs von 0,1 kU/L 146 der 148 untersuchten Bienengiftallergiker mittels der Komponentendiagnostik erfasst werden konnten, dies entspricht einer Sensitivität von 97,3%. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied mehr zu der Testung mit dem Bienengiftextrakt. Jedoch muss bei der Anwendung im klinischen Alltag sicherlich berücksichtigt werden, dass diese erhöhte Sensitivität evtl. zu Lasten der Spezifität erreicht wird und die Möglichkeit von fälschlicherweise positiv gewerteten Ergebnissen ansteigen kann. Daher sollte vor der Anwendung von 0,1 kU/L als Cutoff stets die Indikation streng geprüft werden.

5.3. Einfluss der kreuzreaktiven Kohlenhydratseitenketten (CCDs) auf die Interpretation von Testergebnissen

Wie unter 5.1. und 5.2. dargestellt, nimmt die Komponentendiagnostik mittels rekombinanter Allergene im klinischen Alltag eine äußerst wichtige Stellung bei der Diagnostik der Insektengiftallergie ein. Jedoch ist nach wie vor die eingeschränkte Sensitivität dieser Diagnostik ein Thema und wie bereits unter 5.2. diskutiert, erfasst die reine Testung mit rekombinanten Allergenen nicht immer alle Patienten mit einer Sensibilisierung gegen den Gesamtextrakt. Bei der Bewertung dieser diagnostischen Lücke sollte jedoch ein evtl. vorliegender Einfluss von CCDs nicht vergessen werden, da diese vermutlich bei über 50%

aller Insektengiftallergiker eine wesentliche Rolle in Bezug auf das Sensibilisierungsmuster spielen (Hemmer et al. 2001) und spezifische IgE-Antikörper gegen diese alpha-1,3-Fucose-Seitenketten schätzungsweise für bis zu 75% der Doppelsensibilisierungen gegen Bienen- und Wespengift verantwortlich sind (Jappe et al. 2006). Das Vorliegen von anti-CCD IgE kann mittels eines CCD-Marker wie z.B. MUXF3 oder der Cysteinprotease Bromelain bewiesen werden (Ollert et al. 2015). Jedoch schließt das Vorhandensein einer Sensibilisierung gegen CCDs nicht aus, dass die oben beschriebene diagnostische Lücke zwischen der Testung mit dem Gesamtextrakt und der Komponentendiagnostik durch die fehlende Verfügbarkeit weiterer rekombinanter Allergene oder durch die zu geringe Sensitivität der verfügbaren rekombinanten Allergene statt durch eine CCD-Reaktion zu erklären ist (Aberer et al. 2017, Sturm, Jin et al. 2011). Eine reine CCD-Reaktion wird erst dann sicher auszuschließen sein, sobald eine Testung des Gesamtextraktes – auf die wegen der nicht vollständigen Erfassung aller Allergiker mittels der rekombinanten Allergene nicht verzichtet werden sollte – ohne gleichzeitiges Auftreten von CCD-Reaktivität möglich ist. Einen Lösungsversuch für dieses Problem stellte die Anwendung von CCD-Inhibitoren dar, die dem zu testenden Patientenserum beigemischt werden. Die CCD-Inhibitoren, die selbst die kreuzreagierenden Seitenketten tragen, konkurrieren mit der Testsubstanz (z.B. dem Insektengiftgesamtextrakt) um die Bindung der CCD-spezifischen IgE-Antikörper und können so eine Bindung des CCD-spezifischen IgE an die CCDs der Testsubstanz und somit mögliche durch die CCDs ausgelöste falsch-positive Ergebnisse verhindern (Altmann 2016). Jedoch ist bisher keine vollständige CCD-Inhibition möglich, in einer aktuellen Studie wurde diese nur in 41,9% erreicht, während bei 51,2% der untersuchten Patienten nur eine teilweise Inhibition sowie bei 7% gar keine Inhibition erreicht werden konnte (Aberer et al. 2017). Folglich sind auch weiterhin genauere Untersuchungen bzgl. der IgE-Reaktivitäten der einzelnen Allergene sowie zu der Aussagekraft von Testungen mit CCD-Markern notwendig.

Korosec et al. führten z.B. an, dass eine solche diagnostische Lücke nicht durch CCD-Reaktivität bedingt sein muss, sondern durch die mangelnde Sensitivität der verwendeten rekombinanten Allergene. So wurde dem kommerziell erhältlichen rApi m 1 (CCD-freies rApi m 1) eine zu niedrige Sensitivität für die korrekte Diagnose einer Bienengiftallergie zugeschrieben und der Einsatz verbesserter diagnostischer Tests gefordert, da durch die Testung mit nApi m 1 ein deutlich größerer Anteil (91%) der untersuchten Bienengiftallergiker als bei der Testung mit rApi m 1 (57%) erfasst wurde und sich dieser Unterschied besonders deutlich bei Patienten mit anamnestisch schwereren anaphylaktischen Reaktionen zeigte (Korosec et al. 2011). Ein Einfluss von CCDs, die im natürlichen Allergen enthalten sind,

wurde in dieser Untersuchung für nicht wahrscheinlich angesehen, da nur 9% der untersuchten Bienengiftallergiker (16 von 174) eine IgE-Reaktivität gegenüber CCDs zeigten und nur ein kleiner Teil dieser Patienten (insg. 6) auf nApi m 1 jedoch nicht auf rApi m 1 reagierten.

Die von Korosec et al. berichteten Prozentsätze decken sich mit den unter 4.5.1. aufgeführten Ergebnissen der hier untersuchten Patienten. Bewertet wurden hier die Ergebnisse bei Testung mit dem natürlichen Api m 1 sowie mit rApi m 1, das entweder in Sf9- oder in Tni-Insektenzellen hergestellt wurde. Der wesentliche Unterschied zwischen den verwendeten rekombinanten Allergenen lag bei den kreuzreaktiven Kohlenhydratseitenketten. Diese CCDs werden bei Produktion der Allergene in *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen nicht exprimiert, während sie bei Allergenen, die in *Trichoplusia ni* (Tni bzw. HighFive)-Insektenzellen produziert wurden, vorhanden sind (Seismann, Blank, Braren et al. 2010). Von den hier untersuchten 83 Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift (sIgE von 0,35 kU/L oder höher) und einer entsprechenden Anamnese wurden lediglich 57,8% bei der Testung mit CCD-freiem rekombinanten rApi m 1 (Sf9), aber 84,3% bei der Testung mit nApi m 1 erfasst. Somit lag die Sensitivität der Testung mit rApi m 1 aus Sf9-Insektenzellen in diesem Fall deutlich unterhalb der in mehreren Studien festgestellten Sensibilisierungsraten von 72,2-81,7% (Bilo et al. 2005, Frick et al. 2016, Kohler et al. 2014), während bei Testung mit nApi m 1 deutlich mehr Patienten erfasst wurden. Jedoch wurden das hier untersuchte Patientenkollektiv nicht bezüglich einer begleitend vorliegenden Sensibilisierung gegen Wespengift untersucht, während bei Korosec et al. nur Patienten verwendet wurden, die keine Sensibilisierung gegen Wespengift aufwiesen (sIgE < 0,35 kU/L). Folglich muss bei der Interpretation der hier vorliegenden Testergebnisse auf jeden Fall eine evtl. vorliegende Reaktion auf CCDs berücksichtigt werden, zumal nahezu alle der untersuchten Patienten (über 95%) mittels des CCD-tragenden rApi m 1 aus Tni-Insektenzellen positiv getestet wurden. Dies legt nahe, dass der festgestellte Unterschied zwischen den Sensibilisierungsraten auf rApi m 1 (Sf9) und nApi m 1 vor allem durch die CCD-Reaktivität der Patienten bedingt ist. Auch wiesen die Patienten, die durch nApi m 1 aber nicht durch rApi m 1 (Sf9) erfasst wurden, vor allem niedrige IgE-Reaktivitäten bei Testung mit nApi m 1 auf (Werte zwischen 0,35-3,50 kU/L, v.a. IgE-Klasse I und II, siehe Abb. 33 unter 4.5.1.). Diese geringen Differenzen in der IgE-Reaktivität, die jedoch zu einer positiven Bewertung bei Testung mit nApi m 1 führten, könnten nur durch die zusätzliche Reaktion auf CCDs bedingt sein, da es sich beim Vergleich von CCD-freiem und CCD-haltigem rApi m 1 bzgl. der Verteilung auf die verschiedenen IgE-Klassen ähnlich verhält.

