

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten-Allgemeine Dermatologie und Venerologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. T. Luger-

Die prognostische Wertigkeit des Immunoblot im Rahmen der Allergiediagnostik

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Radermacher, Yvonne

aus Bergisch-Gladbach

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Brehler

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. P. Boknik

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten-
Allgemeine Dermatologie und Venerologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. T. Luger-
Referent: Riv.-Doz. Dr. R. Brehler
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. P. Boknik

Zusammenfassung

Die prognostische Wertigkeit des Immunoblot im Rahmen der Allergiediagnostik
Radermacher, Yvonne

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand des Verhältnisses der sIgE- und sIgG₄-Allergenbanden im Immunoblot eine prognostische Aussagekraft bezüglich der Reaktion auf einen Insektenstich zu evaluieren. Hierbei wurden zwei Studienkollektive untersucht. Der Westernblot wurde anhand der Seren von 38 Probanden, die aufgrund beruflicher Exposition gehäuft von Bienen gestochen wurden sowie 19 Wespengiftallergikern, die sich unter IT einer Insektenstichprovokation unterzogen, evaluiert. Hierzu wurden die Seren der Probanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten hinsichtlich ihrer sIgE- und sIgG₄-Reaktivität im Westernblot hin untersucht. Verwendet wurden Western-Blot-Streifen mit aufgetrenntem Bienen- und Wespengift der Firma DPC Biermann (Bad Nauheim).

Die Intensität der spezifischen Blotreaktionen wurde zum einen rein optisch und ohne Kenntnis der klinischen Reaktion sowie zum anderen semiquantitativ-optisch mittels der Software QuantiScan der Firma Biosoft (Cambridge, UK) bestimmt. Im Vergleich der beiden unterschiedlichen Auswertungsmethoden ergaben sich keine Unterschiede, so dass für die weitere statistische Auswertung keine Differenzierung zwischen den beiden Verfahren vorgenommen wurde. Die sIgE-bindenden Allergenbanden auf den Immunoblotstreifen wurden zur weiteren diagnostischen Auswertung mit den korrespondierenden sIgG₄-Banden verglichen. Hierbei wurden „vollständige“ von „unvollständigen“ Bandenmustern unterschieden. Ein „unvollständiges“ Bandenmuster bestand bei einem isolierten Mangel an sIgG₄-Reaktivität gegen mindestens ein Allergen, gegen das sIgE-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Dieses wurde bereits in der Vergangenheit als prognostisches Kriterium eines fehlenden immunologischen Schutzes gegenüber einem Hymenopterenstich gewertet (OLLERT et al. 2002, JEEP et al. 1996).

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität für die Vorhersage einer anaphylaktischen Reaktion nach einem Insektenstich in der Gruppe der Imker nur bei 44% lag. Wesentlich schlechter fiel das Ergebnis bei den Patienten mit Wespengiftallergie aus. Hier konnte mit dem Western-Blot kein anaphylaktisches Ereignis in der Stichprovokation vorhergesagt werden. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass der Immunoblot keine Aussage bezüglich einer allergischen Reaktion auf einen zukünftigen Insektenstich ermöglicht. Folglich ist der Test im Rahmen einer Insektengifthyposensibilisierung zur Überprüfung des Behandlungserfolges nicht sinnvoll.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2009

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Bienen- und Wespengiftallergie.....	1
1.1.1 Entomologie (Insektenkunde).....	1
1.1.2 Zusammensetzung des Wespen- und Bienengifts	2
1.1.3 Allergene des Bienen- und Wespengifts.....	5
1.2 Epidemiologie der Insektengiftallergie	6
1.2.1 Prävalenz.....	6
1.2.2 Mortalität	7
1.3 Pathogenese und Klinik der Hymenoptereingiftallergie	7
1.4 Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie	10
1.4.1 Anamnese.....	11
1.4.2 Hauttests.....	12
1.4.3 In-vitro-Tests	13
1.4.3.1 Bestimmung des Gesamt-IgE	13
1.4.3.2 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper	14
1.4.3.3 Bestimmung spezifischer Serum-IgG-Antikörper	16
1.4.3.4 Cellulärer Antigen-Stimulations-Test.....	17
1.5 Therapie.....	18
1.5.1 Klinische Aspekte der spezifischen Immuntherapie.....	18
1.5.2 Wirkprinzip.....	19
1.5.3 Durchführung der spezifischen Immuntherapie	23
1.5.4 Dauer der spezifischen Immuntherapie	23
1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Studienkollektive.....	28
2.1.1 Studienkollektiv A	28

2.1.2	Studienkollektiv B	31
2.2	Immunoblot	34
2.3	Gesamt IgE, allergenspezifisches IgE	39
2.4	Methoden der statistischen Auswertung.....	40
2.4.1	Sensitivität und Spezifität	41
2.4.2	Boxplot.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Imker.....	42
3.1.1	Anamnestisch erhobene Daten.....	42
3.1.2	Vergleich der im Immunoblot erhobenen optischen Daten mit den semiquantitativ-optisch erhobenen Daten.....	44
3.1.3	Vergleich Anamnese und Reaktionsverhalten nach Stichereignis	49
3.1.4	Vergleich semiquantitativ-optisch erhobener Daten des Immunoblots mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich.....	51
3.1.5	Vergleich der Ergebnisse im CAP-FEIA mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich	54
3.1.6	Vergleich Ergebnisse des Immunoblots und des CAP-FEIA mit den Untergruppen der allergischen Reaktionen.....	55
3.1.7	Vergleich atopische Diathese mit Reaktionsverhalten nach Stich, Gesamt- und spezifisches IgE	55
3.1.8	Einzelallergenanalyse	57
3.2	Wespengifthyposensibilisierung (Kollektiv B)	60
3.2.1	Vergleich der im Immunoblot erhobenen Daten mit der Anamnese.....	61
3.2.2	Verlauf Allergenbandenmuster vor und während IT.....	63
3.2.3	Vergleich der Ergebnisse des sIgE (CAP-Methode) und der klinischen Reaktion nach der Stichprovokation.....	65
3.2.4	Gesamt- und spezifischer-IgE-Spiegel vor und während der IT	66
3.2.5	Einzelallergenanalyse	67
4	Diskussion	73
4.1	Prognostische Wertigkeit des Immunoblots.....	73
4.2	Vergleich der semiquantitativ-optischen Beurteilung gegenüber der rein optischen Beurteilung der Immunoblotstreifen	77

4.3	Sensibilisierung gegen Allergene im Verlauf der Immuntherapie.....	77
5	Literaturverzeichnis.....	79
	Abbildungsverzeichnis.....	92
	Tabellenverzeichnis.....	94

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CAP	Carrier Polymer
CAST	Cellulärer Antigen-Stimulationstest
CD	Cluster of Differentiation
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
Fc	Fragment crystallizable
Fc R-I	Fc-Rezeptor für IgG
FEIA	Enzym-Immunoassays
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IT/ SIT	Spezifische Immuntherapie
LT	Sulfidoleukotriene
LTC4	Leukotrien C4
LTD4	Anti Leukotrien D4
MCD-Peptid	Mastzelldegranulierendes Peptid
RIA	Radioimmunoassay
RAST	Radio allergen sorbent test
sIgE	Spezifisches Immunglobulin E
sIgG ₄	Spezifisches Immunglobulin G
TGF	Transforming growth factor
Spp	Subspezies

1 Einleitung

1.1 Bienen- und Wespengiftallergie

1.1.1 Entomologie (Insektenkunde)

In Deutschland kommen etwa 30 soziale Arten der Apinae (Bienen) und elf soziale Vertreter der Polistinae (Feldwespen) oder Vespinae (Wespen), die in die Gruppe der Hymenopteren (Hautflügler) gehören, als Auslöser von Insektengiftallergien in Frage (MAUSS 2003). Der Großteil der allergischen Reaktionen wird überwiegend durch Stiche der Honigbiene (*Apis mellifera*; im Folgenden als Biene bezeichnet) oder bestimmte Faltenwespen (*Vespula vulgaris*, *Vespula germanica*; im Folgenden als Wespen bezeichnet) verursacht. Selten führen Stiche anderer Hymenopteren wie Hummeln (*Bombus* spp.), andere Faltenwespen (*Dolichovespula* spp.) oder Hornissen (*Vespa crabro*) zu allergischen Stichreaktionen (WILSON et al. 2001b).

Den Hymenopteren ist dabei der Besitz eines Giftstachels gemeinsam (KULIKE et al. 1986, MASCHWITZ et al. 1971), der ursprünglich dazu diente, Beutetiere zu lähmen oder Feinde abzuwehren. Bei abgeleiteten Gruppen, wie z.B. den Bienen oder den sozialen Faltenwespen, wird der Stachel nur noch im Zusammenhang mit dem Abwehrverhalten eingesetzt (KULIKE et al. 1986). Das für den Menschen vergleichsweise hohe Gefahrenpotential dieser Insekten ergibt sich aus der hohen Populationsdichte sowie dem besonderen Verhalten zur Nestverteidigung.

Eine Häufung der Sticheereignisse in den Monaten Juli bis September erklärt sich aus dem Flugverhalten der Insekten. Die meisten Arten der Faltenwespen erscheinen Ende April, manche erst Anfang Mai aus der Überwinterung. Die Faltenwespen werden gemäß ihres Koloniezyklus in „Kurzykler“ (*Polistes*, *Dolichovespula*, *Vespula rufa*) sowie „Langzykler“ (*Vespa germanica*, *Vespa vulgaris*, *Vespa crabro*) unterteilt. Die maximale Abundanz, d.h. die höchste Populationsdichte der Kurzykler, lässt sich schon Ende Juli/Anfang August verzeichnen, die der Langzykler erst ab Anfang September. Die Flugzeit der Honigbiene erstreckt sich über die gesamte Vegetationsperiode, von der Zeit der Weidenblüte (meist Ende Februar) bis Anfang Oktober. Die Schwarmbildung erfolgt im Frühjahr, insbesondere im Zeitraum Mai/Juni. Die Abundanz der Ho-

nigbiene ist meist sehr hoch (MÜLLER et al. 1997), da in Folge der Imkerei oftmals größere Völkerdichten vorhanden sind und die Staaten sehr individuenreich sind (MAUSS 2003).

Ein Überblick über die systematische Einteilung einiger Hymenopteren gibt **Tabelle 1** wieder.

Familie	Unterfamilie	Gattung	Art
Apidae		Apis	A.mellifera (Honigbiene)
		Bombus (Hummel)	B. spp.
Vespidae (Faltenwespe)	Vespinae	Vespa (Papierwespe)	V. crabro (Hornisse)
		Vespula (Kurzkopfwespe)	V. germanica V. vulgaris
		Dolichovespula (Langkopfwespe)	D. spp.
	Polistinae	Polistes (Feldwepe)	P. spp
Formicidae (Ameisen)	Myrmicinae	Solenopsis (Feuerameise)	S. spp.
		Pogonomyrmex	P. spp.

Tabelle 1: Systematische Einteilung einiger Hymenopteren (PRZYBILLA 2004, STORCH 1997)

1.1.2 Zusammensetzung des Wespen- und Bienengifts

Hymenopterengifte bestehen zum größten Teil aus Proteinen (80 %), weswegen sie durch die Angabe des Proteintrockengewichts in µg quantifiziert werden. Die Proteine sind entweder großmolekular oder kleinemolekular im Sinne von Peptiden. Die wichtigsten kleinemolekularen Verbindungen sind die biogenen Amine und die Alarmpheromone (MÜLLER 1990, SETTIPANE et al. 1972, SHIPOLINI 1984). In Abhängigkeit der Entwicklung des Insekts und seiner äußeren Lebensbedingungen ergeben sich gewisse Unterschiede in der Zusammensetzung von Hymenopterengiften. Die Inhaltsstoffe der Insektengifte sind in **Tabelle 2** und **Tabelle 3** exemplarisch aufgeführt.

Komponenten	Molekulargewicht	Anteil Trocken-gewicht in %	Toxizität	Allergen-aktivität
Niedermolekulare Substanzen	bis 1000	25	gering	Keine
Pheromone		-		
Histamin	111	1	lokal	Keine
Dopamin	153	<1	-	-
Noradrenalin	169	<1	-	-
Aminosäuren	100-200	1	-	-
Oligipeptide	200-1000	14	-	-
Phospholipide	100-400	5	-	-
Kohlenhydrate	180	2	-	-
Größere Peptide	1000-5000	60	ausgeprägt	meist keine
Melitin	2840	ca.50	Membrangift	+
Apamin	2038	2	Neurotoxin	-
MCD-Peptid	2593	2	Histaminliberator	-
Tertiapin	ca.2000	0,1	Histaminliberator	-
Secapin	ca.2600	0,5	nicht bekannt	-
Cardiopep	nicht bekannt	0,7	positiv chronotrop positiv inotrop	-
Enzyme	10000-20000	15	gering (außer PLA2)	ausgeprägt
Phospholipase A2	19000	12	Membrangift	++++
Lysophospholipase	22000	1		nicht bekannt
Hyaluronidase	45000-50000	2	spreading factor	+++
Saure Phosphatase	49000	<1		++
Alpha-Glukosidase	170000	<1		nicht bekannt
Esterasen	nicht bekannt	<1		nicht bekannt
Andere				
Adolpin	11092	1	analgetisch, Blockade des Arachidonsäure-metabolismus	nicht bekannt
Proteaseinhibitor	9000	0,8		nicht bekannt
Allergen C	105000	<1	nicht bekannt	+

Tabelle 2: Inhaltsstoffe von Bienengift (HABERMANN 1972, O'CONNOR 1978, SHIPOLINI 1984)

Komponenten	Molekulargewicht	Anteil Trockengewicht in %	Allergenaktivität
Niedermolekulare Substanzen	Bis 1000		-
Pheromone		-	-
Histamin	111	3-6	-
Serotonin	176	1	-
Acetylcholin	182	1	-
Katecholamine	150-200	<1	-
Kohlenhydrate	180		-
Aminosäuren	100-200		-
Polyamine			-
Peptide	1000-5000		-
Kinine	1000-3000		-
Mastoparan	Ca. 1500		-
Chemotaktisches Peptid	Ca. 1500		-
Hämolyisin	6000		+
Enzyme			
Phospholipase A+B	35000	6-14	+++
Hyaluronidase	45000	1-3	+++
Saure Phosphatase	nicht bekannt		+
Alkalische Phosphatase			+
Protease	nicht bekannt		++
DNAse	nicht bekannt	<1	nicht bekannt
Cholinesterase	nicht bekannt		nicht bekannt
Histidindecaboxylase	nicht bekannt		nicht bekannt
Saccharidase	nicht bekannt		nicht bekannt
Andere			
Antigen 5	25000	5-10	+++
Vmac 1	97000		+
Vmac2	39000		+

Tabelle 3: Inhaltsstoffe von Wespengift (EDERY 1978, NAKAJIAMA 1984)

Die größte Rolle der im Bienen- und Wespengift enthaltenen biogenen Amine spielt das Histamin. Es macht 1 % des Gesamtgewichts des Bienengifts und 3-6 % des Wespengifts aus (KARLSSON et al. 1982). Histamin wirkt vasodilatatorisch, steigert die Gefäßpermeabilität und sensibilisiert Nozizeptoren. Dadurch kommt es zu lokalen Reaktionen an der Stichstelle in Form von Schmerz, Rötung und Schwellung. Desweiteren unterstützt es die Ausbreitung des Gifts im Gewebe.