5.3.1. Unterschiede zwischen CCD-negativen Patienten und Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE bei der Testung mit natürlichen und rekombinanten Allergenen

Zur Untersuchung der Rolle des CCD-Einflusses bei Testung mit nApi m 1 wurde bereits von Jakob et al. eine umfassende Auswertung der IgE-Reaktivitäten von Bienengiftallergikern durchgeführt, bei der festgestellt wurde, dass sich die IgE-Reaktivitäten gegenüber CCD-freiem rApi m 1 und natürlichem Api m 1 bei CCD-negativen Patienten mit Bienengiftallergie nicht unterscheiden (Jakob et al. 2012). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass gerade in dieser Gruppe allenfalls eine Minderheit der Bienengiftallergiker, die nicht von rApi m 1 erfasst werden, durch nApi m 1 positiv getestet werden würde und somit in der Routinediagnostik der Vorteil von CCD-freiem rApi m 1 überwiegt, da dieses keine CCD-bedingten falsch-positiven Ergebnisse liefert. Im Rahmen der unter 4.5.2. beschriebenen Auswertung der Bienengiftallergiker nach Aufteilung in CCD-negative Patienten (sIgE MUXF3 < 0,35 kU/L) und Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE (sIgE MUXF3 > 0,70 kU/L) zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis: bei Betrachtung der 44 Patienten, die kaum oder gar keine Reaktivität bzgl. des CCD-Markers MUXF3 zeigten, konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Testung mit nApi m 1 und mit dem CCD-freien rApi m 1 (Sf9) gefunden werden ($p = 0,332$). Es wurden jeweils 79,5% bzw. 68,2% der Bienengiftallergiker positiv getestet. Dies korreliert gut mit den in der Literatur für Api m 1 beschriebenen Sensibilisierungsraten von 72,2-81,7% (Bilo et al. 2005, Frick et al. 2016, Kohler et al. 2014). Hingegen waren die Unterschiede zwischen den beiden Testverfahren bei den 27 Patienten mit hohen CCD-spezifischen IgE-Werten noch größer als bei der Auswertung aller 83 Patienten mit Bienengiftsensibilisierung. Hier wurden sogar 92,6% der untersuchten Patienten mittels nApi m 1 positiv getestet (im Vergleich zu 84,3% bei Betrachtung aller Patienten), während nur 33,3% durch das CCD-freie rApi m 1 (Sf9) erfasst wurden (im Vergleich zu 57,8% bei Betrachtung aller Patienten). Zusammenfassend zeigt diese Auswertung somit deutlich, dass der Unterschied zwischen der Sensitivität einer Testung mit nApi m 1 und CCD-freiem rApi m 1 vor allem bei Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE vorliegt. Bei Patienten, die keine oder nur eine sehr niedrige CCD-Reaktivität aufweisen, konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jakob et al. auch in der hier durchgeführten Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen den Testungen mit den beiden Allergenen nachgewiesen werden. Somit kann angenommen werden, dass der Sensitivitätsunterschied zwischen nApi m 1 und dem CCD-freien rApi m 1 (Sf) bei den Patienten mit hoher CCD-Reaktivität vermutlich zu einem großen Teil auf die CCD-Reaktivität zurückzuführen ist. Jedoch darf die sehr niedrige Sensitivität von nur 33,3% bei Testung der CCD-reaktiven Patienten mit dem CCD-freien rApi

m 1 nicht vergessen werden: diese lag deutlich unter den in der Literatur berichteten Sensibilisierungsraten für Api m 1 (72,2-81,7%, siehe oben). Deshalb muss davon ausgegangen werden muss, dass in dieser Patientengruppe bei Testung mit CCD-freiem rApi m 1 einige Patienten mit einer klinisch relevanten Sensibilisierung gegen Bienengift nicht erfasst, also falsch-negativ getestet werden, und der Sensitivitätsunterschied zur Testung mit nApi m 1 nicht unbedingt allein durch die CCD-spezifische IgE-Reaktivität der Patienten erklärt werden kann.

Jedoch lag bei dieser Patientengruppe mit hohem CCD-spezifischen IgE kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Testung mit nApi m 1 und dem CCD-haltigen rApi m 1 (Tni) vor. Diese nahezu gleiche Sensitivität der Testungen mit nApi m 1 (92,6% positiv getestete Patienten) und dem CCD-haltigen rApi m 1 (Tni) (96,3% positiv getestete Patienten) bei den CCD-reaktiven Patienten unterstreichen den Einfluss der CCDs auf die Testergebnisse bei dieser Patientengruppe. Somit muss angenommen werden, dass durch nApi m 1 bei Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE falsch-positive Testergebnisse erzielt werden, die keine echte Sensibilisierung gegen Api m 1, sondern eine reine CCD-Reaktivität widerspiegeln. Gerade bei einem solchen Patientenklintel ist somit davon auszugehen, dass die Anwendung von CCD-freien rekombinanten Allergenen einen deutlichen Vorteil bzgl. der Spezifität der Testung bietet. Die oben beschriebene, evtl. zu geringe Sensitivität der Testung kann durch die zusätzliche Testung mit weiteren CCD-freien rekombinanten Allergenen ausgeglichen werden, wodurch eine Sensitivität der Testung von bis zu 95% erreicht werden kann (vgl. 4.4.2.).

Der Nachweis von hohen CCD-spezifischen IgE-Werten, z.B. durch die Testung mit MUXF3, kann somit auch eine Erklärung für eine evtl. vorliegende diagnostische Lücke zwischen der Testung mit CCD-freien rekombinanten Allergenen und mit dem CCD-enthaltenden Insektengiftgesamtextrakt liefern. Da jedoch, wie bereits oben aufgeführt, eine vorliegende CCD-Reaktivität dennoch nicht ausschließen kann, dass eine Sensibilisierung gegen ein anderes, nicht getestetes Allergen vorliegt (Aberer et al. 2017, Sturm, Jin et al. 2011), ist genau abzuwägen, ob in einem solchen Fall bei doppelt-sensibilisierten Patienten dennoch eine Hyposensibilisierung gegen beide Insektengifte eingeleitet werden sollte oder ob man aufgrund der vorliegenden CCD-Reaktivität von einer klinisch irrelevanten Kreuzreaktion ausgehen und sich gegen eine zweite Hyposensibilisierung entscheiden kann. Hier spielt sicherlich eine Rolle, ob die Höhe der vorliegenden CCD-spezifischen IgE-Antikörper in Korrelation mit der entsprechenden IgE-Reaktivität gegen die Seitenketten steht.

Unter 4.5.2. wurde bereits gezeigt, dass bei Patienten mit IgE-Werten von $< 0,35$ kU/L bei Testung mit dem CCD-Marker MUXF3 eine CCD-bedingte Kreuzreaktion nahezu ausgeschlossen werden kann. Dies unterstreicht die bereits von vielen Kollegen postulierte Notwendigkeit einer Testung bzgl. CCD-spezifischer IgE-Antikörper bei doppeltsensibilisierten Insektengiftallergikern, um eine genauere Einordnung in Bezug auf vorhandene Kreuzreaktionen zu ermöglichen (Hemmer et al. 2004, Ollert et al. 2015). Dass der CCD-Marker MUXF3 für diese Unterscheidung zwischen CCD-negativen und CCD-positiven Patienten geeignet ist, wurde bereits von Mertens et al. bewiesen: durch Testung mit MUXF3 kann bei Anwendung eines Cutoffs von $0,35$ kU/L mit einer Sensitivität von 96% und einer gleichzeitigen Spezifität von 97% zwischen CCD-negativen Patienten und Patienten mit einer vorliegenden CCD-spezifischen IgE-Reaktivität unterschieden werden (Mertens et al. 2011). Eine nähere Untersuchung der CCD-positiven Patienten bzgl. der Stärke dieser IgE-Reaktivität war nicht erfolgt. Um jedoch bei einem Patienten mit Sensibilisierung gegen den Gesamtextrakt, der bei Testung mit den rekombinanten Allergenen keine entsprechende Sensibilisierung aufweist, aus dem Nachweis von CCD-spezifischem IgE auf eine reine Kreuzreaktion schließen zu können, müsste ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Höhe des CCD-spezifischen IgE beim Patienten und der Stärke seiner IgE-Reaktivität gegen vorliegende kreuzreaktive Kohlenhydratseitenketten im entsprechenden Insektengift nachgewiesen sein.

5.3.2. Zusammenhang von Höhe der CCD-spezifischen IgE-Antikörper und Stärke der CCD-spezifischen IgE-Reaktivität beim einzelnen Patienten

Unter 4.5.3. sind die Ergebnisse des direkten Vergleichs der CCD-bezogenen IgE-Reaktivität einzelner Patienten mit der Höhe ihrer CCD-spezifischen IgE-Antikörper dargestellt. Die IgE-Reaktivität des einzelnen Patienten wurde anhand des Unterschiedes der IgE-Werte bei Bestimmung der sIgE-Werte für CCD-freie Allergene aus Sf9-Insektenzellen und für CCD-haltige Allergene aus Tni-Insektenzellen gemessen und mittels der Differenz der beiden Werte (sIgE rApi m 1 bzw. 2 (Tni) abzüglich sIgE rApi m 1 bzw. 2 (Sf9)) dargestellt. Die Höhe der beim jeweiligen Patienten vorhandenen CCD-spezifischen IgE-Antikörper wurde mittels des CCD-Markers MUXF3 gemessen. Sowohl bei der Untersuchung mit verschieden hergestelltem rApi m 1 als auch mit rApi m 2 wurden signifikant höhere sIgE-Werte durch die Testung mit

dem in Tni-Insektenzellen hergestellten, CCD-haltigen Allergenen gemessen sowie durch selbiges signifikant mehr Patienten positiv getestet, weshalb von einem eindeutigen CCD-Einfluss auf die Testergebnisse und von einer durchschnittlich erhöhten IgE-Reaktivität gegen CCDs bei den untersuchten Patienten ausgegangen werden kann. Insgesamt wiesen nur 4 Patienten bei Testung mit rApi m 1 (4,2%) und nur 6 Patienten bei Testung mit rApi m 2 (6,1%) gleich hohe oder sogar höhere Werte bei der Testung mit dem CCD-freien Allergen im Vergleich zum CCD-haltigen Allergen auf.

Für die Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Höhe des mittels MUXF3 bestimmten CCD-spezifischen IgEs und der CCD-spezifischen IgE-Reaktivität bei den einzelnen Patienten wurde sowohl für die Testung mit rApi m 1 als auch für rApi m 2 die Korrelation zwischen dem IgE-Wert für MUXF3 und der Differenz zwischen den IgE-Werten von CCD-haltigem und CCD-freiem Allergen berechnet. Patienten mit Testergebnissen von $< 0,1$ kU/L sowohl für CCD-freies Allergen (Sf9) als auch für CCD-haltiges Allergen (Tni) wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da aufgrund der komplett negativen Testergebnisse kein Rückschluss auf eine vorliegende CCD-abhängige Reaktivität gezogen werden konnte. Bei beiden Auswertungen zeigte sich eine schwache positive Korrelation zwischen der Höhe des gemessenen CCD-spezifischen IgE und der abgeschätzten IgE-Reaktivität auf die CCDs. Dies war jedoch nur bei der Auswertung der IgE-Reaktivitäten auf das verschieden hergestellte rApi m 1 signifikant.

Somit kann bei Nachweis von CCD-spezifischem IgE aus dessen Höhe nur sehr bedingt auf die Stärke einer vorhandenen CCD-bezogenen IgE-Reaktivität beim jeweiligen Patienten geschlossen werden. Aufgrund der lediglich schwachen positiven Korrelation kann daher bei der Bewertung von Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift nur bei sehr hohem CCD-spezifischen IgE davon ausgegangen werden, dass eine CCD-Reaktivität die alleinige Ursache der Doppelsensibilisierung sein kann. Mittels der durchgeführten Untersuchungen konnte somit keine wesentliche Verbesserung bei der Bewertung von doppelsensibilisierten Patienten mit nachgewiesener Reaktion auf CCDs erreicht werden.

5.4. Vergleichbarkeit verschiedener Testsysteme in der komponentenbasierten Allergiediagnostik

In der Diagnostik der Insektengiftallergiker werden aktuell zwei verschiedene Testsysteme verwendet: das weitverbreitete, nahezu standardmäßig verwendete ImmunoCAP-System (Thermo Fisher Scientific), bei dem es sich um einen Immunoassay mit fester Phase handelt, sowie das Immulite-System (Siemens), bei dem es sich um einen Immunoassay mit flüssiger Phase handelt (Ollert et al. 2005, Schrautzer et al. 2016). Mehrfach wurde in der Vergangenheit bereits die zu geringe Sensitivität des in der Routinediagnostik verwendeten rekombinanten Api m 1 für die Diagnose der Bienengiftallergie diskutiert, dies auch in Zusammenhang mit der Anwendung der verschiedenen Testsysteme. So wurden in einer Studie anhand von 266 Patienten mit Bienengiftallergie die Sensitivität von rApi m 1 bei Anwendung von CAP- und Immulite-System miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich für das ImmunoCAP-System lediglich eine Sensitivität von 68,4%, während bei gleicher Spezifität mittels des Immulite-Systems eine Sensitivität von 83,1% erzielt werden konnte (Schrautzer et al. 2016). Ähnliches zeigte sich bei einer Untersuchung von 134 Patienten mit Monosensibilisierung gegen Bienengift, bei der mittels ImmunoCAP bei Testung mit rApi m 1 lediglich 54,5% positiv getestet wurden, mittels Immulite-System jedoch 76,9%. Selbst durch die Anwendung des gesamten Panels an kommerziell verfügbaren rekombinanten Bienengiftallergenen (rApi m 1,2,3,5 und 10) lag die Sensitivität des CAP-Systems bei dieser Untersuchung mit 71,6% noch unter der Sensitivität des Immulite-Systems bei Testung nur mit rApi m 1 (Arzt et al. 2017). Diese Beobachtungen decken sich mit den unter 4.6. aufgeführten Ergebnissen beim Vergleich der rApi m 1-Testungen mittels Phadia UniCAP250 (Thermo Fisher Scientific) und Immulite2000 (Siemens Healthcare Diagnostics). Bei den untersuchten 38 Bienengiftallergikern ($IgE \geq 0,35$ kU/L bei Testung mit Bienengift und positiver Intrakutantest) zeigte sich bei Testung mit dem ImmunoCAP-System eine Sensitivität von 47,4% für rApi m 1, während beim Immulite-System eine Sensitivität von 60,5% vorlag. Dieser Unterschied war jedoch bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ nicht signifikant. Jedoch wurden bei dem Vergleich der gemessenen IgE-Werte bei der Messung mittels des ImmunoCAP-Systems signifikant niedrigere Werte als mittels des Immulite-Systems erzielt. Die für rApi m 1 gemessenen sIgE-Werte lagen jedoch bei beiden Systeme durchschnittlich deutlich unterhalb der mittels des Bienengiftgesamtextrakts gemessenen Werte.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den oben aufgeführten Studien, dass die Testung mittels des Immulite-Systems in Bezug auf die korrekte Diagnose

einer Bienengiftallergie mittels rApi m 1 deutlich sensitiver als das weitverbreitete ImmunoCAP-System ist. Jedoch muss einschränkend angeführt werden, dass die von beiden Testverfahren in der hier durchgeführten Untersuchung erzielten Sensitivitäten deutlich unterhalb der in der Literatur für Api m 1 berichteten Sensibilisierungsraten von 72,2-81,7% (Bilo et al. 2005, Frick et al. 2016, Kohler et al. 2014) liegen. Dies kann an der relativ kleinen hier untersuchten Patientenzahl liegen, weshalb die Interpretation der hier vorliegenden Ergebnisse nur eingeschränkt gelten kann.

Weitere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass eine solche bessere Sensitivität des Immulite-Systems nicht generell angenommen werden kann. So zeigte sich in der Untersuchung von Schrautzer et al. keine Überlegenheit des Immulite bei der Testung mit dem Bienengiftgesamtextrakt, zudem war der ImmunoCAP bei der Diagnostik einer Wespengiftallergie bezüglich Sensitivität und Spezifität überlegen (Schrautzer et al. 2016). Jedoch dürfen neue Untersuchungen nicht außer Acht gelassen werden, die falsch-positive Testergebnisse aufgrund von CCD-Reaktivität beim ImmunoCAP nachgewiesen haben. In einer Studie wurde gezeigt, dass die beim ImmunoCAP als solide Trägersubstanz verwendete Zellulose geringe variable Mengen an CCDs aufweist, die bei Patienten mit hohen Leveln an CCD-spezifischen IgE-Antikörpern trotz Verwendung CCD-freier Allergene falsch-positive Testergebnisse von bis zu 2 kU/L hervorrufen können (Hemmer et al. 2018). Somit muss auch eine solche falsch-positive Reaktion als mögliche Ursache der höheren Sensitivität des ImmunoCAP-Systems bei der Diagnostik der Wespengiftallergie in Betracht gezogen werden, weshalb sicherlich weitere Untersuchungen an ausreichend großen, klar definierten Patientenkollektiven notwendig sind, um eine genauere Aussage bezüglich der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Immunoassay-Systeme treffen zu können.