Die Peptidtoxine des Bienengifts [z.B. Melitin (HABERMANN et al. 1972), Apamin (HAUX et al. 1967), MCD-Peptid (HABERMANN et al. 1972)] und des Wespengifts [Mastoparan (HIRAI et al. 1979), Hämolyisin (EINARSSON et al. 1985)] sind Moleküle mit stark basischen Eigenschaften. Diese Peptide wirken zytotoxisch, da sie in der Lage sind, Zellmembranen zu zerstören. Im Falle eines einzelnen Stichs kommt es somit zur lokalen Gewebsschwellung. Bei multiplen Stichen können Hämolyse und Organschädigungen mit Todesfolge auftreten (GÄDEKE et al. 1977, MORET et al. 1983). Wespengift enthält desweiteren Kinine, die ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie die biogenen Amine besitzen.

Bei den Proteinen des Bienen- und Wespengifts handelt es sich überwiegend um Enzyme. Phospholipasen wirken indirekt zytotoxisch, indem sie Serumphospholipide in reaktive Lysophospholipide umwandeln. Sie machen den Hauptteil der in beiden Giften enthaltenen Proteine aus. Hyaluronidasen spalten Mukopolysaccharide des Hautbindegewebes und führen zur Ausbreitung des Insektengifts im Gewebe. Daneben wurden noch weitere Proteine in beiden Giften nachgewiesen, deren biologische Funktion jedoch ungeklärt ist (HABERMANN et al. 1972).

1.1.3 Allergene des Bienen- und Wespengifts

Allergene bedürfen einer gewissen Größe, um als solche wirksam zu sein. Deshalb handelt es sich bei den Insektengiftallergenen im Wesentlichen um die großmolekularen, enzymatisch aktiven Proteine. Eine Ausnahme stellt das Bienengiftallergen Melitin dar, welches ein Molekulargewicht von 2,8 kDa besitzt. Seine allergene Potenz ist jedoch gering (KING et al. 1976). Die im Bienengift enthaltenen Allergene mit der größten allergenen Potenz sind die Phospholipase A2 (Api m1) (KING et al. 1976, LIGHT et al. 1976, SOBOTKA et al. 1976), die Hyaluronidase (Api m2) (HOFFMAN & JACOBSEN 1984, HOFFMANN & SHIPMAN 1976, KEMENY et al. 1981), die saure Phosphatase (Api m3) (SOLDATOVA 2000) und das Melitin (Api m4). Allergen C, ein weiteres hochmolekulares Protein, scheint hingegen nur eine geringe allergene Potenz zu besitzen (KARPAS et al. 1977).

Wespengift enthält als Hauptallergene die Phospholipase A1 (Ves v1), die Hyaluronidase (Ves v2) (MÜLLER 1990a) und das Antigen 5 (Ves v5) (EINARSSON et al. 1986, HOFFMAN 1984, HOFFMAN 1985, KING et al. 2000).

1.2 Epidemiologie der Insektengiftallergie

1.2.1 Prävalenz

Insektengifte gehören, zusammen mit Nahrungsmitteln und Medikamenten, zu den drei häufigsten Auslösern einer Anaphylaxie (REIMERS & MÜLLER 2004).

Die Prävalenz verstärkter Lokalreaktionen auf Hymenopteregifte variiert in der europäischen Bevölkerung zwischen 2 und 19 %, während systemische Reaktionen bei ca. 0,8 bis 5 % der Bevölkerung beobachtet werden (RUËFF et al. 2000, PRZYBILLA et al. 2004). Ist es bereits bei vorherigen Stichen zu einer verstärkten Lokalreaktion gekommen, so sind bei einem erneuten Stich lediglich bei 5-10 % der Erwachsenen und 2 % der Kinder systemische Reaktionen zu erwarten. Ist es jedoch bei vorherigen Stichen zu einer systemischen Reaktion gekommen, so ist das Risiko, mit einer erneuten systemischen Reaktion zu reagieren, bei Erwachsenen um 30-50 % und bei Kindern um 10-15 % erhöht (TREUDLER et al. 1997). Eine Sensibilisierung gegenüber Bienen- oder Wespengift, in Form einer positiven Hauttestreaktion oder erhöhter sIgE-Antikörper, zeigt sich bei ca. 25 % der Gesamtbevölkerung, bei Kindern sogar bei bis zu 50 % (PRZYBILLA et al. 2004).

Die Ermittlung der Prävalenz der Insektengiftallergie kann auf anamnestischen Angaben oder diagnostischen Tests beruhen. Bei beiden Möglichkeiten gibt es viele Unsicherheitsfaktoren, die zu berücksichtigen sind. So sind Anamnesen immer subjektiv und vom Fragebogen und/ oder dem Untersucher abhängig. Diagnostische Tests dagegen zeigen lediglich die Sensibilisierung von Personen, nicht aber ihre klinische Relevanz an. Aus diesen Gründen gibt es starke Schwankungen bezüglich der Angaben über die Prävalenz. Die Häufigkeit eines positiven Testergebnisses (detektierbares sIgE gegen Insektengift, positiver Hauttest) liegt zwischen 12-18 % (MÜLLER 1988, FERNANDEZ et al. 1999), bei einer Studie in einem ländlichem Gebiet im Südosten Spaniens waren sogar 20,4 % der unselektierten Stichprobe RAST (radio allergen sorbent test) positiv

(FRICKER et al. 1997). Diese Unterschiede sind teilweise durch methodische Differenzen sowie das Expositionsrisiko bedingt, was unter anderem von der Insektdichte abhängt. So zeigt sich z.B. in Mittel- und Südeuropa eine höhere Dichte an Insekten als in Großbritannien und Skandinavien sowie in ländlichen Gegenden wiederum eine höhere als in der Stadt.

1.2.2 Mortalität

Die Mortalität der Insektengiftallergie ist gering, sie liegt zwischen 0,09-0,45 Todesfälle pro Millionen Einwohner und Jahr (MÜLLER 1988). Die häufigsten Todesfälle treten im höheren Lebensalter auf (71 % der Todesfälle bei über 40jährigen Patienten (MÜLLER 1988)), obwohl das Expositionsrisiko bei Kindern höher ist. Dies ist u.a. auf die höhere Wahrscheinlichkeit zurückzuführen, an kardiovaskulären und pulmonalen Komorbiditäten zu leiden. Die überwiegenden Stiche mit tödlichem Ausgang erfolgen im Kopf-Halsbereich, wobei hier auch ein nicht-allergischer Pathomechanismus mitbeteiligt sein kann. Die verfügbaren Zahlen lassen aber nur einen Teil der tatsächlichen Häufigkeit erkennen. Insbesondere bei plötzlichen Todesfällen unklarer Ursache ist auch an eine Insektengiftüberempfindlichkeit zu denken. So wurde in mehreren Studien post mortem ein im Vergleich zur Normalbevölkerung hoher Grad an Hymenoptereingift-sIgE-Antikörpern bei unerwarteten Todesfällen ermittelt (MÜLLER 1988, FERNANDEZ et al. 1999). Bei einer bestehenden Mastozytose als prädisponierender Faktor kann es ebenfalls zu tödlichen Reaktionen auf Hymenopterenstiche kommen. Hierfür verantwortlich ist die massive Mastzellmediatorfreisetzung aufgrund der in den Giften enthaltenen unspezifischen Mastzellliberatoren (FRICKER et al. 1997, MÜLLER et al. 1990b, MÜLLER et al. 1983).

1.3 Pathogenese und Klinik der Hymenoptereingiftallergie

Die übertragene Menge Gift pro Stich schwankt bei Wespen stark. Golden et al. konnten zeigen, dass bei Stichen durch Wespen z.B. keine Abhängigkeit vom Kalendermonat, wohl aber von der Wespenart besteht (GOLDEN et al. 2006). Des Weiteren ist die übertragene Menge Gift pro Stich abhängig vom Alter des Insekts, der Dauer des Stichs und dem zeitlichen Abstand zum letzten Stich.

Bei den Honigbienen ist davon auszugehen, dass die Giftzusammensetzung altersabhängig ist und dass ganz junge Bienen noch kein Gift produzieren. Die Giftblase ist erst nach 20 Lebenstagen vollständig gefüllt. Zusammensetzung und Menge des Bienengifts sind u.a. saisonabhängig und abhängig von den Aufzuchtbedingungen. „Optimale“ Giftblaseninhalte sind bei der Honigbiene in Deutschland im Mai/Juni zu erwarten (GOLDEN et al. 2006). Wegen der Widerhaken am Stachel verliert die Biene beim Stich meist ihren gesamten Giftapparat. Dabei werden circa zwischen 59 µg (HOFFMANN et al. 1984a) und 100 µg (PRZYBILLA 1993) Gift in die Haut injiziert. Die Wespe hingegen kann ihren Stachel wieder zurückziehen und injiziert infolgedessen viel weniger Gift in die Haut. Die Angaben pro Stich schwanken zwischen 1,7-3,1 µg/Stich (HOFFMANN et al. 1984a) und 3-10 µg/Stich (PRZYBILLA 1993), liegen aber weit unter der Giftmenge von Bienen. Wespen können bei Gefahr ihr Gift in die Luft versprühen, was wiederum bei Stichprovokationen die selteneren systemischen Reaktionen nach Wespenstichprovokationen im Vergleich zu Bienenstichprovokationen erklären kann (MÜLLER et al. 1992).

Hymenopterenstiche können örtliche oder systemische Reaktionen auslösen, denen toxische oder allergische Mechanismen zugrunde liegen. Die toxische Wirkung von Insektengiften ist in der Regel lokal begrenzt und führt nur in Ausnahmefällen zu ernst zunehmenden, gesundheitsgefährdenden Situationen. Medizinisch ungleich bedeutender sind die dagegen häufig dramatisch verlaufenden, systemischen Reaktionen infolge eines Stichs, welche durch eine allergische Reaktion gegenüber bestimmter Bestandteile von Insektengiften gekennzeichnet sind.

Die allergische Reaktion nach einem Insektenstich ist IgE vermittelt und zählt somit zu der Typ I-Reaktion (anaphylaktische Reaktion) nach Coombs und Gell. Beim ersten Antigenkontakt lagern sich IgE-Antikörper im Gewebe an Mastzellen an, im Blut an basophile Granulozyten. Nach einem erneuten Stich und somit nach einem erneuten Allergenkontakt kommt es zu einer Quervernetzung von zwei benachbarten IgE-Molekülen, was wiederum zu einer Degranulation von Mediatorsubstanzen wie Histamin, Leukotrienen, Prostaglandinen, Tryptase und anderen Substanzen aus diesen Zellen führt. In der Folge kommt es zu einer Vasodilatation im kapillären und venösen Be-

reich, einer Gefäßpermeabilitätssteigerung sowie einer Konstriktion der glatten Muskulatur von Bronchien und Intestinum.

Die Symptome systemischer (allergischer) Reaktionen vom Soforttyp können durch einen oder wenige Stiche ausgelöst werden. Meist treten sie wenige Minuten, selten später als eine Stunde nach dem Stichereignis auf und reichen von kutanen Symptomen (Pruritus, Rötung, Flush, Urtikaria) über Angioödem, gastrointestinalen Manifestationen wie Erbrechen bis zu Asthma bronchiale und anaphylaktischem Schock (PRZYBILLA 2004, PRZYBILLA 1993, EWAN 1998, YUNGINGER 1993). Die Symptome werden nach H. L. Müller in 4 Schweregrade eingeteilt, wie **Tabelle 4** zeigt.

Grad	Symptome
Grad I	Generalisierte Urtikaria, Pruritus, Malaise, starkes Angstgefühl
Grad II	Beliebige der oben erwähnten und zwei oder mehrere der folgenden: Angioödem (auch Grad II wenn allein), thorakales Engegefühl, Nausea, Erbrechen, Diarrhoe
Grad III	Beliebige der oben erwähnten und zwei oder mehrere der folgenden: Dyspnoe (auch Grad III wenn allein), Stridor, Dysphagie, Dysarthrie, Heiserkeit, Schwächegefühl, Benommenheit, Todesangst
Grad IV	Beliebige der oben erwähnten und zwei oder mehrere der folgenden: Blutdruckabfall, Kollaps, Bewusstlosigkeit, Inkontinenz, Zyanose

Tabelle 4: Einteilung der allergischen Allgemeinreaktionen auf Hymenopterenstiche nach H. L. MÜLLER 1990 (leicht modifiziert)

Abgesehen von den allergischen Reaktionen nach einem Insektenstich kann es auch zu örtlichen Reaktionen kommen. Üblicherweise tritt im Bereich der Stichstelle eine schmerzhaft Rötung und Schwellung auf. Diese örtliche Reaktion wird durch zytotoxische und neurotoxische Substanzen des Gifts ausgelöst.

Ebenfalls kann es nach einem Stich zu einer gesteigerten örtlichen Reaktion kommen, welche von der allergischen Allgemeinreaktion unterschieden werden muss. Diese gesteigerte Lokalreaktion ist eine von der Stichstelle ausgehende Schwellung, die größer als 10 cm im Durchmesser ist und länger als 24 h andauert. Sie kann eine ganze Extremität betreffen, mit Zeichen einer Lymphangitis oder mit Fieber einhergehen. Diese gesteigerten Lokalreaktionen können zu ausgeprägten Schwellungen führen, mehrere Tage andauern und sehr schmerzhaft sein. Eine antibiotische Therapie ist hierbei nicht

nötig, weil die bakteriostatische Wirkung des Insektengifts eine Infektion verhindert (GOLDEN et al. 1998). Nach einem enoralen Stich kann die gesteigerte Lokalreaktion durch die Entwicklung eines Larynxödems lebensbedrohlich werden (REIMERS & MÜLLER 2004).

Bei einer sehr großen Anzahl von Stichen kann es durch die toxische Wirkung aber auch zu gefährlichen systemischen Reaktionen mit teilweise tödlichem Ausgang kommen. Zur Auslösung tödlicher Allgemeinreaktionen beim Erwachsenen sind wohl mehrere tausend Stiche erforderlich. Klinisch pathologisch stehen hierbei Rhabdomyolyse, Hämolyse, zerebrale Störungen und Niereninsuffizienz im Vordergrund (PRZYBILLA 1993). Auch Leberparenchymschäden mit Ikterus und Gerinnungsstörungen sind beschrieben worden.

1.4 Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie

Da heutzutage standardisierte Bienen- und Wespengiftzubereitungen für die allergologische Diagnostik und Therapie der Insektengiftallergie zur Verfügung stehen, kann die Hymenoptereingiftallergie wirksam behandelt werden. Der Diagnostik zur Klärung von Insektenstichreaktionen kommt somit eine besondere Bedeutung zu (PRZYBILLA 1993, GOLDEN et al. 1981, MOSBECH 1986, MÜLLER et al. 1992, PRZYBILLA 1999). Ihr Ziel ist es, die aufgetretene Reaktion zu klassifizieren, den Pathomechanismus zu ermitteln und das auslösende Insekt zu identifizieren.

Die Diagnose basiert zunächst auf der Anamnese. Zur Bestätigung der Anamnese, insbesondere auch bei klinisch nicht sicher einzuordnenden Reaktionen sowie zur Identifizierung des Insekts, stehen als Hilfsmittel Haut- und in-vitro-Tests zur Verfügung. Positive Hauttests oder nachgewiesenes sIgE gegen Insektengift ohne anamnestische Hinweise auf eine systemische Reaktion sind hierbei keine Indikation zur spezifischen Immuntherapie (SCHÄFER et al. 1996, GOLDEN et al. 1984).

Erschwerend für die Diagnosestellung ist das Vorkommen falsch-negativer in-vitro- und in-vivo-Befunde, beispielweise bei lange zurückliegenden Stichereignissen (MÜLLER & MOSBECH 1993).

Ein weiteres Problem stellt die Unterscheidung zwischen einer Sensibilisierung und einer Allergie dar, wobei darauf geachtet werden muß, dass ein positiver Hauttest sowie ein erhöhter sIgE-Spiegel lediglich eine Sensibilisierung und somit die Allergiebereitschaft beschreibt. Eine Allergie hingegen stellt eine klinisch relevante Sensibilisierung dar.