5.5. Übersicht über Ergebnisse und Limitationen der Arbeit

In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten zeigte sich im Rahmen der hier durchgeführten Auswertungen zur Charakterisierung der serologischen Immunreaktivität von Insektengiftallergikern mit 60,6% eine hohe Rate an Insektengiftallergikern mit Doppeltpositivität bzgl. Bienen- und Wespengift. Bei der genaueren Untersuchung dieser Patienten konnte bei 38,3% dieser Patienten die Doppeltpositivität auf eine CCD-unabhängige Kreuzreaktion durch homologe Proteine zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten konnte hier gezeigt werden, dass in diesem Rahmen auch die Hyaluronidase Api m 2 eine relevante Rolle spielt – 26,5% der doppeltpositiven Patienten wiesen eine CCD-unabhängige diesbezügliche Sensibilisierung auf, während keine Sensibilisierung gegen die ebenfalls untersuchten Dipeptidylpeptidasen Api m 5 und Ves v 3 vorlag (vgl. 4.3.2.).

Bei näherer Untersuchung der Bienengiftallergiker bzgl. der korrekten Erfassung durch die Anwendung rekombinanter Allergene konnten insg. 95,3% der Patienten mittels kombinierter Testung mit rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, nApi m 4 und rApi m 5 korrekt diagnostiziert werden. Die hier ermittelte Sensitivität der Komponentendiagnostik lag über den bisher berichteten max. 94,4% (Kohler et al. 2014), jedoch bestand noch immer ein signifikanter Unterschied zur Testung mit dem Gesamtextrakt.

Zur genaueren Einordnung der, bei der mit rekombinant hergestellten Allergenen durchgeführten Untersuchung verbliebenen, diagnostischen Lücke wurde die von Korosec et al 2011 aufgestellte These, dass diese Lücke durch die mangelnde Sensitivität der rekombinanten Allergene im Gegensatz zu natürlichen Allergenen bedingt sei, überprüft. Durch die Auswertung der hier vorliegenden Daten konnte gezeigt werden, dass bei Patienten ohne CCD-spezifischem IgE kein Unterschied zwischen einer Testung mit rApi m 1 und nApi m 1 besteht (vgl. 4.5.2.) und die o.g. These von Korosec et al. somit widerlegt werden. Bei den Patienten mit hohem CCD-spezifischen IgE wurden hingegen durch nApi m 1 signifikant mehr Bienengiftallergiker positiv getestet, der Unterschied ist jedoch durch die hier enthaltenen CCD's und nicht durch die mangelnde Sensitivität des rekombinanten Allergens zu erklären. Dies deckt sich mit den von Jakob et al. 2012 veröffentlichten Daten zur Untersuchung der Rolle des CCD-Einflusses bei Testung mit nApi m 1. Eine gute Korrelation zwischen der Höhe des CCD-spezifischen IgE und der tatsächlich beim jeweiligen Patienten vorliegenden CCD-

Reaktivität konnte jedoch nicht gefunden werden, es zeigte sich nur eine geringe positive Korrelation in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Auswertungen (vgl. 4.5.3.).

Bei dem anhand der vorliegenden Daten erfolgten Vergleich der beiden aktuell verwendeten Testsysteme konnte gezeigt werden, dass mittels des Immulite-Systems (Siemens) durchschnittlich höhere sIgE-Werte bei der Testung mit rApi m 1 als beim ImmunoCAP-System (Thermo Fisher Scientific) erzielt werden. Die Sensitivität der Testung von Bienengiftallergikern mit rApi m 1 lag bei 60,5% (Immulite) bzw. bei nur 47,4% mit dem ImmunoCAP-System. Dies deckt sich mit den Daten von Schrautzer et al. 2016 und Arzt et al. 2017. Dass dies zu einem signifikanten Unterschied bzgl. der Sensitivität zwischen den beiden Testverfahren führt, konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden.

Limitierend waren bei den durchgeführten Auswertungen die zum Teil geringen Patientenzahlen beim Vergleich verschiedener Untergruppen der einzelnen Patientenkollektive. So zeigten sich beispielsweise beim Vergleich der reinen Bienen- und Wespengiftallergiker (jeweils nur 13 Patienten) mit den doppelpositiven Patienten des Kollektivs 1 zwar Unterschiede bzgl. der durchschnittlichen sIgE-Werte für die Gesamtextrakte, das Hauptallergen Api m 1 und die Dipeptidylpeptidasen Ves v 3 und Api m 5, diese waren jedoch bei keiner Auswertung signifikant (siehe 4.1.2. und 4.1.3.).

Eine weitere Limitation der Auswertung ist sicherlich das Fehlen von sIgE-Werten für Api m 10 bei den untersuchten Patientenkollektiven, da dieses mit Sensibilisierungsraten von bis zu 61,8 % ein weiteres Hauptallergen des Bienengifts darstellt (Kohler et al. 2014) und bereits gezeigt werden konnte, dass durch die Testung mit rApi m 10 auch ein großer Teil der Api m 1-negativen Bienengiftallergiker erfasst wird (Frick et al. 2015). So konnte unter 4.4.2. zwar gezeigt werden, dass mittels der Allergene rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, nApi m 4 und rApi m 5 95,3% der Bienengiftallergiker erfasst werden, es bestand allerdings weiterhin ein signifikanter Unterschied zur Testung mit dem Bienengiftgesamtextrakt, obwohl der hier festgestellte Wert sogar über den bisher veröffentlichten max. 94,4% durch eine Kombination an verschiedenen Allergenen positiv getesteten Bienengiftallergikern lag (Kohler et al. 2014). Durch die fehlenden Daten für Api m 10 muss daher offenbleiben, ob eine ergänzende Testung mit Api m 10 noch weitere, bisher negativ getestete Bienengiftallergiker erfasst hätte und evtl. sogar die vorliegende diagnostische Lücke im Vergleich zum Gesamtextrakt vollständig geschlossen hätte. Zudem hätte eine Untersuchung der Patienten bzgl. ihrer Reaktivität auf Api

m 10 aufgrund des Fehlens eines homologen Proteins im Wespengift zur genaueren Einordnung der doppelpositiven Patienten im Hinblick auf echte Doppelsensibilisierung oder reine Kreuzreaktion unter 4.3. beitragen können.

Zudem handelte es sich bei den für die Auswertungen verwendeten Allergenen größtenteils um Prototypen für die klinische Forschung, es wurden nur in Einzelfällen Untersuchungen mittels kommerziell erhältlicher Immunoassays durchgeführt (z.B. mittels HBV/i1 und YJY/i3 der Firma Siemens Healthcare Diagnostics im Patientenkollektiv 1). Dies kann evtl. zu einer gewissen Beeinflussung der Messergebnisse und zu einer nicht vollständigen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Anwendung der kommerziell erhältlichen Produkte geführt haben.

6. Zusammenfassung

Durch die hier erfolgte Untersuchungen der verschiedenen IgE-Reaktivitäten von insgesamt 269 Patienten mit Bienen- und/oder Wespengiftallergie konnte ein umfangreicher Überblick über die serologische Immunreaktivität der Insektengiftallergiker gewonnen und diese bzgl. auftretender Unterschiede zwischen Einfach- und Doppeltsensibilisierten sowie zwischen Patienten mit und ohne CCD-spezifischer IgE-Reaktivität untersucht werden. Zudem konnten weiterführende Untersuchungen bzgl. der Sensitivität und Spezifität der Komponentendiagnostik sowie verschiedener, hierfür verwendeter Testsysteme durchgeführt werden.