In-vitro-Verfahren wie der Histaminfreisetzungstest, der Basophilendegranulationstest, die Sulfidoleukotrienstimulation, Immunoblot-Verfahren oder Inhibitionstests können bei diesen Fragestellungen zusätzliche Informationen liefern, sie werden jedoch derzeit nicht routinemäßig eingesetzt (FREITAG et al. 2001, CAHEN et al. 1997, HÖXTERMANN et al. 1995, JUNG et al. 1999, Müller & MOSBECH 1993, WÜTHERICH et al. 1987).

1.4.1 Anamnese

In der Anamnese sollte soweit möglich das krankheitsverursachende Insekt identifiziert werden. Oft bleiben Art und Gattung des reaktionsauslösenden Insekts jedoch unsicher. Anamnestische Aussagen des Patienten können hierbei Hinweise geben, dürfen aber keinesfalls überschätzt werden, da nicht jeder Patient Bienen und Wespen unterscheiden kann.

Unter Berücksichtigung der Umstände beim Stichereignis können sich Hinweise auf das auslösende Insekt ergeben. Dabei erhöht die Angabe, dass ein Stachel in der Haut steckt, zwar die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen Bienenstich handelt, sie ist aber keineswegs beweisend. Deshalb sollten u.a. der Zeitpunkt des Stichs (Bienenflug von Frühjahr bis Herbst und an warmen Wintertagen, größere Wespenpopulationen in Sommer und Herbst) und der Ort (Bienen eher in der Nähe von Bienenstöcken und Blüten, Wespen eher in der Nähe von Abfall und Nahrungsmitteln) mitberücksichtigt werden (PRZYBILLA et al. 2004).

Das Stichverhalten lässt ebenfalls Rückschlüsse auf das Insekt zu. Bienen sind weniger aggressiv als Wespen und stechen im Allgemeinen nur bei Bedrohung. Wespen hingegen können auch spontan (im Vorbeiflug) stechen.

Ein weiteres Ziel der Anamnese sollte die Klassifikation der klinischen Reaktion sein. Hierbei können strukturierte Fragebögen zur Anamneseerhebung helfen, die Symptome

genau zu beschreiben sowie Reaktionen auf frühere Stiche, das Expositionsrisiko (Imker, Bäcker, Gartenarbeit etc.) sowie eine atopische Diathese zu erfassen. Als problematisch gestaltet sich in diesem Zusammenhang die ausschließliche Angabe von subjektiven Symptomen. Hier müssen ebenfalls neurovegetative oder vasovagale Reaktionen berücksichtigt werden. In der allgemeinen Anamnese sollten Faktoren, die systemische Reaktionen beeinflussen könnten, so eventuell bestehende kardiovaskuläre oder respiratorische Grunderkrankungen sowie die Einnahme von Medikamenten wie ACE-Hemmer oder β -Blocker, herausgearbeitet werden (MÜLLER 1988, PRZYBILLA 1993, YUNGINGER 1993).

1.4.2 Hauttests

Mit Hilfe eines Hauttests lässt sich die Sensibilisierung des Patienten gegenüber einem spezifischen Allergen nachweisen. Hierzu werden Allergene in die papilläre Dermis eingebracht und die anschließende Lokalreaktion beurteilt. Die Hauttestung wird als Prick- sowie Intrakutantestung (FORCK 1985, ABKIEWICZ et al. 1979) sowohl mit Bienen- als auch mit Wespengift durchgeführt. Die Bestimmung der Reaktionsschwelle erfolgt durch schrittweise Titration mit ansteigender Hymenoptereingiftkonzentration (Pricktest mit 0,1 - 1 - 10 - 300 $\mu\text{g/ml}$, Intrakutantest mit 0,001 - 0,01 - 1 $\mu\text{g/ml}$). Abgelesen wird nach 15-20 min. zur Erfassung einer Soforttypreaktion sowie gegebenenfalls nach 6h bis zu 48-72h zur Erfassung einer verzögerten oder späteren Reaktion. Eine Quaddel $\geq 3\text{mm}$ Durchmesser wird bei negativer Negativkontrolle als positiv bewertet.

Die Testung sollte nicht früher als zwei Wochen nach dem Stichereignis erfolgen, da die Hautmastzellen nach einer Allgemeinreaktion Zeit zur Regeneration benötigen und möglichst innerhalb eines Jahres, weil die Hauttestempfindlichkeit mit zunehmendem Abstand zum Stichereignis abnimmt (MÜLLER 1988). Zusätzlich kann ein Hauttest mit verbreiteten Aeroallergenen zur Erfassung einer atopischen Diathese durchgeführt werden. Der Hauttest besitzt eine hohe Sensitivität sowie Spezifität, sowohl bei der Bienen- als auch der Wespengiftallergie (MÜLLER 1994b).

1.4.3 In-vitro-Tests

Ergebnisse von in-vitro-Tests bestätigen nur in Übereinstimmung mit Anamnese und Klinik eine Allergie. Ein positives oder negatives Testergebnis für sich alleine bedeutet zunächst lediglich den Nachweis bzw. das Fehlen eines Antikörpers oder Reaktionsprodukts (GOLDEN et al. 1984, SCHÄFER et al. 1996). In-vitro-Tests sollten ebenfalls möglichst rasch, frühestens aber zwei Wochen nach dem letzten Stichereignis durchgeführt werden.

Die in-vitro-Allergiediagnostik kann in serologische Tests (z.B. allergenspezifischer Immunglobulinnachweis) und zelluläre Methoden (z.B. Histamin-, Leukotrienfreisetzungstest, Basophilenaktivierungstest, Lymphozytenstimulationstest) unterteilt werden. Zusätzlich ist die Bestimmung von Mediatoren, wie z.B. der Tryptase sinnvoll. Serologische Tests gehören zur Routinediagnostik, wohingegen zelluläre Tests komplex, aufwendig zu interpretieren und der spezifischen Allergiediagnostik vorbehalten sind (KLEINE-TEBBE 2003).

1.4.3.1 Bestimmung des Gesamt-IgE

Zur Bestimmung des Gesamt-IgEs im Serum stehen heutzutage eine Reihe von Enzym- bzw. Fluoreszenzimmunoassays (EIA, ELISA, FEIA) zur Verfügung, die den früher gebräuchlichen Radioimmunoassay (RIA) abgelöst haben.

Die Bestimmung des Gesamt-IgEs ist zum Atopie Screening weniger gut geeignet als die Bestimmung des sIgEs. Einerseits ist ein hohes Gesamt-IgE für das Vorliegen einer Atopie nicht beweisend, andererseits schließt ein normales Gesamt-IgE eine atopische Erkrankung nicht aus (BURNEY et al. 1997).

Gesamt-IgE kann in Serum, Plasma oder Sekreten untersucht werden. Die Angaben zu den Referenzbereichen für das Gesamt-IgE variieren dabei. Von Kulig et al. wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie Werte für das Kindesalter erhoben (KULIG et al. 1999). Exemplarisch seien folgende 95.-Perzentilen-Werte in **Tabelle 5** aufgeführt.

Alter	Gesamt-IgE
Neugeborene	<2,0 U/ml
1. Jahr	40,0 U/ml
2. Jahr	100,0 U/ml
3. Jahr	150,0 U/ml
5. Jahr	190,0 U/ml
6. Jahr	150,0 U/ml
>16 Jahre	120,0 U/ml

Tabelle 5: Referenzbereiche für das Gesamt-IgE (RENZ et al. 2002)

Die Normalwerte können je nach verwendeter Methode und epidemiologischer Datenbasis schwanken (HOLFORD-STREVENS et al. 1984). Im Alter von sechs bis vierzehn Jahren ist die Streuung der Normalwerte am größten (SITZMANN 1986), wobei die Gesamt-IgE-Werte durch Nikotin- oder Alkoholkonsum beeinflusst werden (RENZ et al. 2002). Höhere Gesamt-IgE-Werte finden sich darüber hinaus während der Zeit der Allergen-Exposition. Außerhalb der Allergologie besitzt das Gesamt-IgE vor allem eine Bedeutung bei der Diagnostik von Parasitosen und Immundefekten.

1.4.3.2 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper

Die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper (sIgE) im Serum dient seit Jahrzehnten der Diagnostik von Soforttypsensibilisierungen (Typ-I-Allergiebereitschaft) (HAMILTON et al. 2000). Ihre Bestimmung gehört zur Basisdiagnostik der Insektengiftallergie.

Der Nachweis von sIgE bedeutet, dass eine spezifische Sensibilisierung gegenüber entsprechenden Allergenen stattgefunden hat. Anamnestisch muss überprüft werden, ob die gefundene Sensibilisierung von klinischer Relevanz ist. Somit ist das sIgE nur ein Parameter in der klassischen allergologischen Stufendiagnostik, dessen klinische Relevanz mittels Anamnese bewertet werden muss (RENZ et al. 2002). Dabei dient der Nachweis von sIgE auch zur Abgrenzung von IgE-vermittelten allergischen Reaktionen gegen vasovagale oder psychogene Reaktionen nach einem Insektenstich.

In diesem Zusammenhang existieren zahlreiche Methoden zur Bestimmung des sIgE, die auf ähnlichen Prinzipien beruhen. Hierbei sind die Hauttestung und die Bestimmung von sIgE im Serum als gleichwertig zu betrachten. Bei der Bestimmung von sIgE im Serum wurde bisher der RAST (radio allergen sorbent test) verwendet. In einer Studie

von Jeep et al. konnte allerdings eine höhere Sensitivität des von der Firma Pharmacia vertriebenen CAP-Tests (Carrier Polymer) (Pharmacia, Uppsala, Schweden) nachgewiesen werden (JEEP et al. 1993). Die Quantifizierung der sIgE-Werte gelingt durch eine auf bekannte sIgE-Mengen bezogene Eichkurve. Dabei werden künstlich definierte Einheiten verwendet oder eine dem WHO-Standard für Gesamt-IgE-Werte angepasste Eichkurve zur Bestimmung der sIgE-Werte zugrunde gelegt (so genannte heterologe Interpolation). Somit ist bis heute eine echte Quantifizierung des sIgE im eigentlichen Sinne nicht möglich (RENZ et al. 2002).

Ein neueres Verfahren zur Bestimmung des sIgE stellt hingegen der Immunoblot dar. Er zählt jedoch nicht zu den Routineverfahren, ist aufwendig in der Durchführung und nur für ausgewählte Fragestellungen oder Forschungszwecke verfügbar. Validität, Linearität, Parallelität und Reproduzierbarkeit der verschiedenen Testsysteme können hierbei durch unterschiedliche Variablen beeinflusst werden (**Tabelle 6**).

Wie die Hauttestreaktionen sind auch die sIgE-Werte zeitabhängig. Kurz nach einem Stich können niedrigere sIgE-Spiegel gemessen werden, wobei angenommen wird, dass das sIgE in der Allgemeinreaktion verbraucht wird (MÜLLER 1988). Nach ca. 2-3 Wochen sind wieder höhere sIgE-Titer detektierbar, die im Laufe von Monaten bis Jahren wieder abfallen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei 12 von 13 Bienengiftallergikern und 14 von 18 Wespengiftallergikern schon in den ersten zwei Wochen nach einem Stich sIgE nachweisbar waren, bei den Wespengiftallergikern stieg das sIgE bei einer ca. fünf Wochen später erneut durchgeführten Bestimmung sogar signifikant an (RIEGER ZIEGLER et al. 1999). Somit kann die sIgE-Bestimmung schon früh nach der allergischen Reaktion durchgeführt werden, sie sollte aber bei Test-negativen Personen nach einigen Wochen wiederholt werden. Bei Wespengiftallergikern finden sich dabei häufiger niedrigere Konzentrationen von sIgE als bei Bienengiftallergikern (PRZYBILLA 2004).

Das Ergebnis kann nur im Zusammenhang mit Anamnese, Klinik und eventuell zusätzlicher Ergebnisse organspezifischer Provokationstests richtig interpretiert werden. Die quantitativen Ergebnisse der sIgE-Bestimmung werden üblicherweise von den verschiedenen Herstellern in Graduierungen oder Klassen eingeteilt. Die verschiedenen Systeme sind nicht miteinander vergleichbar, so dass ein quantitativer Vergleich der

Ergebnisse, gemessen mit unterschiedlichen Systemen, kaum möglich ist. Sowohl die Allergenzusammensetzungen, die verwendeten Reagenzien als auch der technische Aufbau der Bestimmungsmethoden weichen erheblich voneinander ab.

Variable	Einflussgrößen
Assay-Aufbau	<ul style="list-style-type: none"> • Festphase • Waschschritte für die Festphase • Detektionsprinzip • Zeit/Temperatur während der Inkubation • Manuell, halb- oder vollautomatisch • Messung der Rohdaten
Reagenzien	<ul style="list-style-type: none"> • Allergen-Extrakt • Detektierende Antikörper
Laborpersonal	<ul style="list-style-type: none"> • Ausbildungsgrad, Erfahrung
Laborstandards	<ul style="list-style-type: none"> • Einzel- bzw. Doppelbestimmungen • Vorhandensein von internen und externen Programmen zur Qualitätssicherung
Biologische Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> • Hohes Gesamt-IgE • Hohe Spiegel von spezifischem IgG • Kreuzreaktivität zwischen den Allergenen

Tabelle 6: Einflussgrößen bei der Messung spezifischer IgE-Antikörper (RENZ et al. 2002)

1.4.3.3 Bestimmung spezifischer Serum-IgG-Antikörper

Die Bildung von allergenspezifischen IgG-Antikörper (sIgG) ist Teil der normalen Immunantwort auf eine Fremdstoffexposition. sIgG-Antikörper (sIgG₁, sIgG₂, sIgG₃ und sIgG₄) steigen nach Hymenopterenstich an (PARKER et al. 1982) und bleiben dann längerfristig erhöht. Initial treten bevorzugt sIgG₁-, später sIgG₄-Antikörper auf (RUËFF et al. 2000). Die Konzentration der sIgG-Ak korreliert jedoch nicht mit der klinischen Symptomatik der allergischen Soforttypreaktion (EICH-WANGER et al. 1998, TIIKKAINEN et al. 1990). Ihr Vorhandensein gibt somit lediglich einen Hinweis auf den stattgefundenen Kontakt, was gegebenenfalls diagnostisch genutzt werden kann (PRZYBILLA 2004). Der Nachweis von sIgG gelingt mit weniger sensitiven Methoden, da die Serumkonzentrationen im Gegensatz zum sIgE 100-1000 mal höher sind. Es gibt zahlreiche Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Immunglobuline, wie sie in **Tabelle 7** aufgezeigt sind (RENZ et al. 2002, KERSTEN et al. 2000).

Qualitative Verfahren	Ouchterlony-Technik Immunelektrophorese Gekreuzte Immunelektrophorese
Quantitative Verfahren	Radioimmunoassay (RIA) Enzyimmunoassay (EIA) Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Tabelle 7: Testverfahren für den Nachweis von allergen- bzw. antigen-spezifischem IgG

Hierbei eignen sich als quantitative Methoden die gleichen Nachweisverfahren, wie sie auch für das sIgE verwendet werden, allerdings mit einem Anti-IgG-Nachweisantikörper und mit verdünnten Serumproben (in der Regel 1:100). Die Interpretation der quantitativen sIgG-Werte erweist sich als nicht unproblematisch, da für jedes Allergen/Antigen und jedes verwendete Testverfahren Normkonzentrationen der sIgG₄-Spiegel zu bestimmen sind. Eine Beurteilung unter Berücksichtigung des klinischen Befundes ist daher immer erforderlich (RENZ et al. 2002).