Beim Vergleich von Patienten mit Monosensibilisierung gegen Bienen- oder Wespengift mit doppeltsensibilisierten Patienten zeigten sich bei den Doppeltpositiven durchschnittlich höhere sIgE-Werte bei Testung mit den Gesamtextrakten sowie mit den Dipeptidylpeptidasen Ves v 3 und Api m 5. Zwar waren diese Unterschiede in der hier durchgeführten Auswertung aufgrund der vermutlich zu niedrigen Fallzahlen bei den monosensibilisierten Patienten nicht signifikant, jedoch weisen diese durchschnittlich erhöhten Werte auf einen deutlichen Einfluss von Kreuzreaktionen auf homologe Proteine beim Auftreten doppeltpositiver Testergebnisse in der Routinediagnostik mittels der Insektengiftgesamtextrakte hin. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Arzt et al., die beim Vergleich von Bienengiftallergikern mit doppeltsensibilisierten Patienten mehr als 2-fach erhöhte Werte für Api m 5 bei den Doppeltsensibilisierten feststellten (Arzt et al. 2017). Da bei der Diagnostik mittels Bienen- und Wespengift durchschnittlich 30-59% (Egner et al. 1998, Müller et al. 2009) oder, wie im Rahmen dieser Untersuchung gemessen, sogar bis zu 60,6% der Patienten eine solche Doppeltpositivität aufweisen, sollten mögliche Kreuzreaktionen auf homologe Proteine bei der Interpretation der Testergebnisse stets in Betracht gezogen werden. Dies wurde von den unter 4.3. durchgeführten Untersuchungen noch unterstrichen, bei denen bei 11,8% der untersuchten doppeltpositiven Patienten in der Komponentendiagnostik eine Kreuzreaktion auf die Dipeptidylpeptidasen nachgewiesen wurde. Zudem konnte eine nicht zu vernachlässigende Rolle einer Sensibilisierung gegen Api m 2 und somit einer möglichen Kreuzreaktion auf das homologe Ves v 2 bei den doppeltpositiven Patienten aufgezeigt werden: 26,5% der doppeltpositiven Patienten wiesen bei einem Cutoff von 0,35 kU/L eine Sensibilisierung gegen Api m 2 auf, während bei ihnen keine Reaktivität bzgl. der nicht-kreuzreaktiven Allergene Api m 1 und Ves v 5 oder bzgl. der Dipeptidylpeptidasen vorlag. Da zudem ein CCD-freies, rekombinant hergestelltes Api m 2 für die Auswertung verwendet wurde, kann ein Einfluss von

CCD-Reaktivität auf das Ergebnis ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis liegt im Widerspruch mit bisherigen Studien, die den größten Teil von positiven Reaktionen auf die Hyaluronidasen auf CCD-bedingte Kreuzreaktionen zurückführen und nur eine geringe Reaktion durch die Peptidpitope postulieren (Arzt et al. 2017, Jin et al. 2010). Jedoch wird eine Beurteilung von doppelpositiven Patienten bzgl. Kreuzreaktionen aufgrund von homologen Proteinen in der Routinediagnostik weiterhin nur eingeschränkt möglich sein, da die kreuzreaktiven Allergene Ves v 2 und Ves v 3 noch nicht kommerziell erhältlich sind (Blank et al. 2018).

Ein weiteres Problem in der Routinediagnostik stellte die häufig im Vergleich zur Testung mit dem Gesamtextrakt zu geringe Sensitivität der Komponentendiagnostik und die korrekte Interpretation der hierdurch entstehenden diagnostischen Lücke, v.a. in Bezug auf eine mögliche CCD-bedingte Reaktion, dar. Wird nur mit den Hauptallergenen Ves v 5 und Api m 1 getestet, bestehen zum Teil große Unterschiede zur Testung mit dem Gesamtextrakt. Bei den Wespengiftallergikern konnte dieses Problem durch den ergänzenden Einsatz von Ves v 1 nahezu behoben werden, hierdurch wird eine Sensitivität von bis zu 96,3% erreicht (Hofmann, Pfender, Weckesser, Blank et al. 2011, Korosec et al. 2012). Bei den Bienengiftallergikern konnte selbst bei Anwendung aller für die Diagnostik verfügbaren Allergene bisher nur eine Sensitivität von 94,4% gezeigt werden (Kohler et al. 2014). In der hier durchgeführten Untersuchung von 148 Bienengiftallergikern konnten mittels Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 4 und Api m 5 sogar 95,3% erfasst werden. Der jedoch noch signifikante Unterschied zur Testung mit dem Bienengift könnte durch den begleitenden Einsatz von Api m 10 evtl. beseitigt werden. Eine Absenkung des Cutoffs auf 0,1 kU/L bei der Komponentendiagnostik führte in dieser Untersuchung zu einer Sensitivität von 97,3%, die keinen signifikanten Unterschied mehr zur Testung mit dem Gesamtextrakt aufwies. Allerdings darf nicht vernachlässigt werden, dass die Sensitivität der Komponentendiagnostik auch vom angewendeten Testverfahren abhängig ist. Die unter 4.6. festgestellten Ergebnisse bestätigten vorhandene Untersuchungen zur abweichenden Sensitivität in Bezug auf das angewendete Testsystem: mittels des in der klinischen Routine häufig angewendeten ImmunoCAP-Systems wurden beim Vergleich der IgE-Reaktivitäten auf rApi m 1 durchschnittlich signifikant niedrigere sIgE-Werte als mit dem Immulite-System gemessen. Im hier untersuchten Patientenkollektiv konnte zudem ein deutlicher Unterschied zwischen der jeweils erreichten Sensitivität festgestellt werden, die höhere Sensitivität des Immulite-Systems war jedoch nicht signifikant. Dies kann allerdings durch die relativ geringe Anzahl an untersuchten Patienten bedingt sein.

Bei der Interpretation der diagnostischen Lücke zwischen der Testung mit dem Gesamtextrakt und der Komponentendiagnostik darf jedoch auch ein Einfluss von CCDs bei Testung mit dem Gesamtextrakt nicht vernachlässigt werden. In der hier durchgeführten Untersuchung von 83 Patienten mit Sensibilisierung gegen Bienengift zeigte sich beispielsweise kein signifikanter Unterschied zwischen der Testung mit dem Gesamtextrakt und der Testung mit dem CCD-haltigen rApi m 1 aus Tni-Insektenzellen. Hingegen wurden durch das CCD-freie rApi m 1 signifikant weniger Patienten positiv getestet und durchschnittlich niedrigere sIgE-Werte gemessen. Jedoch wurden auch durch das natürliche und daher CCD-haltige nApi m 1 signifikant weniger Patienten als mittels rApi m 1 (Tni) erfasst, allerdings noch immer deutlich mehr als mit dem CCD-freien Allergen. Dieser Unterschied zwischen der Testung mit dem CCD-freien Api m 1 (Sf9) und dem natürlichen Api m 1 lag bei Auswertung der Testergebnisse von Patienten ohne IgE-Antikörper gegen CCDs nicht mehr vor, verstärkte sich allerdings bei Betrachtung von Patienten mit hoher CCD-spezifischer IgE-Reaktivität. Somit konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung von CCD-freien rekombinanten Allergenen in der Routinediagnostik eine bessere Spezifität bzgl. echter Sensibilisierungen auf das jeweilige Insekt als mittels Gesamtextrakt oder natürlichen Allergenen erreicht wird. Eine hohe CCD-Reaktivität kann somit eine Erklärung für eine diagnostische Lücke zwischen der Testung mit dem Gesamtextrakt und mit CCD-freien rekombinanten Allergenen liefern. Jedoch kann diese eine evtl. begleitend vorliegende Sensibilisierung gegen ein nicht getestetes Allergen nicht ausschließen. Aus diesem Grund wird die Interpretation von Testergebnissen bzgl. CCD-abhängiger Kreuzreaktionen weiterhin eine Herausforderung darstellen, zumal in der unter 4.5.3. durchgeführten Auswertung nur eine geringe positive Korrelation zwischen der Höhe der beim Patienten vorliegenden CCD-Reaktivität und der mittels eines CCD-Markes bestimmten Höhe von CCD-spezifischem IgE nachgewiesen werden konnte.