1.4.3.4 Cellulärer Antigen-Stimulations-Test

Mit dem cellulären Antigen-Stimulations-Test (CAST) steht seit seiner Einführung 1992 durch De Weck et al. ein neuer in-vitro Test zur Diagnostik allergischer Reaktionen zur Verfügung, mit dessen Hilfe die Reaktivität auf ein bestimmtes Allergen ermittelt werden kann (DE WECK et al. 1992). Da der CAST auf der Neuproduktion von Mediatoren der allergischen Reaktion basiert, kann die momentane Stimulierbarkeit eines Patienten untersucht werden (HÖXTERMANN et al. 1995). Blutleukozyten werden mit dem Zytokin Interleukin 3 (IL-3) prästimuliert und anschließend dem betreffenden Allergen ausgesetzt. Vorwiegend basophile Granulozyten synthetisieren daraufhin Sulfi-doleukotriene (sLT) in Form von LTC₄ und dessen Metaboliten LTD₄ und LTE₄. Sie werden daraufhin mittels ELISA-Technik gemessen (CAHEN et al. 1997b).

Der CAST ist komplex und nicht zur Routinediagnostik geeignet, zumal wenige systematische, kontrollierte Studien zur diagnostischen Wertigkeit vorliegen. Bei Verdacht auf eine IgE-vermittelte Allergie und unklaren diagnostischen Vorbefunden kann er zur spezialisierten in-vitro-Allergie-Diagnostik dienen und für wissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt werden (RENZ et al. 2002).

Einige zelluläre in-vitro-Testsysteme zur Soforttyp-Allergiediagnostik nutzen den Nachweis von Mediatoren oder zellulären Antigenen, die bei erfolgreicher Aktivierung auf der Zelloberfläche erscheinen. Die nach Allergenstimulation exprimierten Oberflächenmarker (CD63, CD203c) bzw. die freigesetzten Mediatoren der basophilen Granulozyten (z.B. Histamin, Sulfido-Leukotriene) dienen als indirektes Maß für zellulär gebundenes sIgE.

Der Nachteil der bisherigen zellulären in-vitro-Allergietests liegt darin, dass ihr Einsatz auf Responder beschränkt ist. Nonresponder sind Individuen, deren basophile Granulozyten einen Defekt in der intrazellulären Signalkaskade aufweisen, die dem hochaffinen IgE-Rezeptor nachgeschaltet ist. Als Folge davon sind die Nonresponder-Basophilen nicht in der Lage, Histamin freizusetzen oder granulaassoziierte Moleküle wie CD63 und CD203c auf der Oberfläche hoch zu regulieren. Der Anteil der Nonresponder an der Allgemeinbevölkerung liegt im Bereich von 8 bis 20 % (ISHIZAKA et al. 1973, KNOL et al. 1991, NYGEN et al. 1990). Dies bedeutet eine limitierte Einsetzbarkeit der in-vitro-Tests und ist wahrscheinlich der Hauptgrund dafür, dass sich diese Methoden in der Routinediagnostik bislang noch nicht etablieren konnten.

1.5 Therapie

Die Therapie der Insektengiftallergie umfasst sowohl allgemeine als auch kausale Maßnahmen. Zu den allgemeinen Maßnahmen zählen die Karenz sowie die Pharmakotherapie, wohingegen zu den kausalen Maßnahmen nur die spezifische Immuntherapie zählt.

1.5.1 Klinische Aspekte der spezifischen Immuntherapie

Die spezifische Immuntherapie (SIT/ IT), auch als Hyposensibilisierung (früher Desensibilisierung), Allergenimmuntherapie oder Allergieimpfung bezeichnet, ist ein bewährtes, empirisches, therapeutisches Verfahren. 1911 wurde die Therapie erstmals von Leonard Noon und John Freeman für die Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis eingeführt (NOON 1911). Sie ist neben der AllergenKarenz der bis heute einzige kausale und präventive Therapieansatz für die Behandlung IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen.

Bei der spezifischen Immuntherapie werden sensibilisierten Patienten Extrakte allergener Materials in steigender Dosierung mit dem Ziel verabreicht, den Grad der Allergie abzuschwächen (BOUSQUET et al. 1998). In den 20-30er Jahren wurde die Immuntherapie dabei auch für Insektengiftallergiker etabliert. Allerdings wurden bis in die 70er Jahre Ganzkörperinsektenextrakte benutzt, bis die Überlegenheit von Giftextrakten bewiesen wurde (HUNT et al. 1978).

1.5.2 Wirkprinzip

Die Wirkung der IT mit Allergenen ist komplex und induziert zahlreiche immunologische Veränderungen. Dabei gibt es viele verschiedene pathophysiologische Überlegungen zur Wirkungsweise der spezifischen Immuntherapie, wobei die genauen immunologischen Mechanismen letztendlich noch nicht eindeutig geklärt sind.

Bei der Hyposensibilisierungsbehandlung kommt es zu Beginn zu einem Anstieg der sIgG₄- und sIgE-Antikörper. Die Konzentration der sIgG₄-Antikörper bleibt auch während der IT auf diesen erhöhten Werten (DJURUP et al. 1985, URBANEK 1986), wohingegen die Konzentration der sIgE-Antikörper im Verlauf der Therapie wieder abfällt (AKDIS et al. 1998a, DURHAM & TILL 1998, JUTEL et al. 1995, KOWALSKI & JUTEL 1998, MÜLLER & MOSBECH 1993). Den IgG₄-Antikörpern wurde somit teilweise eine protektive Wirkung mit der Vorstellung einer IgE-Antikörper-Neutralisation bzw. einer IgE-Rezeptor-Blockade zugeschrieben, was zu der These der „blockierenden Antikörper“ führte (NAKAGAWA 1991, GOLDEN et al. 1992, GEHLHAR et al. 1999, REINHARDT 1996, JARISCH & HEMMER 1996, PATTERSON 1998, ALBEGGER 1990). Weitere Unterstützung erhielt diese These durch die Feststellung, dass Patienten mit parasitären Infektionen sehr hohe sIgG₄-Spiegel (50-95 % des Gesamt-IgG, Normwert < 4 %) aufwiesen und diese trotz hoher IgE-Titer nur selten allergische Reaktionen entwickelten (HUSSAIN et al. 1992). Die blockierende Eigenschaft der Seren (gemessen durch Histamin-Freisetzung-Assays) konnte durch Entfernen der sIgG₄-Antikörper bei diesen Patienten zudem wieder aufgehoben werden (HUSSAIN et al. 1992, AGRESTI & VERCELLI 1999, RIHET et al. 1992, VERCELLI et al. 1998). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Menge und die Affinität der sIgG₄-Antikörper eine entscheidende Rolle spielen, da nur bei hohen Mengen oder einer hohen Affinität eine wirksame Konkurrenz mit dem FcεR-I-ständigen IgE-Molekül um die Antigen-Bindung erreicht werden kann (AAAI

1995). SIgG₄ kann fast keine Komplementfaktoren fixieren und bindet nur mit schwacher Affinität an Fc-Rezeptoren, so dass eine Antigen-Bindung an sIgG₄ keine potentiell gefährlichen Reaktionen bewirkt (AGRESTI & VERCELLI 1999, RÖVER et al. 2002). Weitere Bestätigung fand diese These dadurch, dass erfolgreich passive Immunisierungen mit γ -Globulinen von nicht allergischen Imkern durchgeführt werden konnten (LESSOF et al 1977, JARISCH 1981, MÜLLER et al. 1986, BOUSQUET et al. 1987a, MÜLLER & MOSBECH 1993).

Einige Autoren nehmen jedoch heute wieder Abstand von der Hypothese der blockierenden Antikörper (EBNER et al. 1989, MÜLLER 1994a). Sie stellen die T-Zell-Antwort, die letztlich auch die B-Zell-Antwort steuert, ins Zentrum der Überlegung. In älteren Studien wurde die Induktion von CD8⁺-T-Suppressor-Zellen beschrieben (ROCKLIN et al. 1980). Gemäß dem derzeitigen Kenntnisstand sind die Hauptzielzellen der spezifischen Immuntherapie die CD4⁺-T-Helfer-Zellen (SALOGA 2003). CD4⁺-T-Helfer-Zellen lassen sich anhand ihrer Zytokinmuster, die sie sezernieren, in TH1-Zellen und TH2-Zellen unterteilen. Hauptzielzellen der IT sind insbesondere die TH2-Zellen. TH2-Zellen induzieren durch eine IL-5 Produktion die von eosinophilen Granulozyten geprägte allergische Entzündung und mit Hilfe von IL-4 und IL-13 die IgE-Synthese von B-Lymphozyten. Die IT hemmt die Funktion der TH2-Zellen durch Aktivierung regulatorischer CD4⁺ T-Zellen, die TGF- β und IL-10 produzieren und eine immunologische Toleranz vermitteln (AKDIS et al. 1998b, BELLINGHAUSEN et al. 1997, JUTEL et al. 2003, NOURI-ARIA et al. 2004, KLEINE-TEBBE et al. 2006). Des Weiteren kommt es zu einer verminderten Reaktionsbereitschaft der TH-Zellen mit abnehmender Zytokinproduktion und Proliferation nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor. Dies weist darauf hin, dass die allergenspezifischen TH-Zellen nicht den programmierten Zelltod durchlaufen haben, sondern sich in einem Zustand des Nichtansprechens befinden, der auch als Anergie bezeichnet wird (AKDIS et al. 1998, EVANS et al. 1976, MARCOTTE et al. 1998, MÜLLER et al. 1998). Langfristig kommt es zu einer Umorientierung der Polarisierung der T-Helfer-Zell-Antwort von TH2- in Richtung TH1-Zell-Antwort sowie zur Induktion einer immunologischen Toleranz gegen die verwendeten Allergene durch Hemmung der TH2-Zell-Antwort (BELLINGHAUSEN et al. 1997). IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen stimuliert die IFN- γ -Produktion der TH1-Zellen und hemmt dadurch die IgE-Bildung und die Differenzierung von TH2-Zellen (BELLINGHAUSEN et al. 1997, JUTEL

et al. 2003, SECRIST et al. 1993). Es kommt zu einer Induktion der sIgG-, insbesondere der sIgG₄-Produktion (AKDIS et al. 1998, GLEICH et al. 1982) und gegebenenfalls zu einer langsamen Reduktion der allergenspezifischen IgE-Produktion (BOUSQUET et al. 1986, GLEICH et al. 1982). Somit verschiebt sich der IgG₄/ IgE-Quotient, mit Auswirkungen auf die Antigenpräsentation (VAN NEERVEN et al. 1999). Zusätzlich wird die Beteiligung von Effektorzellen wie Mastzellen und basophilen Granulozyten an der allergischen Entzündung gebremst (PIERKES et al. 1999, WILSON et al. 2001a, WILSON et al. 2001b). **Abbildung 1** und **Tabelle 8** geben eine zusammenfassende Übersicht über die pathophysiologischen Überlegungen der Wirkungsweise der IT.

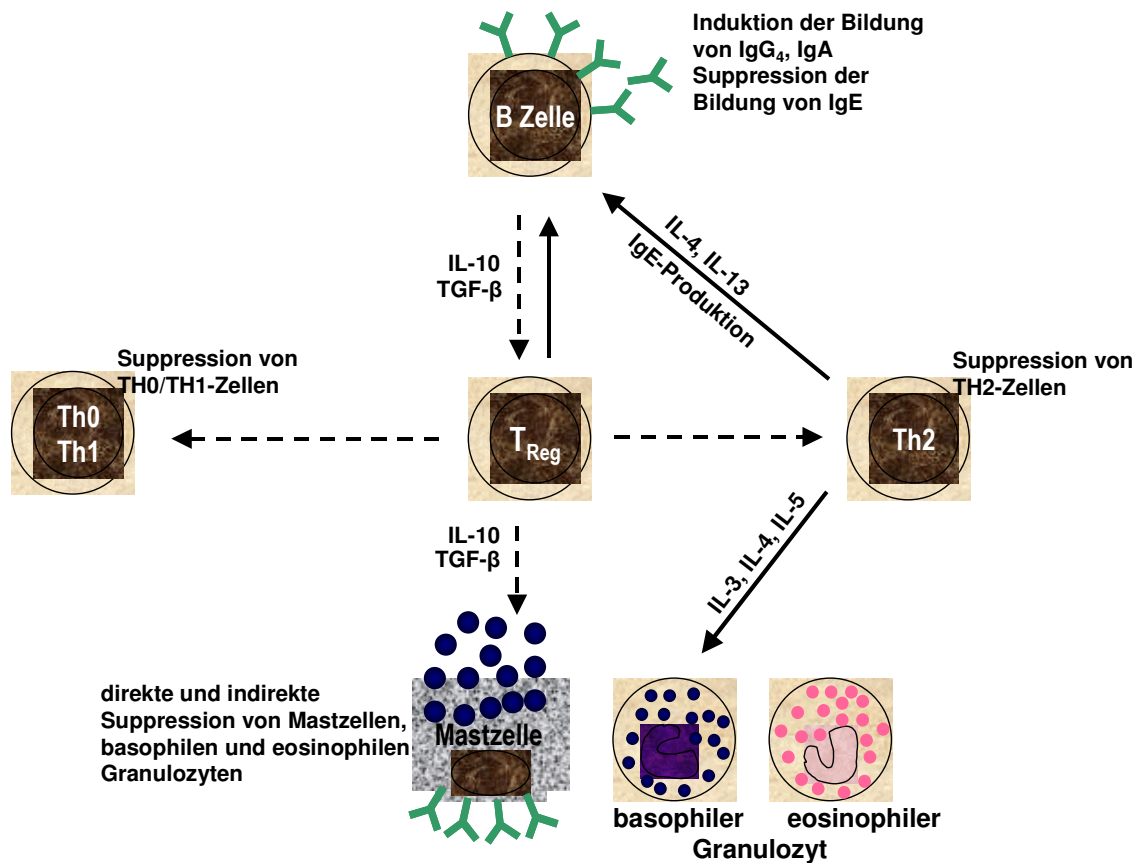


Abbildung 1: Allergische Immunantwort und Wirkungsweise der IT
 —→ Stimulation, - - - → Suppression (optimiert nach WÜTHERICH et al. 1993)

Erklärungsmodell	Literatur
Bildung blockierender Antikörper der Subklasse IgG ₄	WANG et al. 1992, REINHARDT 1996, JARISCH & HEMMER 1996, PATTERSON 1998, ALBEGGER 1990, SCHOENWETTER 1996, JUGERT et al. 1993
Initialer Anstieg und konsekutive Suppression der spezifischen IgE-Antikörper	CLARK & REES 1997, RUPPERT 1985, TSANZ 1997, LOCKEY 1990, CRETICOS 1995
Zunahme der sekretorischen IgA	CLARK & REES 1997, RUPPERT 1985, WAHN 1991, CRETICOS 1995
Verminderte Reaktivität von sensibilisierten basophilen Leukozyten im Blut	CLARK & REES 1997, WAHN 1991, CRETICOS 1995
Abnahme der antigeninduzierten T-Lymphozytenantwort	WAHN 1991, CRETICOS 1995
Switch von TH2- zu TH1-Lymphozyten	DURHAM et al. 1991, BOUSQUET & MICHEL 1992
Induktion von Treg	AKDIS & BLASER 2000

Tabelle 8: Pathophysiologische Überlegungen zur Wirkungsweise der spezifischen Hyposensibilisierung

Auch wurde bei Insektengiftallergikern eine Abnahme der Proliferation von peripheren mononukleären Blutzellen nach Allergenstimulation im Laufe der Hyposensibilisierung beschrieben (AKDIS et al. 1996, BELLINGHAUSEN et al. 1997, JUTEL et al. 1995, MÜLLER et al. 1998).

In zahlreichen Studien wurde eine hohe Effizienz der Insektengiftimmuntherapie ermittelt, meist zwischen 80-95 % (GOLDEN et al. 1998, GRAFT & SCHOENWETTER 1994, LERCH & MÜLLER 1998, MÜLLER & MOSBECH 1993, MÜLLER et al. 1991). Dabei scheinen Wespengiftallergiker durch Wespengift-IT besser geschützt zu werden (> 90 %) als Bienengiftallergiker durch Bienengift-IT (75-80 %) (GOLDEN et al. 1998, LERCH & MÜLLER 1998, MÜLLER et al. 1991, MÜLLER et al. 1992). Systemische Nebenwirkungen wurden zudem häufiger bei Bienen- als bei Wespengift-IT beobachtet (BOUSQUET et al. 1987b, YUNINGER et al. 1979).

Abschließend lässt sich festhalten, dass der Erfolg der spezifischen Immuntherapie vermutlich auf einer funktionellen Umorientierung und einer Toleranzentwicklung antigenspezifischer T-Lymphozyten mit verminderter allergischer Reaktionsbereitschaft und Entzündung beruht (KLEINE-TEBBE et al. 2000, NORMAN 1993).

1.5.3 Durchführung der spezifischen Immuntherapie

Im Rahmen der spezifischen Immuntherapie bei Insektengiftallergien kommen verschiedene Einleitungsschemata zum Einsatz. Dabei unterscheiden sich die Protokolle im Wesentlichen durch die Zeitdauer bis zum Erreichen der gewünschten Erhaltungsdosis von 100µg Insektengift (MÜLLER 1994a). Bei der Schnell-, Rush oder Ultrarush-Hyposensibilisierung wird durch tägliche Gabe von ca. 4-7 Injektionen wässrigen Extraktes binnen 2-10 Tagen unter stationären Bedingungen die Höchstdosis erreicht. Eine Erhaltungstherapie kann dann ambulant in verlängerten Intervallen erfolgen.

Ist es nach einer Injektion zu einer systemischen Reaktion wie Rhinokonjunktivitis, Juckreiz, Urtikaria, Asthma oder Kreislaufreaktionen gekommen, so wird je nach Stärke der Reaktion empfohlen mindestens 2-3 Stufen zurückzugehen (KLEINE TEBBE et al. 2000). Allergische Allgemeinreaktionen sind bei der Immuntherapie mit Insektengift relativ häufig. Mit Bienengift werden sie in 20-40 %, mit Wespengift in 5-15 % der Patienten beobachtet (REIMERS & MÜLLER 2004).

1.5.4 Dauer der spezifischen Immuntherapie

Sehr kontrovers werden die Outcomeparameter diskutiert, an denen die erfolgreiche Beendigung der Hyposensibilisierung bei Insektengiftallergikern fixiert werden kann. Die Empfehlung für die notwendige Behandlungsdauer der spezifischen Immuntherapie beträgt derzeit in der Regel drei Jahre (LOCKEY 1990, GOLDEN et al. 1996 & 2001, PRZYBILLA et al. 2004, RUËFF et al. 2000 & 2004). Eine längere Behandlung, auch lebenslang, wird bei Patienten mit einem erhöhtem individuellen Risiko, beispielweise sehr schwere Stichreaktion, höheres Alter, kardiovaskuläre Erkrankungen, Mastozytose, erhöhte basaler Serumtryptasekonzentration, besondere Hymenopteren-Exposition, eventuell auch bei auffällig hoher Konzentration an spezifischen Serum-IgE-Antikörpern bzw. auffällig niedriger Hauttestschwelle nach längerer Therapiedauer, empfohlen (PRZYBILLA et al. 1999, OUDE-ELBRINK et al. 1997).

Ein Labortest, mit dem die notwendige Dauer und der Erfolg einer spezifischen Immuntherapie mit Hymenopteregift vorhergesagt werden kann, existiert jedoch derzeit nicht. Auch die klinischen Hauttestverfahren liefern hierzu keine zuverlässige Aussage. Die Kombination aus einem negativem intrakutanem Hauttest bei 1 µg/ml mit nicht nach-

weisbaren giftspezifischen IgE-Antikörpern gestattet mit einiger Sicherheit die Prognose eines vollen Schutzes (LOCKEY 1990). Diese Reaktionslage wird aber selbst nach mehrjähriger Immuntherapie nur selten erreicht. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass ein Jahr nach Abbruch einer drei- bis fünfjährigen Immuntherapie die große Mehrzahl der Patienten einen Stichprovokationstest gut verträgt (URBANEK et al. 1985, GOLDEN et al. 1991, MÜLLER et al. 1991, HAUUGARD et al. 1991, REISMAN 1991). Jedoch steigt bei wiederholten Reexpositionen nach Abbruch der Behandlung die Zahl der Patienten, die wiederum eine Allgemeinreaktion erleiden (MÜLLER et al 1993). Häufiger treten diese Rückfälle bei Bienengiftallergikern auf und bei solchen, die während der Einleitung der Immuntherapie systemische allergische Nebenwirkungen erlitten (MÜLLER 1994b).

Der einzig anerkannte und in den Fachrichtlinien empfohlene Test mit prognostischer Bedeutung ist der Stichprovokationstest mit einem lebenden Insekt (RING et al. 1997). Die Reaktion des Patienten auf einen akzidentellen Stich („Feldstich“) ist demgegenüber weniger aussagekräftig. Die Wirksamkeit wird hierbei retrospektiv erfasst, wenn in den Folgejahren ein Feldstich stattgefunden hat. Das größte Problem bei einem zufälligen Stich ist jedoch die Unsicherheit, ob der Patient tatsächlich von dem Insekt gestochen wurde, mit dessen Gift er zuvor hyposensibilisiert worden war (SCHUBERTH et al. 1983). Stichprovokationstests sollten 6-12 Monate nach Erreichen der Erhaltungsdosis, jedoch nicht nach Abschluss der Behandlung routinemäßig erfolgen, da das Risiko einer Resensibilisierung besteht (RUËFF et al. 2000, LERCH et al. 1998). Einige Arbeitsgruppen lehnen daher die Stichprovokation ab. Ebenfalls sollte er nicht unmittelbar nach der Schnellhyposensibilisierung stattfinden, da das Fehlen einer Reaktion dann auch auf einem unspezifischen Refraktärzustand nach Zufuhr hoher Giftdosen beruhen könnte (PRYZIBILLA 1993). Sollte es im Rahmen der Stichprovokation erneut zu einer anaphylaktischen Reaktion kommen, so wird die Erhaltungsdosis auf 200µg gesteigert. Eine ausbleibende oder abgeschwächte Reaktion auf einen erneuten Stich bestätigt die Wirksamkeit der Hyposensibilisierungsbehandlung. Das Argument, dass die erhöhte Ausschüttung von endogenen Katecholaminen bei einer geplanten Stichprovokation (und entsprechend angespannter Erwartungshaltung des Patienten) das Ergebnis verfälschen könnte, wurde in einer Studie von Hauk et al. widerlegt (HAUK et al. 1995).

In den letzten Jahren wurden auch neuere Laborverfahren dahingehend untersucht, ob sie sich möglicherweise dazu eignen, den Therapieerfolg zu überprüfen. Hipler et al. konnten in einer Studie zur Verlaufskontrolle der Hyposensibilisierung mit Hilfe des Zellantigenstimulationstests (CAST) zeigen, dass es lediglich bei 2 von 30 Wespengiftallergikern zu einem Absinken der Sulfidoleukotrienwerte während der IT kommt (HIPLER et al. 2001). Ebenso fanden sich in einer Studie von Erdmann et al. während der IT bei 25 Patienten keine Änderungen der wespengiftstimulierten CD63-Expression auf peripheren Basophilen (Basophilenaktivierungstest) vor einer vertragenen Stichprovokation (ERDMANN et al. 2004). Diese Testverfahren stellen somit keine geeigneten Verfahren zur Verlaufskontrolle der spezifischen Immuntherapie dar.

Insektengiftspezifischen IgG-Antikörpern wurde immer wieder die Rolle von Schutzantikörpern zugeschrieben. Jeep et al. konnten in einer Studie mit 20 Bienengiftallergikern zeigen, dass bei Patienten, die in der Stichprovokation ungeschützt waren, bei mindestens einer Allergenbande, bei der sie sIgE-Ak aufwiesen, keine sIgG₄-Ak nachweislich waren. Bei geschützten Patienten waren bei allen Banden, bei denen vor IT sIgE-Ak vorhanden waren, auch sIgG₄-Ak nachweisbar (JEEP et al. 1996). Somit galten die Patienten als geschützt, bei denen gegen all jene Allergenbanden, die sIgE gebunden hatten, auch eine sIgG₄-Reaktivität vorhanden war. Diese von Jeep et al. 1996 erstmals aufgestellte Hypothese konnte in einer Studie von Ollert et al. 2000 Bestätigung finden. Ollert et al. wiesen in einer kleineren Gruppe mit 48 hyposensibilisierten Patienten nach, dass sechs Patienten bei der Stichprovokation mit einer systemisch anaphylaktischen Reaktion reagierten, wobei gezeigt werden konnte, dass das Ausbleiben eines klinischen Schutzes stark mit einer fehlenden Induktion von IgG₄-Antikörpern gegen diejenigen Giftallergene assoziiert war, gegen die im Patientenserum vor Behandlungsbeginn mittels Immunoblot IgE-Antikörper nachweisbar waren (OLLERT et al. 2000). In einer größeren Serie mit 362 Patienten konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden (OLLERT et al. 2003).

Kontrolluntersuchungen (Anamnese, Hauttest, sIgE-Ak) im Rahmen der IT zur Erkennung auffälliger Verläufe sollten einmal jährlich sowie bei bedeutsamen Therapieebenenwirkungen nach neuerlichen Hymenopterenstichen, vor Stichprovokation und vor geplantem Therapieende stattfinden (RUEFF et al. 2000). Das Rezidivrisiko nach

Absetzen der Hymenopterengifthyposensibilisierung erneut auf einen Stich mit einer anaphylaktischen Reaktion zu reagieren, wird in der Literatur mit 10-20 % angegeben. In diesem Fall sollte eine erneute Hyposensibilisierung eingeleitet werden (RUËFF et al. 2000).

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Derzeit existiert in der Insektengift-Allergiediagnostik kein Labortest mit dem die notwendige Dauer und der Erfolg einer spezifischen Immuntherapie vorhergesagt werden könnte. Von den Laborparametern, die sich unter der spezifischen Immuntherapie ändern, hat hinsichtlich der prognostischen Bedeutung vor allem das sIgG₄ an Bedeutung gewonnen. Insektengiftspezifischen IgG-Antikörpern wurden in der Vergangenheit häufig die Rolle von Schutzantikörpern zugeschrieben. Jeep et al. konnten hierbei in einer Studie mit 20 Bienengiftallergikern zeigen, dass sich bei Patienten, die in der Stichprovokation ungeschützt waren, bei mindestens einer Allergenbande, bei der sIgE-Ak vorhanden waren, keine sIgG₄-Ak nachweisen liessen. Bei geschützten Patienten hingegen waren bei allen Banden, bei denen vor IT sIgE-Ak nachweislich waren, auch sIgG₄-Ak zu verzeichnen (JEEP et al. 1996). Diese von Jeep et al. erstmals aufgestellte Hypothese konnte in einer Studie von Ollert et al. in einer kleineren Studie mit 48 hyposensibilisierten Wespengiftallergikern Bestätigung finden (OLLERT et al. 2000). In einer größeren Studie mit 362 Patienten konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden (OLLERT et al. 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die von Jeep et al. beschriebene Hypothese zu überprüfen, um somit eine Aussage über die prognostische Wertigkeit der Immunoblot-Untersuchung bei Hymenoptereingift-Allergie bezüglich einer Stichreaktion zu tätigen.

Hierzu wurden zwei Patientenkollektive untersucht:

1. Imker und deren Angehörige
2. Patienten mit Hymenoptereingiftallergie unter IT vor Stichprovokation

Serumproben der Patienten wurden mittels Immunoblot auf ihre sIgE und sIgG₄ Antikörper untersucht. Die Immunoblotstreifen wurden zunächst optisch ausgewertet. In einem weiteren Schritt erfolgte ebenfalls eine densitometrische Analyse der Immunoblotstreifen mittels Scanner und Software. Ziel der Untersuchung war es auch zu überprüfen, ob eine automatisierte Blotstreifenauswertung der optischen überlegen ist und somit weitere diagnostische Vorteile erbringen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Studienkollektive

2.1.1 Studienkollektiv A

Das Studienkollektiv setzte sich aus zwei Gruppen zusammen. In der ersten Gruppe (Gruppe A) befanden sich 39 Personen, die einem erhöhten Risiko ausgesetzt waren, von einer Biene gestochen zu werden. Diese Gruppe beinhaltete Imker, deren Ehepartner und Kinder aus dem Raum Münster, mit einem medianen Alter von $64 \pm 11,72$ Jahren (16 bis 78) (**Abbildung 2**), die aufgrund ihrer beruflichen Prädisposition multiplen Bienenstichen ausgesetzt sind. In dieser Gruppe überwog der Anteil der Männer mit 82,1 % (**Abbildung 3**).

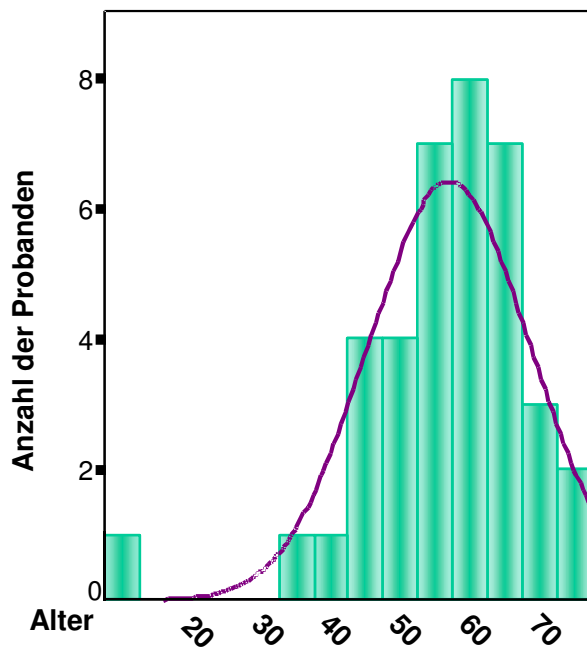


Abbildung 2: Altersverteilung in Gruppe A

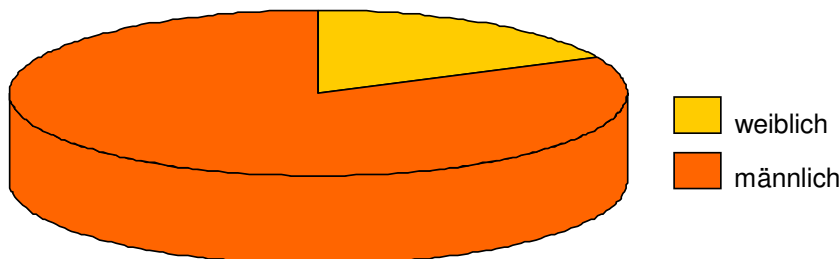


Abbildung 3: Geschlechtsverteilung in Gruppe A

Das mediane Alter der Männer betrug 61 ± 12 (16 bis 78), das der Frauen 65 ± 11 (52 bis 78) Jahre. Stichtag für die Altersberechnung war der 31.12.2002.