7. Literaturverzeichnis

- Aberer W, Holzweber F, Hemmer W, Koch L, Bokanovic D, Fellner W, Altmann F. *Inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) enhances the accuracy of in vitro allergy diagnosis*. *Allergol select*. 2017. 1(2): 141-149
- Altmann F. *The role of protein glycosylation in allergy*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007. 142(2): 99-115
- Altmann F. *Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis*. *Allergo J Int*. 2016. 25(4): 98-105
- Arzt L, Bokanovic D, Schrautzer C, Schwarz I, Laipold K, Aberer W, Sturm GJ. *Questionable diagnostic benefit of the commercially available panel of bee venom components*. *Allergy*. 2017. 72(9): 1419-1422
- Batanero E, Villalba M, Monsalve RI, Rodriguez R. *Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: Evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen*. *J Allergy Clin Immunol*. 1996. 97(6): 1264-1271
- Bilo B M, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude Elberink J N. *Diagnosis of Hymenoptera venom allergy*. *Allergy*. 2005. 60(11): 1339-1349
- Bilo M B, Martini M, Pravettoni V, Bignardi D, Bonadonna P, Cortellini G, Kosinska M, Macchia D, Mauro M, Meucci E, Nittner-Marszalska M, Patella V, Pio R, Quercia O, Reccardini F, Ridolo E, Rudenko M, Severino M. *Large local reactions to Hymenoptera stings: Outcome of re-stings in real life*. *Allergy*. 2019. 74(10): 1969-1976
- Blank S, Bantleon F I, McIntyre M, Ollert M, Spillner E. *The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of Apis mellifera venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity*. *Clin Exp Allergy*. 2012. 42(6): 976-985
- Blank S, Bilo M B, Ollert M. *Component-resolved diagnostics to direct in venom immunotherapy: Important steps towards precision medicine*. *Clin Exp Allergy*. 2018. 48(4): 354-364
- Blank S, Haemmerle S, Jaeger T, Russkamp D, Ring J, Schmidt-Weber C, Ollert M. *Prevalence of Hymenoptera venom allergy and sensitization in the population-representative German KORA cohort*. *Allergo J Int*. 2019. 28(6): 183-191
- Blank S, Seismann H, Bockisch B, Braren I, Cifuentes L, McIntyre M, Ruhl D, Ring J, Bredehorst R, Ollert M, Grunwald T, Spillner E. *Identification, recombinant expression and characterization of the 100 kDa high molecular weight Hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3*. *J Immunol*. 2010. 184(9): 5403-5413
- Blank S, Seismann H, McIntyre M, Ollert M, Wolf S, Bantleon F I, Spillner E. *Vitellogenins are new high molecular weight components and allergens (Api m 12 and Ves v 6) of Apis mellifera and Vespula vulgaris venom*. *PLoS One*. 2013. 8(4):e62009. doi: 10.1371/journal.pone.0062009

Blank S, Seismann H, Michel Y, McIntyre M, Cifuentes L, Braren I, Grunwald T, Darsow U, Ring J, Bredehorst R, Ollert M, Spillner W. *Api m 10, a genuine A. mellifera venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts*. *Allergy*. 2011. 66(10): 1322-1329

Bokanovic D, Schwarz I, Wutte N, Komericki P, Aberer W, Sturm GJ. *Specificity of conventional and Ves v 5-spiked venom decreases with increasing total IgE*. *J Allergy Clin Immunol*. 2014. 134(3): 739-741

Brehler R, Grundmann S, Stocker B. *Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013. 13(4): 360-364

Brockow K, Jofer C, Behrendt H, Ring J. *Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients*. *Allergy*. 2008. 63(2): 226-232

Caplan E L, Ford J L, Young P F, Ownby D R. *Fire ants represent an important risk for anaphylaxis among residents of an endemic region*. *J Allergy Clin Immunol*. 2003. 111(6): 1274-1277

Cifuentes L, Vosseler S, Blank S, Seismann H, Pennino D, Darsow U, Bredehorst R, Ring J, Mempel M, Spillner E, Ollert MW. *Identification of Hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to venom extract by using recombinant allergens*. *J Allergy Clin Immunol*. 2014. 133(3): 909-910

de Graaf D C, Aerts M, Danneels E, Devreese B. *Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy*. *J Proteomics*. 2009. 72(2): 145-154

Dhami S, Zaman H, Varga E M, Sturm G J, Muraro A, Akdis C A, Antolin-Amerigo D, Bilo M B, Bokanovic D, Calderon M A, Cichocka-Jarosz E, Oude Elberink J N, Gawlik R, Jakob T, Kosnik M, Lange J, Mingomataj E, Mitsias D, Mosbech H, Ollert M, Pfaar O, Pitsios C, Pravettoni V, Roberts G, Rueff F, Sin B A, Asaria M, Netuveli G, Sheikh A. *Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis*. *Allergy*. 2017. 72(3): 342-365

Dubois A E. *Investigational and clinical use of the sting challenge*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003. 3(4): 283-285

Dudler T, Chen WQ, Wang S, Schneider T, Annand RR, Dempcy RO, Cramer R, Gmachl M, Suter M, Gelb MH. *High-level expression in Escherichia coli and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2*. *Biochim Biophys Acta*. 1992. 1165(2): 201-210

Eberlein B. *Basophil activation test in the diagnosis of insect venom allergies*. *Clin Exp Allergy*. 2009. 39(11): 1633-1634

Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. *Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants*. *J Allergy Clin Immunol*. 2012. 130(1): 155-161

Eberlein B, Thomas P. *Zelluläre Diagnostik in der Allergologie*. In: "Allergologie", Biedermann T, Heppt W, Renz H, Röcken M (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2016, 2. Auflage, S. 565-571

Eberlein-König B, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. *Use of CD63 expression as marker of in vitro basophil activation in identifying the culprit in insect venom allergy*. J Investig Allergol Clin Immunol. 2004. 14(1): 10-16

Eberlein-König B, Schmidt-Leidescher C, Rakoski J, Behrendt H, Ring J. *In vitro basophil activation using CD63 expression in patients with bee and wasp venom allergy*. J Investig Allergol Clin Immunol. 2006. 16(1): 5-10

Ebo D G, Faber M, Sabato V, Leysen J, Bridts C H, Clerck L S. *Component-resolved diagnosis of wasp (yellow jacket) venom allergy*. Clin Exp Allergy. 2013. 43(2): 255-261

Egner W, Ward C, Brown D L, Ewan P W. *The frequency and clinical significance of specific IgE to both wasp (Vespula) and honey-bee (Apis) venoms in the same patient*. Clin Exp Allergy. 1998. 28(1): 26-34

Eiken P, Mosbech H, Jacobsen L, Larsen P, Scharling B, Svendsen UG, Soes-Petersen U. *Comparison between two different assays for measurements of allergen-specific IgE and skin prick test in the diagnosis of insect venom allergy*. Allergy. 1992. 47(5): 495-497

Elieh Ali Kombi D, Shafaghat F, Zwiener R D. *Immunology of Bee Venom*. Clin Rev Allergy Immunol. 2017. doi: 10.1007/s12016-017-8597-4

Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. *The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy*. Allergy. 2004. 59(10): 1102-1109

Frick M, Fischer J, Helbling A, Rueff F, Wiczorek D, Ollert M, Pfützner W, Müller S, Huss-Marp J, Dorn B, Biedermann T, Lidholm J, Ruecker G, Bantleon F, Mieke M, Spillner E, Jakob T. *Predominant Api m 10 sensitization as a risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol. 2016. 138(6): 1663-1671.e9

Frick M, Muller S, Bantleon F, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, Jakob T. *rApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom*. Allergy. 2015. 70(12): 1665-1668

Georgitis JW, Reisman RE. *Venom skin tests in insect-allergic and insect-nonallergic populations*. J Allergy Clin Immunol. 1985. 76(6): 803-807

Goldberg A und Confino-Cohen R. *Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1997. 100(2): 182-184

Grunwald T, Bockisch B, Spillner E, Ring J, Bredehorst R, Ollert MW. *Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3)*. J Allergy Clin Immunol. 2006. 117(4): 848-854

Hemmer W, Altmann F, Holzweber F, Gruber C, Wantke F, Wöhrl S. *ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anit-CCD IgE antibody levels.* J Allergy Clin Immunol. 2018. 141(1): 372-381.e3

Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson I B H, Altmann F, Wöhrl S, Götz M, Jarisch R. *Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy.* J Allergy Clin Immunol. 2001. 108(6): 1045-1052

Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Dalik I, Götz M, Jarisch R. *Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom.* Clin Exp Allergy. 2004. 34(3): 460-469

Hoffman D R, Jacobson R S *Allergens in Hymenoptera venom: XII. How much protein is in a sting?* Ann Allergy. 1984. 52: 276-278

Hoffman D R, El-Choufani S E, Smith M M, de Groot H. *Occupational allergy to bumblebees: Allergens of Bombus terrestris.* J Allergy Clin Immunol. 2001. 108(5): 855-860