Angehörige dieses Kollektivs wurden im Rahmen eines Imkerseminars freiwillig rekrutiert. Die Probanden mussten einen ausführlichen Allergiefragebogen ausfüllen sowie sich für die in-vitro-Testung 10 ml Blut aus der Kubitalvene entnehmen lassen. Das durch Zentrifugation aus dem Blut gewonnene Serum diente anschließend zur Bestimmung des Gesamt-IgEs und des allergenspezifischen-IgEs mittels CAP-System sowie des Nachweises von allergenspezifischem-IgE und -IgG₄ mit Hilfe des Immunoblots. In dem Allergiefragebogen, der in **Abbildung 4** exemplarisch aufgeführt ist, wurden die Anzahl der Bienenstiche pro Jahr, der Expositionszeitraum in Jahren, eine atopische Diathese, Begleitmedikamente, die Art der Reaktion nach einem Bienenstich und das Jahr des letzten Stichs erfasst. Die Art der auftretenden Reaktion nach einem Bienenstich wurde in Lokalreaktion, gesteigerte Lokalreaktion und allergische Reaktion unterteilt. Einfache Lokalreaktionen waren gekennzeichnet durch eine lokale Schwellung < 10 cm, eine gesteigerte Lokalreaktion bestand per definitionem in einer Schwellung > 10 cm ohne dem Auftreten weiterer kutaner oder systemischer Symptome. Gesteigerte und einfache Lokalreaktionen wurden in die Gruppe der nicht allergisch bedingten Reaktionen zusammengefasst. In der Gruppe der allergischen Reaktionen wurden rein kutane von systemischen Symptomen unterschieden. Zu den kutanen Symptomen zählten ein palmarer bzw. plantarer Pruritus, generalisierter Pruritus, Urtikaria, Quincke-Ödem und Rötung des gesamten Integuments. Zu den systemischen Symptomen zählten das Auftreten von Dyspnoe, Cephalgien oder einer Kreislaufdysregulation. Zur Einteilung der Reaktionen nach einem Insektenstich wurden zwei Gruppen gebildet. Zur Gruppe der Non-Reactors zählten Probanden, die auf einen Bienenstich mit einer Schwellung < 10 cm oder einer gesteigerten Lokalreaktion bei ausbleibenden allergischen Symptomen reagierten. Zu der Gruppe der Reactors zählten Probanden, die mit kutanen oder systemischen Symptomen reagierten.

Unter Atopie waren das Vorhandensein von Heuschnupfen, Neurodermitis und Nahrungsmittelunverträglichkeiten zusammengefasst. Die Fragebögen der 39 Probanden der Gruppe A sowie die Ergebnisse der Blutuntersuchung wurden im Herbst 2001 erhoben.

Frau _____, Herr _____			
Name: _____		Vorname: _____	
Straße: _____			
Postleitzahl: _____		Stadt: _____	
Geburtsdatum: _____		Imkerei seit: _____	
Durchschnittliche Anzahl Bienenstiche im Jahr: _____			
Anzahl der Bienenstiche im Jahr 2001: _____			
2002: _____			
Wurde schon mal ein Allergietest mit Bienengift durchgeführt?		nein	ja
Zeigte der Test eine Allergie auf Bienengift?		nein	ja
Wurde/wird eine Hyposensibilisierung mit Insektengift durchgeführt?		nein	ja
In den Jahren _____			
Haben sie		Heuschnupfen	nein ja
		Asthma	nein ja
		Atopisches Ekzem (Neurodermitis)	nein ja
Vertragen sie Honig?		nein	ja
Wenn nein, welche Reaktionen sind aufgetreten? _____			
Haben sie Allergien gegen andere Nahrungsmittel?		nein	ja
Welche? _____			
Reaktion:		Kribbeln im Mundbereich	nein ja
		Luftnot	nein ja
		Reaktionen an der Haut	nein ja
		Magen-Darm Probleme	nein ja
Nehmen sie Blutdruckmedikamente			nein ja
		β-Blocker	nein ja
		ACE-Hemmer	nein ja
Wie reagieren sie normalerweise auf Bienenstiche?			
		Schwellung kleiner als 10 cm	ja
		Schwellung größer als 10 cm	ja
Hatten sie schon einmal andere Reaktionen nach einem Bienenstich?		nein	ja
Oder auf Grund mehrerer Stiche gleichzeitig		nein	ja
Anzahl der Stiche _____			
Andere Reaktionen traten auf		einmalig?	nein ja
		mehrmalig?	nein ja
Wenn andere Reaktionen aufgetreten sind, welche?			
Es kam zu			
		Juckreiz Handinnenfläche und Fußsohlen	
		Rötung der gesamten Haut	
		Juckreiz am gesamten Körper	

	Nesselfieber (Quaddeln an der gesamten Haut) Luftnot Asthma Übelkeit Kreislaufprobleme Bewusstlosigkeit Behandlung mit Medikamenten Ärztliche Behandlung wegen der Reaktion
In welchem Jahr war der letzte Bienenstich	_____
Bei diesem Stich kam es zu	Schwellung < 10 cm Schwellung > 10 cm Juckreiz Handinnenfläche und Fußsohlen Rötung der gesamten Haut Juckreiz am gesamten Körper Nesselfieber (Quaddeln an der gesamten Haut) Luftnot Asthma Übelkeit Kreislaufprobleme Bewusstlosigkeit Behandlung mit Medikamenten

Abbildung 4: Allergiefragebogen Studienkollektiv A

2.1.2 Studienkollektiv B

Das zweite Kollektiv (Gruppe B) bestand aus 22 Patienten. Hierbei handelte es sich um Patienten der Allergologie, der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten - Allgemeine Dermatologie und Venerologie - Münster, mit nachgewiesener Hymenopterenengiftallergie. Diese Patienten stellten sich in einem Zeitraum von Februar 1996 bis Juli 2001 zur Einleitung einer spezifischen Immuntherapie sowie zur Durchführung einer Stichprovokation in unserer allergologischen Sprechstunde vor.

Bei 19 Patienten bestand eine Allergie gegen Wespen-, bei 3 Patienten eine Allergie gegen Bienengift. Aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 3$) der mit Bienengift hypersensibilisierten Patienten wurden diese von der statistischen Auswertung ausgeschlos-

sen. Das mediane Alter der mit Wespengift hyposensibilisierten Patienten betrug $46 \pm 19,76$ Jahre (14 bis 83) (**Abbildung 5**). Die Geschlechtsverteilung in dieser Gruppe war relativ ausgeglichen (**Abbildung 6**).

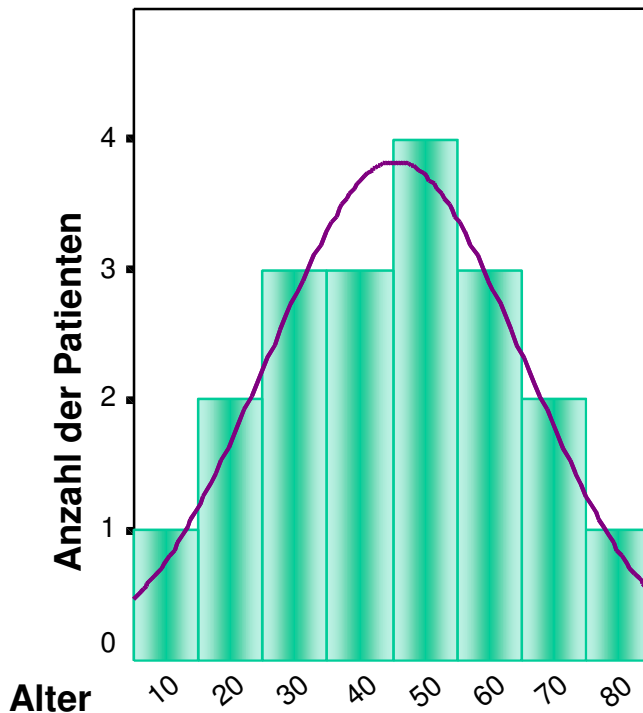


Abbildung 5: Altersverteilung in Gruppe B

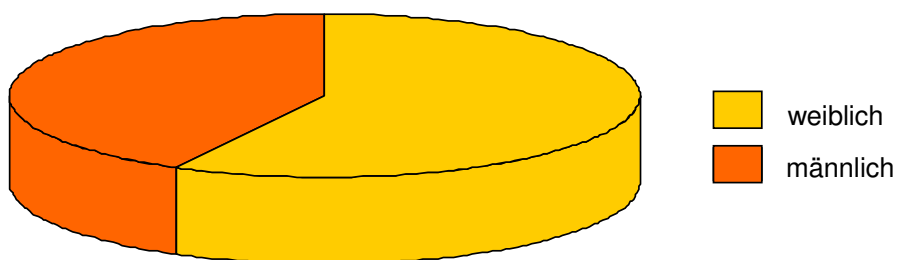


Abbildung 6: Geschlechtsverteilung in Gruppe B

Das mediane Alter der Männer betrug $45 \pm 21,7$ (15 bis 83), das der Frauen $46 \pm 18,1$ (14 bis 72) Jahre. Stichtag für die Altersberechnung war hier ebenfalls der 31.12.2002.

Die Indikation zur IT war bei den Patienten auf Grund systemischer Reaktionen von Grad II-IV nach Müller (MÜLLER 1966) nach Hymenopterenstich sowie positiver Hautteste (Intrakutan-Test positiv $< 0,1 \mu\text{g/ml}$) und einem Bienen- oder Wespengift-spezifischen IgE im Serum (RAST-Klasse 2) gestellt worden. Die Einleitung der spezi-

fischen Immuntherapie erfolgte als Ultra-Rush-Hyposensibilisierung mit Erreichen der Erhaltungsdosis von 100µg Insektengift innerhalb von 3 Tagen (ALK lyophilisiert SQ-Bienen- bzw. Wespengift, ALK Scherax, Hamburg) und anschließender ambulanter Weiterbehandlung mit Injektionen von 100µg Insektengift alle 4-6 Wochen für 3-5 Jahre (Protokoll siehe **Abbildung 7**).

Im Behandlungszeitraum hatte bei keinem der Patienten ein Feldstich stattgefunden. Diese Gruppe setzte sich aus 22 Patienten (19 mit Allergie gegen Wespengift und 3 mit Allergie gegen Bienengift) zusammen. Vor Einleitung der IT wurde anamnestisch der Schweregrad der allergischen Reaktion beim Indexstich erfasst, wobei mit Indexstich der Insektenstich bezeichnet wurde, auf den mit einer allergischen Reaktion reagiert wurde. Darüber hinaus wurden vor sowie im Verlauf der Hyposensibilisierungsbehandlung Gesamt-IgE und allergenspezifisches-IgE mittels CAP-FEIA bestimmt (Pharmacia, Uppsala, Schweden) als auch allergenspezifisches-IgE sowie -IgG₄ mit Hilfe des AlaSTAT AlaBLOT Systems (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) nachgewiesen. Alle 22 Patienten unterzogen sich im Median nach $8,5 \pm 11,5$ (3 bis 50) Monaten einer Stichprovokation mit einem lebenden Insekt. Die Stichprovokation wurde in Notfallbereitschaft und bei liegendem intravenösem Zugang mit einer lebenden Wespe durchgeführt. Hierzu wurde die Wespe auf die volare Unterarmseite des Patienten aufgebracht und zum Stich veranlasst. Die sich entwickelnde Reaktion wurde sorgfältig dokumentiert. Nach der Stichprovokation erfolgte eine Nachbeobachtung, in der Regel über einen Zeitraum von zwei Stunden.

Insektengifthyposensibilisierung

Biene **Wespe**

Blutdruck vor Therapie: _____

Konzentration	ml	Datum	Uhrzeit	Unterschrift	Reaktion	Medikamente
Flasche 1 0,1 µg/ml	0,1					
Flasche 2 1,0 µg/ml	0,1					
Flasche 3 10,0 µg/ml	0,1					
Flasche 4 100 µg/ml	0,1					
	0,2					
	0,4					
	0,8					
100 µg	1,0					
100 µg	1,0					

Reaktion: ja nein

Injektionszahl: 9 _____

Abweichung vom Protokoll: warum: _____

Stichprovokation Aufklärung: wann: _____

Bei jeder Reaktion Überwachungsplan ausfüllen!

Abbildung 7: Protokoll Insektengifthyposensibilisierung (Universitätsklinikum Münster)

2.2 Immunoblot

Der Nachweis von allergenspezifischen IgE- und IgG₄-Antikörpern erfolgte mit Hilfe des AlaSTAT AlaBLOT Systems (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland). Hierbei handelt es sich um eine Western-Blot Analyse, bei der eine Reaktion zwischen auf dem Immunoblot gebundenen Allergenen und den im Serum korrespondierenden Antikörpern vom Typ IgE-/IgG₄ stattfindet. Neben der Verifizierung und Bestätigung vorliegender Ergebnisse anderer in vitro- und in vivo-Methoden, beispielweise den Haut-

tests, lassen sich mit dem Immunoblot die Proteinspezifitäten der zirkulierenden IgE- oder IgG₄-Antikörper identifizieren und charakterisieren. Somit kann eine semiquantitative Antikörperanalyse auf Einzellallergene des Bienen- und Wespengifts durchgeführt werden (JUNG et al. 2002). **Abbildung 8** zeigt exemplarisch jeweils einen Immunoblotstreifen für Bienen- sowie Wespengift mit dem Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen die Hauptallergene des jeweiligen Insektengifts.

Die Antigene werden elektrophoretisch mittels der SDS-PAGE entsprechend ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung aufgetrennt. Sie wandern dabei als feine Antigen-Banden durch das Gel, bevor sie elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Anschließend erfolgt die Antigen-detektion mit Antikörpern durch eine Inkubation der Membranen mit Antiseren.

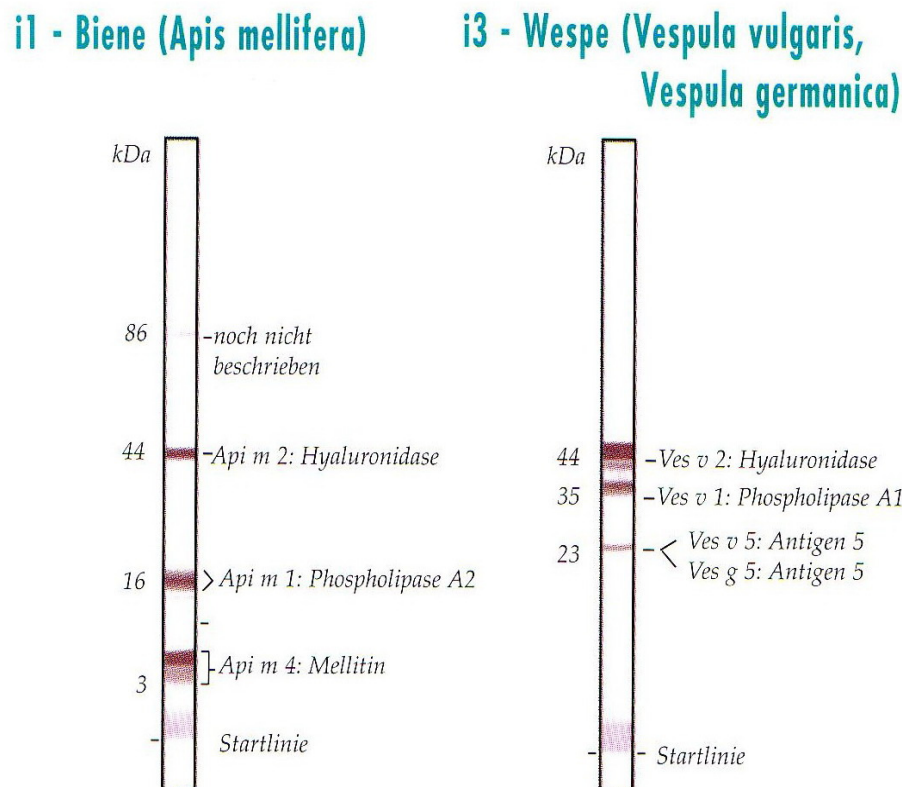


Abbildung 8: Nachweis sIgE-Ak gegen die Hauptallergene des jeweiligen Insektengifts (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland).

Der AlaBLOT wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden die Patientenproben vor Beginn des Assays mit Serumverdünnungspuffer in einem Ver-

hältnis von 1:10 (50 μ l der Probe/ 450 μ l Puffer) verdünnt. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die benötigte Anzahl Antigen-beschichteter Nitrozellulose-Streifen aus dem Röhrchen entnommen und in Reservoirs der Inkubationswanne mit der Markierung nach oben gelegt. Anschließend wurden die Immunoblot-Streifen 5-10 Minuten auf einem Schüttler in je 1000 μ l Waschlösung rehydriert. Nach vollständiger Rehydrierung der Immunoblot-Streifen wurde die Waschlösung verworfen. In einem nächsten Schritt wurden 500 μ l vorverdünntes Patientenserum in die entsprechenden Reservoirs pipetiert und für 2 Stunden inkubiert. Während der Inkubation kam es zu einer Bindung, zwischen den in den Patientenproben vorhandenen IgE- oder IgG₄-Antikörpern entsprechend ihrer Spezifität und den auf den Streifen vorliegenden Antigenen.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden in einem Waschschrift ungebundene Reaktionspartner entfernt. Hierzu wurde in jedes Reservoir 1 ml gepufferte Waschlösung pipetiert und jeweils 5 bis 10 Minuten unter Schütteln gewaschen. Die Waschlösung wurde vollständig abgesaugt und der gesamte Vorgang noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden 500 μ l monoklonale, mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-Humane-IgE- oder IgG₄ Immunglobuline hinzugegeben. Im Zuge der folgenden 30-minütigen Inkubation kam es zu einer Bindung dieser Antikörper an die spezifischen IgE- oder IgG₄-Antikörper in Form eines sogenannten Sandwich-Komplexes. Überschüssiges Konjugat wurde durch erneutes Waschen (3x) der Streifen entfernt und ein Enzymsubstrat (500 μ l), welches 5`Brom-4`Chlor-3`Indolyl-Phosphat-Toluoidin (BCIP) und 4`Nitro-Tetrazolium Chloridblau (NBT) enthielt, hinzugegeben. Während der 15-minütigen Inkubation hydrolysierte die in den Sandwich-Komplexen gebundene Alkalische Phosphatase nun dieses Substrat zu einem farbigen Endprodukt, so dass die Proteinbanden als Linien sichtbar wurden. Im letzten Schritt wurde nun die Farbentwicklung durch Absaugen der Substratlösung gestoppt und anschließend mit 1 ml Aqua dest. 3 x für 5 Minuten gewaschen. Die Blotstreifen wurden mit einer Pinzette aus den Reservoirs entnommen und auf Filterpapier an der Luft getrocknet. Durch Vergleich mit definierten Banden der Molekulargewichtsmarker wurden die in den Proben vorhandenen Antikörper entsprechend ihrer Spezifität charakterisiert. Die Unterschiede bei der Testdurchführung von sIgE und sIgG₄ liegen bei diesem System lediglich in den Inkubationszeiten und der für sIgG₄ notwendigen Vorverdünnung von 1:1000. In **Abbildung 9** ist ein AlaBLOT-Streifen mit aufgetrennten Proteinen eines Allerge-

nextrakts zum Nachweis epitop-spez. IgE-/IgG₄-Antikörper im Patientenserum dargestellt.

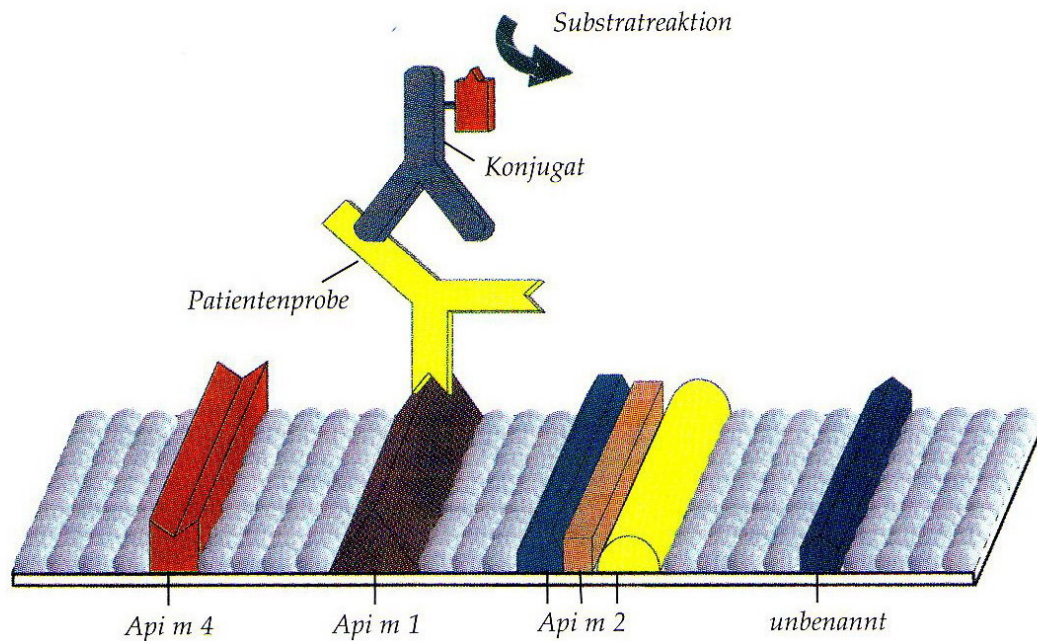


Abbildung 9: AlaBLOT-Streifen mit aufgetrennten Proteinen eines Allergenextraktes zum Nachweis epitop-spez. IgE-/IgG₄-Antikörper im Patientenserum (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland).

Das Molekulargewicht der Banden kann zur genaueren Charakterisierung unter Zuhilfenahme der rot gefärbten Startlinie des Immunoblots abgeschätzt werden. Dazu wird die im Gel zurückgelegte Laufstrecke des betreffenden Antigens mit der Laufstrecke der Molekulargewichtsmarker verglichen. Für die AlaBLOT-Streifen kann dazu die Entfernung der zu charakterisierenden Bande von der Grundlinie in Millimetern gemessen werden. Das betreffende Molekulargewicht wird dann entsprechend der nachfolgenden Formel berechnet.

$$\text{Log Molekulargewicht (kD)} = 0,035 \times \text{Entfernung (mm)} + 0,75$$

Die Formel wurde für Molekulargewichte innerhalb des linearen Bereichs des Blots zwischen 14 kD und 200 kD verifiziert und bestätigt.

Die densitometrische Auswertung mittels Scanner und Software ermöglicht eine semi-quantitative Analyse des AlaBLOT-Ergebnisses bezüglich des relativen Gehalts an An-

tikörpern im Serum. Hierzu wurden die Blotstreifen gescannt und die Bandenintensität in Abhängigkeit von der Lage der Bande auf dem Blotstreifen, d.h. dem Molekulargewicht (in kD) entsprechend, durch das Programm erfasst. Ausgewertet wurden die Daten mit dem QuantiScan Version 3.0 für Windows von der Firma Biosoft.

Die Allergenbanden auf den Immunoblotstreifen des sIgEs wurden zur weiteren diagnostischen Auswertung mit den korrespondierenden Banden des sIgG₄s verglichen. Hierbei wurden „vollständige“ von „unvollständigen“ Bandenmustern unterschieden. Ein „unvollständiges“ Bandenmuster bestand bei einem isolierten Mangel an sIgG₄-Reaktivität bei mindestens einer Allergenbande. In der Vergangenheit wurde ein vollständiges Bandenmuster bereits als prognostisches Kriterium eines eingetretenen Schutzes im Rahmen einer Hyposensibilisierungstherapie gedeutet (JEEP et al. 1993). Somit ist die Einteilung in „vollständiges“ und „unvollständiges“ Bandenmuster gleichzusetzen mit „ungeschützt“ und „geschützt“. In **Abbildung 10** ist exemplarisch eine Scannerauswertung eines Immunoblotstreifens dargestellt.

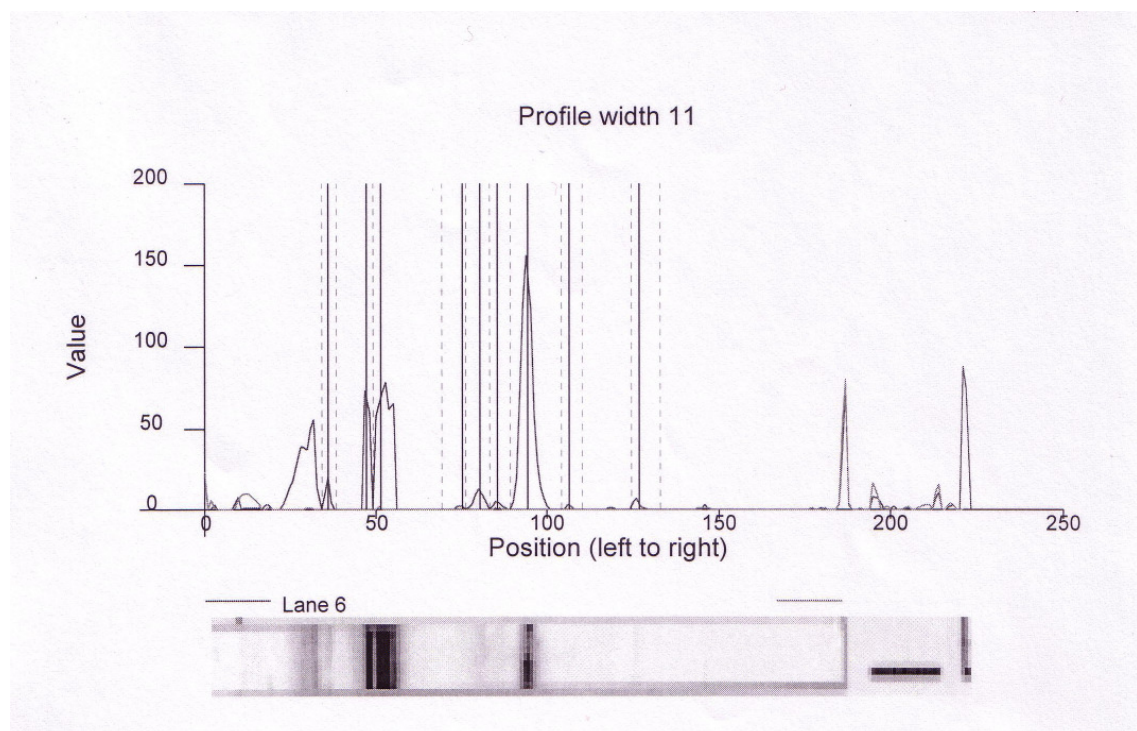


Abbildung 10: Scannerauswertung Immunoblotstreifen

2.3 Gesamt IgE, allergenspezifisches IgE

Das Pharmacia CAP System IgE FEIA (Pharmacia, Uppsala, Schweden) ist ein in vitro Fluoroenzymimmunoassay, bei dem das spezifische Allergen an ein Cellulose Carrier Polymer (CAP) gebunden ist (Festphase). Es kann zur quantitativen Messung von Gesamt- und sIgE aus humanem Blut herangezogen werden. Das Testprinzip beruht darauf, dass Anti-IgE, kovalent gebunden an das ImmunoCAP (Cellulose Matrix), mit sIgE aus den Serumproben der Patienten reagiert.

Zunächst wurden dazu Probandenseren mit an einer Cellulose Matrix gebundenen Anti-IgE-Antikörpern inkubiert. Im Anschluß daran wurden unspezifische Immunglobuline vom Typ E abgewaschen und β -Galactosidase-markierte Antikörper hinzugefügt, die mit dem gebundenem sIgE einen Komplex bildeten. Im Anschluß an die Inkubation wurden ungebundene Anti-IgE-Antikörper abgewaschen und der gebundene Komplex mit einer Entwicklerlösung, welches das Ezymsubstrat enthält, inkubiert. Nach Beendigung der Farbreaktion wurde die Fluoreszenz des Eluats im FluoroCount 96 gemessen.

Die Fluoreszenz ist zu der IgE Konzentration in der Serum-Probe direkt proportional. Je mehr sIgE in der Probe vorhanden ist, desto höher ist der Fluoreszenzwert. Zur Bestimmung des Gesamt-IgEs werden Eichlösungen verwendet, wobei die Werte in kU/l angegeben werden. Beim Pharmacia CAP-FEIA-System werden diese Standards auch zur Bestimmung der sIgE-Antikörper verwendet, die Werte werden dabei in kUa/l ausgedrückt. In diesem Zusammenhang steht das a für allergen-spezifische Antikörper. Werte von 0,35 kUa/l und darüber bedeuten ein Ansteigen der relativen Konzentration von allergen-spezifischen IgE-Antikörpern. Werte von weniger als 0,35 kUa/l drücken aus, dass Allergen-spezifische Antikörper nicht vorhanden oder nicht nachweisbar sind. Das Pharmacia CAP System IgE FEIA besteht aus den drei Reagenzien-Einheiten. IgE FEIA Fluoroenzymimmuno-Reagenzien, IgE FEIA Standard Reagenzien und ImmunoCAP Anti-IgE FEIA.

Neben den Reagenzien besteht das System aus der Ausrüstung und der Software für die Datenverarbeitung. Phamas und MasterCAP sind Programme zur Informationsverarbeitung im DOS/Windows-Standard und können Patientendaten bearbeiten sowie Arbeitslisten erstellen. Außerdem sammeln diese Programme Daten des Meßgeräts,

berechnen Werte und erstellen Labor- und Patientenberichte an. Zur Unterstützung des Aufbaus der Versuchsanordnung wird Positionsguide 96 verwendet, zur Verteilung der ImmunoCAP, Standards, Kontrollen und Patientenproben in die Mikrotestplatten dient der RoboCAP-Automat.

AutoCAP beinhaltet alle notwendigen Arbeitsschritte inklusive Waschen und Eluieren, Reagenzienzugabe und Einhalten der Inkubationszeit durch. Alternativ hierzu kann der Assay Washer 96 alle notwendigen Waschschritte in der Testdurchführung und die abschließende Elutionsprozedur durchführen.

Die Fluoreszenz des Eluats wird in dem FluoroCount 96 gemessen. Die Daten dieses Geräts können mit dem Phamas- oder MasterCAP-Programm zur Auswertung der Testergebnisse gesammelt und gespeichert werden.

Die Angabe der Messwerte kann quantitativ in internationalen Einheiten kU/l für das IgE (WHO 75/502) oder in Klassen erfolgen. Die Zuordnung der Klassen zu den jeweiligen Konzentrationen sowie deren Interpretation zeigt **Tabelle 9**.

Klasse	kU/l	Interpretation
0	<0,35	negativ für das betreffende Allergen
I	0,35-0,69	fraglich
II	0,70-3,49	positiv
III	3,50-17,49	
IV	17,5-52,49	stark positiv
V	52,5-99,99	
VI	>100	

Tabelle 9: Einteilung und Interpretation der IgE-Konzentration nach WHO-Klassifikation

2.4 Methoden der statistischen Auswertung

Die erhobenen Daten wurden zunächst mittels des Programms Excel 2000 der Microsoft Corporation bearbeitet und anschließend für die Erstellung von Schaubildern und Graphiken zum Teil in das Programm SPSS 11,5 übertragen. Grundlage der statistischen Auswertung des Immunoblot im Vergleich mit den verschiedenen Testmethoden ist die Vier-Felder-Tafel. Die Vier-Felder-Tafel ist eine Kontingenztafel für zwei qualitative

Merkmale mit jeweils zwei Ausprägungen, im vorliegenden Fall mit Werten aus $\{0,1\}^2$, mit 0 = negativer Ausprägung und 1 = positiver Ausprägung. Untersucht wurden Sensitivität und Spezifität des Immunoblots im Vergleich mit der Reaktion nach einem Stich sowie das Signifikanzniveau der Untersuchung. Für die graphische Darstellung wurde der Boxplot gewählt.