Hoffman D R, Shipman W H. *Allergens in bee venom. I. Separation and identification of the major allergens.* J Allergy Clin Immunol. 1976. 58(5): 551-562

Hoffman D R, Shipman W H, Babin D. *Allergens in bee venom II. Two new high molecular weight allergenic specificities.* J Allergy Clin Immunol. 1977. 59(2): 147-153

Hofmann S C, Pfender N, Weckesser S, Blank S, Huss-Marp J, Spillner E, Jakob T. *Reply.* J Allergy Clin Immunol. 2011. 128(1): 248

Hofmann S C, Pfender N, Weckesser S, Huss-Marp J, Jakob T. *Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy.* J Allergy Clin Immunol. 2011. 127(1): 265-267

Jakob T, Köhler J, Blank S, Magnusson U, Huss-Marp J, Spillner E, Lidholm J. *Comparable IgE reactivity to natural and recombinant Api m 1 in cross-reactive carbohydrate determinant-negative patients with bee venom allergy.* J Allergy Clin Immunol. 2012. 130(1): 276-278

Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hübsch-Müller C, Enk A. *In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition.* Allergy. 2006. 61(10): 1220-1229

Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. *Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy.* J Allergy Clin Immunol. 2010. 125(1): 184-190.e1

Kettner A, Hughes G, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, Corradin G. *Api m 6: A new bee venom allergen.* J Allergy Clin Immunol. 2001. 107(5): 914-920

King T P, Lu G, Gonzalez M, Qian N, Soldatova L. *Yellow jacket venom 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. 1996. 98(3): 588-600

King T P, Alagon A C, Kuan J, Sobotka A K, Lichtenstein L M. *Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins.* Mol Immunol. 1983. 20(3): 297-308

Knol EF, Mul FPJ, Jansen H, Calafat J, Roos D. *Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435.* J Allergy Clin Immunol. 1991. 88(3 Pt 1): 328-338

Kochuyt A M, Van Hoeyveld E M, Stevens E A M. *Prevalence and clinical relevance of specific immunoglobulin E to pollen caused by sting-induced specific immunoglobulin E to cross-reacting carbohydrate determinants in Hymenoptera venoms.* Clin Exp Allergy. 2005. 35(4): 441-447

Kohler J, Blank S, Muller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, Jakob T. *Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy.* J Allergy Clin Immunol. 2014. 133(5): 1383-1389

Kolarich D, Leonard R, Hemmer W, Altmann F. *The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in Vespula vulgaris.* FEBS J. 2005. 272(20): 5182-5190

Korosec P, Silar M, Erzen R, Celesnik N, Bajrovic N, Zidarn M, Kosnik M. *Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of Hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE Antibodies.* Int Arch Allergy Immunol. 2013. 161(4): 363-368

Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Erzen R, Zidarn M, Kosnik M. *Low sensitivity of commercial available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy.* J Allergy Clin Immunol. 2011. 128(3): 671-673

Korosec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Silar M, Zidarn M, Kosnik M. *High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of Vespula venom allergy.* J Allergy Clin Immunol. 2012. 129(5): 1406-1408

Kosnik M und Korosec P. *Importance of basophil activation testing in insect venom allergy.* Allergy Asthma Clin Immunol. 2009. 5(1): 11

Leimgruber A, Lantin JP, Frei PC. *Comparison of two in vitro assays, RAST and CAP, when applied to the diagnosis of anaphylactic reactions to honeybee or yellow jacket venoms.* Allergy. 1993. 48(6): 415-420

Leimgruber A, Mosimann B, Claeys M, Seppely M, Jaccard Y, Aubert V, Peitrequin R, Nisoli MP, Pécoud A. *Clinical evaluation of a new in-vitro assay for specific IgE, the immuno CAP system.* Clin Exp Allergy. 1991. 21(1): 127-131

Ludolph-Hauser D, Ruëff F, Fries C, Schöpf P, Przybilla B. *Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings.* The Lancet. 2001. 357(9253): 361-362

- Mari A. *Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001. 125(1): 57-65
- Mari A. *IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002. 129(4): 286-295
- Mauss V. *Bionomie und Abwehrverhalten der in Deutschland vorkommenden allergologisch bedeutsamen Bienen und Faltenwespen*. *Der Hautarzt*. 2008. 59(3): 184-193
- Mertens M, Brehler R. *Suitability of different glycoproteins and test systems for detecting cross-reactive carbohydrate determinant-specific IgE in Hymenoptera venom allergic-patients*. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011. 156(1): 43-50
- Michel J, Brockow K, Darsow U, Ring J, Schmidt-Weber CB, Grunwald T, Blank S, Ollert M. *Added sensitivity of component-resolved diagnosis in hymenoptera venom-allergic patients with elevated serum tryptase and/or mastocytosis*. *Allergy*. 2016. 71(5): 651-660
- Mittermann I, Zidarn M, Silar M, Markovic-Housley Z, Aberer W, Korosec P, Kosnik M, Valenta R. *Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy*. *J Allergy Clin Immunol*. 2010. 125(6): 1300-1307
- Mosbech H, Christensen J, Dirksen A, Soborg M. *Insect allergy. Predictive value of diagnostic tests: a three-year follow-up study*. *Clin Allergy*. 1986. 16(5): 433-440
- Müller U, Helbling A, Hunziker T, Wüthrich B, Péroud A, Gilardi S, Beretta E, Fasel J, Messerli W, Maurer P. *Mastocytosis and atopy: a study of 33 patients with urticaria pigmentosa*. *Allergy*. 1990. 45(8): 597-603
- Müller U, Schmid-Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A. *IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1 and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy*. *Allergy*. 2012. 67(8): 1069-1073
- Müller U R. *Insect venoms*. *Chem Immunol Allergy*. 2010. 95: 141-156
- Müller U R, Johansen N, Petersen A B, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. *Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and vespula venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m 1 and Ves v 5*. *Allergy*. 2009. 64(4): 543-548
- Nassiri M, Babina M, Dolle S, Edenharter G, Rueff F, Worm M. *Ramipril and metoprolol intake aggravate human and murine anaphylaxis: evidence for direct mast cell priming*. *J Allergy Clin Immunol*. 2015. 135(2): 491-499
- Niedoszytko M, Bonadonna P, Oude Elberink J N, Golden D B K. *Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Hymenoptera Venom Allergy in Mastocytosis Patients*. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2014. 34(2): 365-381
- Niedoszytko M, de Monchy J, van Doormaal J J, Jassem E, Oude Elberink J N. *Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy*. *Allergy*. 2009. 64(9): 1237-1245

Ollert M, Blank S. *Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics*. Current Allergy and Asthma Reports. 2015. 15(5): 26

Ollert M, Weissenbacher S, Rakosko J, Ring J. *Allergen-specific IgE measured by a continuous random-access immunoanalyzer: interassay comparison and agreement with skin testing*. Clin Chem. 2005. 51(7): 1241-1249

Paull B R, Yunginger J W, Gleich G J. *Melittin: an allergen of honeybee venom*. J Allergy Clin Immunol. 1977. 59(4): 334-338

Perez-Riverol A, Justo-Jacomini DL, Zollner RdL, Brochetto-Braga MR. *Facing Hymenoptera Venom Allergy: From natural to rekombinant allergens*. Toxins (Basel). 2015. 7(7): 2551-2570

Plebani M, Bernardi D, Basso D, Borghesan F, Faggian D. *Measurement of specific immunoglobulin E: intermethod comparison and standardization*. Clin Chem. 1998. 44(9): 1974-1979

Potier A, Lavigne C, Chappard D, Verret JL, Chevaller A, Nicolie B, Drouet M. *Cutaneous manifestations in Hymenoptera and Diptera anaphylaxis: relationship with basal serum tryptase*. Clin Exp Allergy. 2009. 39(5): 717-725

Przybilla B, Ruëff F. *Erkrankungen durch Bienen- und Wespenstiche*. In: "Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie", Plewig G, Landthaler M, Burgdorf W H C, Hertl M, Ruzicka T (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2012, 6. Auflage, S. 437-441

Przybilla B, Ruëff F. *Bienen- und Wespengiftallergie, Diagnose und Therapie nach Leitlinie*. In: "Allergologie kompakt", Darsow U, Raap U (Hrsg.), Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, 2016, S. 203-220

Przybilla B, Ruëff F, Walker A, Räwer H C, Aberer W, Bauer C P, Berdel D, Biedermann T, Brockow K, Forster J, Fuchs Th, Hamelmann E, Jakob T, Jarisch R, Merk H F, Müller U, Ott H, Sitter W, Urbanek R, Wedi B. *Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) in Zusammenarbeit mit der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI) und der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI)*. Allergo Journal. 2011. 20: 318-339

Pucci S, Antonicelli L, Bilo M B, Garritani M S, Bonifazi F. *Shortness of interval between two stings as risk factor for developing Hymenoptera venom allergy*. Allergy. 1994. 49(10): 894-896

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. 1999. 120(2): 166-168

Ring J, Messmer K. *Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes*. Lancet. 1977. 1(8009): 466-469

Ruëff F, Przybilla B. *Stichprovokation*. Der Hautarzt. 2014. 65(9): 796

Ruëff F, Przybilla B, Biló M B, Müller U, Scheipl F, Aberer W, Birnbaum J, Bodzenta-Lukaszyk A, Bonifazi F, Bucher C, Campi P, Darsow U, Egger C, Haerberli G, Hawranek T, Korner M, Kucharewicz I, Kuchenhoff H, Lang R, Quercia O, Reider N, Severino M, Sticherling M, Sturm G J, Wuthrich B. *Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol. 2009. 124(5): 1047-1054

Ruëff F, Wenderoth A, Przybilla B. *Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses*. J Allergy Clin Immunol. 2001. 108(6): 1027-1032

Schäfer T. *Epidemiologie der Insektengiftallergie*. Allergo Journal. 2009. 18(5): 353-358

Schiener M, Hilger C, Eberlein B, Pascal M, Kuehn A, Revets D, Planchon S, Pietsch G, Serrano P, Moreno-Aguilar C, de la Roca F, Biedermann T, Darsow U, Schmidt-Weber C, Ollert M, Blank S. *The high molecular weight dipeptidyl peptidase IV Pol d 3 is a major allergen of Polistes dominula venom*. Sci rep. 2018. 8(1): 1318

Schrautzer C, Bokanovic D, Hemmer W, Lang R, Hawranek T, Schwarz I, Aberer W, Sturm E, Sturm GJ. *Sensitivity and specificity of Hymenoptera allergen components depend on the diagnostic assay employed*. J Allergy Clin Immunol. 2016. 137(5): 1603-1605

Schumacher M J, Tveten M S, Egen N B. *Rate and quality of delivery of venom from honeybee stings*. J Allergy Clin Immunol. 1994. 93: 831-835

Seismann H, Blank S, Braren I, Greunke K, Cifuentes L, Grunwald T, Bredehorst R, Ollert M, Spillner E. *Dissecting cross-reactivity in hymenoptera venom allergy by circumvention of α -1,3-core fucosylation*. Mol Immunol. 2010. 47(4): 799-808

Seismann H, Blank S, Cifuentes L, Braren I, Bredehorst R, Grunwald T, Ollert M, Spillner E. *Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity*. Clin Mol Allergy. 2010. 8: 7

Seppala U, Selby D, Monsalve R, King T P, Ebner C, Roepstorff P, Bohle B. *Structural and immunological characterization of the N-glycans from the major yellow jacket allergen Ves v 2: The N-glycan structures are needed for the human antibody recognition*. Mol Immunol. 2009. 46(10): 2014-2021

Siracusa A, Folletti I, Gerth van Wijk R, Jeebhay M F, Moscato G, Quirce S, Raulf M, Ruëff F, Walusiak-Skorupa J, Whitaker P, Tarlo S M. *Occupational anaphylaxis - an EAACI task force consensus statement*. Allergy. 2015. 70(2): 141-152

Soldatova LN, Cramer R, Gmachl M, Kemeny D, Schmidt M, Weber M, Mueller U. *Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressend*

- in baculovirus-infected insect cells as compared with Escherichia coli*. J Allergy Clin Immunol. 1998. 101(5): 691-698
- Spillner E, Blank S, Jakob T. *Hymenoptera Allergens: From Venom to "Venome"*. Front Immunol. 2014. 5: 77
- Sturm GJ, Bohm E, Trummer M, Weiglhofer I, Heinemann A, Aberer M. *The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study*. Allergy. 2004. 59(10): 1110-1117
- Sturm GJ, Hemmer W, Hawranek T, Lang R, Ollert M, Spillner E, Blank S, Bokanovic D, Aberer W. *Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee from wasp venom allergy*. J Allergy Clin Immunol. 2011. 128(1): 247-248
- Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, Heinemann A, Vollmann J, Altmann F, Crailsheim K, Focke M, Aberer M. *Inconsistent results of daignostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy*. PLoS One. 2011. 6(6): e20842
- Sturm GJ, Kranzelbinder B, Schuster C, Sturm EM, Bokanovic D, Vollmann J, Crailsheim K, Hemmer W, Aberer W. *Sensitization to Hymenoptera venoms is common, but systemic sting reactions are rare*. J Allergy Clin Immunol. 2014. 133(6): 1635-1643
- Tomsitz D, Brockow K. *Component Resolved Diagnosis in Hymenoptera Anaphylaxis*. Curr Allergy Asthma Rep. 2017. 17(6): 38
- Valenta R, Kraft D. *Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases*. Curr Opin Immunol. 1995. 7(6): 751-756
- Valenta R, Kraft D. *From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy*. Curr Opin Immunol. 2002. 14(6): 718-727
- Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. *The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapie (CRD and CRIT)*. Clin Exp Allergy. 2001. 29(7): 896-904
- van der Linden P W, Hack E, Struyvenberg A, van der Zwan J K. *Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol. 1994. 94(2): 151-159
- van Ree R. *Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases*. Int Arch Allergy Immunol. 2002. 129(3): 189-197
- Van Vaerenbergh M, Debyser G, Devreese B, de Graaf D C. *Exploring the hidden honeybee (Apis mellifera) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS*. J Proteomics. 2014. 99: 169-178
- Van Vaerenbergh M, Debyser G, Devreese B, de Graaf D C. *Unraveling the venom proteome of the bumblebee (Bombus terrestris) by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FT-ICR-MS*. Toxicon. 2015. 102: 81-88

Vos B, Köhler J, Müller S, Stretz E, Rueff F, Jakob T. *Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to Vespula venom.* J Allergy Clin Immunol. 2013. 131(4): 1225-1227

Wiese M D, Brown S G, Chataway T K, Davies N W, Milne R W, Aulfrey S J, Heddle R J. *Myrmecia pilosula (Jack Jumper) ant venom: identification of allergens and revised nomenclature.* Allergy. 2007. 62(4): 437-443

Winningham K M, Fitch C D, Schmidt M, Hoffman D R. *Hymenoptera venom protease allergens.* J Allergy Clin Immunol. 2004. 114(4): 928-933

Wölbing F, Fischer J, Köberle M, Kaesler S, Biedermann T. *About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis.* Allergy. 2013. 68(9): 1085-1092

Worm M, Eckermann O, Dolle S, Aberer W, Beyer K, Hawranek T, Hompes S, Koehli A, Mahler V, Nemat K, Niggemann B, Pfohler C, Rabe U, Reissig A, Rietschel E, Scherer K, Treudler R, Ruëff F. *Triggers and treatment of anaphylaxis: an analysis of 4,000 cases from Germany, Austria and Switzerland.* Dtsch Arztebl Int. 2014. 111(21): 367-375

Worm M, Edenharter G, Ruëff F, Scherer K, Pfohler C, Mahler V, Treudler R, Lang R, Nemat K, Koehli A, Niggemann B, Hompes S. *Symptom profile and risk factors of anaphylaxis in Central Europe.* Allergy. 2012. 67(5): 691-698

Wypych J I, Abeyounis C J, Reisman R E. *Analysis of differing patterns of cross-reactivity of honeybee and yellow jacket venom-specific IgE: use of purified venom fractions.* Int Arch Allergy Appl Immunol. 1989. 89(1): 60-66

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Ollert für die freundliche Überlassung des Themas und die große Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ich bedanke mich für die konstruktive Zusammenarbeit, die mit den ersten gemeinsamen Ideen zur Datenauswertung begann und bis zur abschließenden Korrektur meiner Arbeit fortgesetzt wurde, sowie für seine große Hilfe während des gesamten Zeitraumes, die sehr zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation beigetragen hat.

Zudem möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern und meinem Mann für ihr Interesse an meiner Arbeit sowie für ihre immerwährende Unterstützung während der Zeit meines Studiums, meiner ersten Jahre im Berufsleben und meiner Arbeit an der Dissertation von Herzen danken.