2.4.1 Sensitivität und Spezifität

Die wichtigste Qualität eines Labortests ist seine sogenannte Sensitivität. Die Sensitivität eines Tests beurteilt seine Qualität bezüglich des Ansprechens bei tatsächlich erkrankten Personen oder „Die Sensitivität ist die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(T^+|E^+)$, dass bei einem Patienten mit einer Erkrankung E ein bestimmter diagnostischer Test T positiv ist.“

Die Qualität eines Tests, bei negativem Ausfall auch eine negative Diagnose vorauszusagen, wird als Spezifität bezeichnet. Sie ist unter Normierungsbedingungen definiert als der Anteil der test-negativen und diagnose-negativen Individuen. Oder: „Die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(T^-|E^-)$, dass bei einem Patienten, der eine Erkrankung E nicht hat, ein bestimmter diagnostischer Test T negativ ist, heißt Spezifität.“

2.4.2 Boxplot

Der Boxplot ist eine graphische Darstellung, mit der man sich einen Überblick über die Verteilung der Daten einer Stichprobe verschaffen kann. Hierzu wird in ein Koordinatensystem, an dessen y-Achse eine Skala für das betrachtete Merkmal eingetragen ist, der Interquartilsabstand q als Kasten eingezeichnet. Vom oberen Ende des Kastens wird eine Strecke bis zum maximalen Wert gezeichnet, die aber nicht länger als das 1,5-fache des Interquartilsabstandes gezogen wird. Falls es Werte gibt, die mehr als $1,5 q$ vom oberen Ende entfernt sind, werden diese einzeln als Punkte eingetragen. Entsprechend verfährt man am unteren Ende des Kastens. Zusätzlich wird die Position des empirischen Medians markiert. In dieser Definition umfasst der Kasten gerade die mittleren 50 % der Daten.

An statistischen Methoden kamen für die Auswertung der Ergebnisse der Wilcoxon-Test und der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung.

3 Ergebnisse

3.1 Imker

3.1.1 Anamnestisch erhobene Daten

In einem ersten Schritt wurden die aus den Fragebögen entnommen anamnestischen Daten ausgewertet. Besonderes Interesse galt hierbei den nach einem Bienenstich auftretenden Reaktionen. Bei 12 Probanden zeigte sich eine Reaktion auf einen Bienenstich, die bei 3 Probanden durch eine gesteigerte Lokalreaktion und bei 9 Probanden durch eine allergische Reaktion gekennzeichnet war. Bei 5 Probanden waren diese allergischen Reaktionen durch kutane Symptome, bei 4 durch systemische Symptome gekennzeichnet. Eine Übersicht über die Häufigkeit der begleitenden allergischen Symptome nach einem Bienenstich gibt **Tabelle 10** wieder.

Begleitende Symptome	Anzahl der Probanden (n = 9)
Pruritus	4
Rötung gesamtes Integument	1
Quincke Ödem	2
Dyspnoe	1
Cephalgien	1
Kreislaufdysregulation	3

Tabelle 10: Häufigkeit begleitender allergischer Symptome nach einem Bienenstich (Mehrfachnennung möglich)

In einem nächsten Schritt wurde der Expositionszeitraum und somit die Anzahl der Jahre, in denen die Probanden einem erhöhten Risiko ausgesetzt waren von einer Biene gestochen zu werden, statistisch in Form eines Boxplots dargestellt. Der Expositionszeitraum betrug im Median $20,5 \pm 14,85$ Jahre (0 bis 54) (**Abbildung 11**).

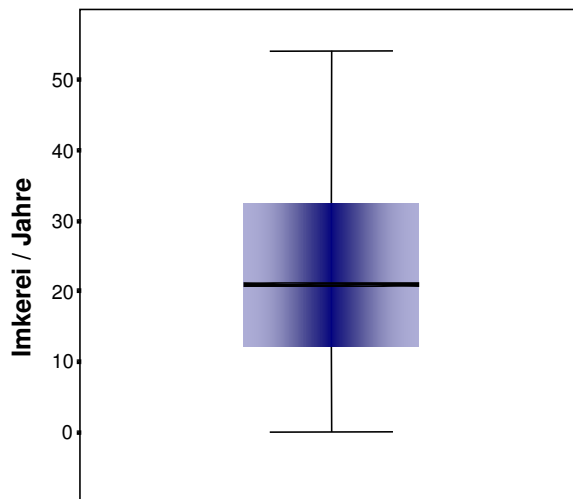


Abbildung 11: Anzahl der Jahre der Imkerei

Die mediane Anzahl der Bienenstiche in diesen Jahren betrug $22,5 \pm 182,469$ Stiche (0 bis 1000) (**Abbildung 12**).

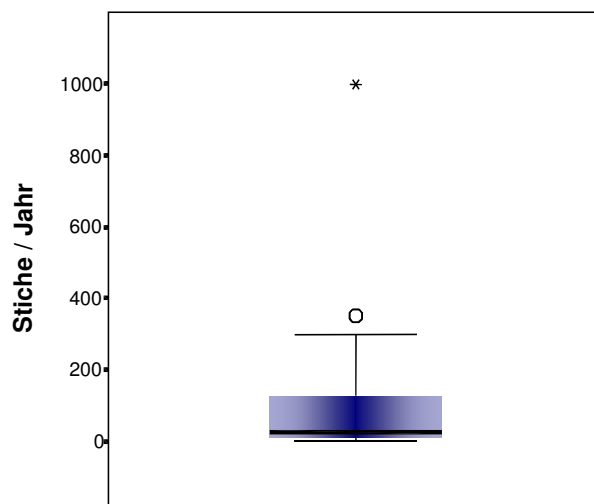


Abbildung 12: Anzahl der Stiche im Jahr

3.1.2 Vergleich der im Immunoblot erhobenen optischen Daten mit den semi-quantitativ-optisch erhobenen Daten

In einem ersten Schritt wurden die sIgE- und sIgG₄-Banden auf den Immunoblotstreifen rein optisch und ohne Kenntnis der klinischen Reaktion nach einem Stich hinsichtlich ihres Allergenbandenmusters miteinander verglichen. Hierzu wurden die Immunoblotstreifen manuell auf einem vorgefertigten Auswertungsbogen fixiert, wobei die Immunoblotstreifen des sIgE und des sIgG₄ eines Probanden einander gegenübergestellt wurden, um einen qualitativen Vergleich der Allergenbandenmuster zu vereinfachen (**Abbildung 13**). Anhand der optischen Beurteilung der Antikörpersignale im Immunoblot wurden „vollständige“ (sIgG₄ > sIgE) von „unvollständigen“ (sIgG₄ < sIgE) Bandenmustern unterschieden. Ein „unvollständiges“ Bandenmuster bestand bei einem isolierten Mangel an sIgG₄-Reaktivität bei mindestens einer Allergenbande. Dieses zeigte sich in der optischen Auswertung bei 8 Probanden.

In einem weiteren Schritt wurden die Immunoblotstreifen densitometrisch mittels Scanner und Software der Firma Biosoft semiquantitativ ausgewertet, um eventuell bestehende Unterschiede zur optischen Auswertung herauszuarbeiten. Hierbei wurde für jeden Patienten in einem Schaubild die Bandenintensität als Funktion der Lage der Banden auf dem Immunoblotstreifen durch das Programm aufgetragen. Entsprechend der Konzentration der gebundenen Antikörper ergaben sich unterschiedlich breite und hohe Peaks, deren Höhe sowie Flächeninhalt (Integral) mittels des Computerprogramms Quantiscan ermittelt wurden. In der semiquantitativen Analyse zeigte sich ebenfalls bei 8 Probanden ein „unvollständiges“ Bandenmuster. Somit erbrachte der Vergleich der beiden Auswertungsmöglichkeiten keine Unterschiede und infolgedessen keinen weiteren Vorteil in den darauffolgenden Analysen. Auf eine weitere Unterscheidung der Auswertungsmöglichkeiten bezüglich des Bandenmusters (vollständig/ unvollständig) wurde daher verzichtet.



Abbildung 13: Auswertungsbogen der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland

Von den 39 Probanden wurden anhand des Western-Blot-Reaktionsmusters für sIgE und sIgG₄ 8 Patienten als „nicht-geschützt“ (unvollständiges Bandenmuster) und 30 als „geschützt“ (vollständiges Bandenmuster) prognostiziert. **Abbildung 14** und **Abbildung 15** zeigen Schaubilder der Bandenmuster für die als „nicht-geschützt“ und „geschützt“ prognostizierten Probanden.

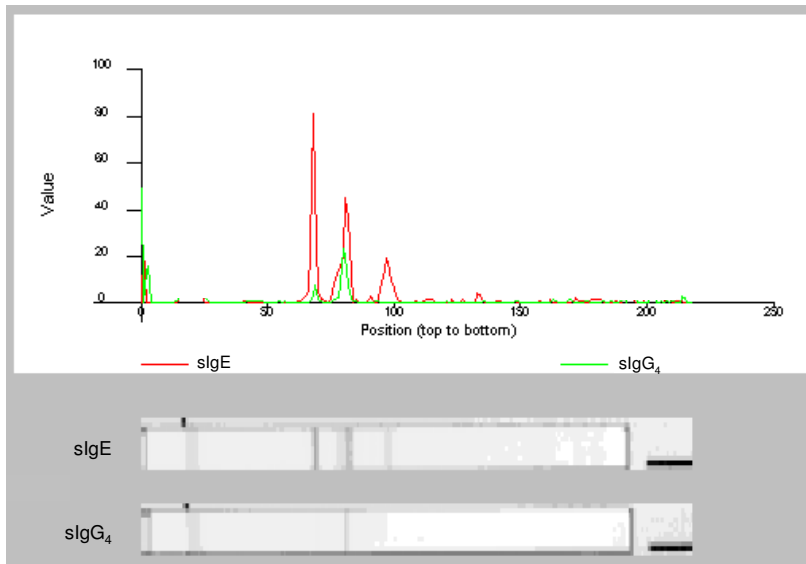


Abbildung 14: $sIgG_4 < sIgE$ = unvollständiges Bandenmuster = „nicht-geschützt“

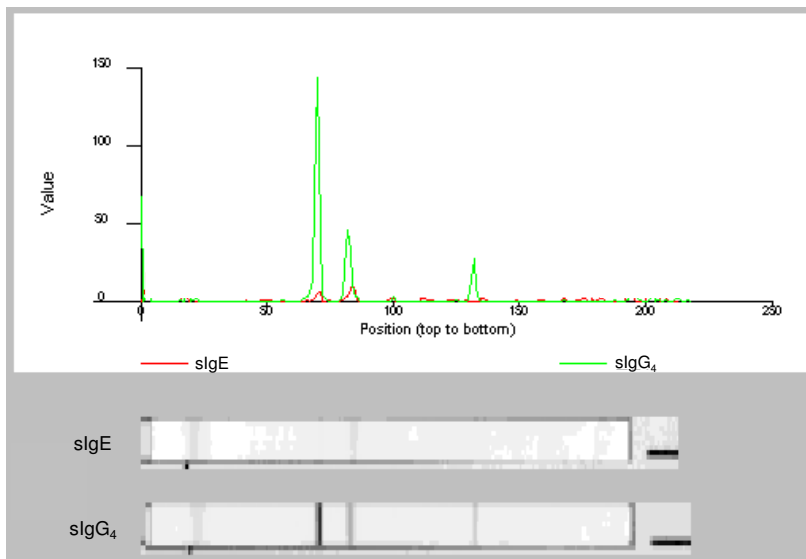


Abbildung 15: $sIgG_4 > sIgE$ = vollständiges Bandenmuster = „geschützt“

Von den 8 als „nicht-geschützt“ prognostizierten Probanden reagierten nur 4 Probanden mit einer allergischen Reaktion auf einen Stich. Von den 31 als „geschützt“ prognostizierten Probanden reagierten immerhin 5 Probanden auf einen Bienenstich mit einer allergischen Reaktion. Somit ergab sich in der Gruppe A für die Vorhersage einer allergischen Allgemeinreaktion nach einem Stich mit Hilfe des Western Blots eine Sensitivität von 44 % bei einer Spezifität von 87 %. Umgekehrt betragen Sensitivität und Spezifität für die Vorhersage eines immunologischen Schutzes 87 % bzw. 44 % (**Tabelle 11**).

	Reactors	Non-Reactors	
slgG₄ < slgE	4	4	8
slgG₄ > slgE	5	26	31
	9	30	

Tabelle 11: Verteilung Reactors/ Non-Reactors/ vollständiges-/ unvollständiges Bandenmuster

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Hierbei zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Immunoblotuntersuchungen und dem Reaktionsverhalten nach einem Bienenstich ($p = 0,169$). Ein vollständiges Bandenmuster zeigte sich somit nicht als prognostisches Kriterium für einen eingetretenen Schutz gegen eine allergische Reaktion auf einen Bienenstich.

Um verifizieren zu können, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem prognostischen Aussagewert der Immunoblotuntersuchungen und den Untergruppen der allergischen Reaktionen besteht, wurden in einem nächsten Schritt die kutanen getrennt von den systemischen Symptomen betrachtet. **Tabelle 12** und **Tabelle 13** geben eine Übersicht über das Vorhandensein von kutanen- sowie systemischen Symptomen bei „nicht-geschützt“ und „geschützt“ prognostizierten Probanden.

	Kutane Symptome	Keine kutanen Symptome	
slgG₄ < slgE	3	1	4
slgG₄ > slgE	2	3	5
	5	4	

Tabelle 12: Vergleich kutane Symptome/ vollständiges-/ unvollständiges Bandenmuster

	Systemische Symptome	Keine systemischen Symptome	
$\text{slgG}_4 < \text{slgE}$	1	3	4
$\text{slgG}_4 > \text{slgE}$	3	2	5
	4	5	

Tabelle 13: Vergleich systemische Symptome/ vollständiges-/ unvollständiges Bandenmuster

Von den vier als „nicht-geschützt“ prognostizierten Probanden reagierten drei Probanden mit einer kutanen Reaktion und nur ein Proband mit einer systemischen Reaktion auf einen Bienenstich. Von den fünf als „geschützt“ prognostizierten Probanden reagierten zwei mit einer kutanen und drei mit einer systemischen Reaktion auf einen Bienenstich. Somit ergab sich für die Vorhersage einer kutanen Reaktion nach einem Bienenstich mit Hilfe des Western Blots eine Sensitivität von 60 % bei einer Spezifität von 75 %. Für die Vorhersage einer systemischen Reaktion konnte nach einem Stich eine Sensitivität von 25 % bei einer Spezifität von 40 % verzeichnet werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Immunoblotuntersuchungen und dem gehäuften Auftreten oder der erhöhten Exposition gegenüber Bienenstichen bestand. Hierzu wurden die durchschnittliche Anzahl der Stiche im Jahr sowie der Expositionszeitraum, in dem die Probanden einem erhöhtem Risiko ausgesetzt waren von einer Biene gestochen zu werden, mit den Ergebnissen der Immunoblotuntersuchungen verglichen. Es zeigte sich, dass mit steigender Anzahl der Jahre der Exposition gegenüber Bienenstichen sowie mit steigender Anzahl der durchschnittlichen Bienenstiche im Jahr die Wahrscheinlichkeit eines prognostizierten Schutzes signifikant stieg (Anzahl der Jahre der Imkerei $p = 0,015$; durchschnittlichen Anzahl der Stiche im Jahr $p = 0,002$) (**Abbildung 16**).

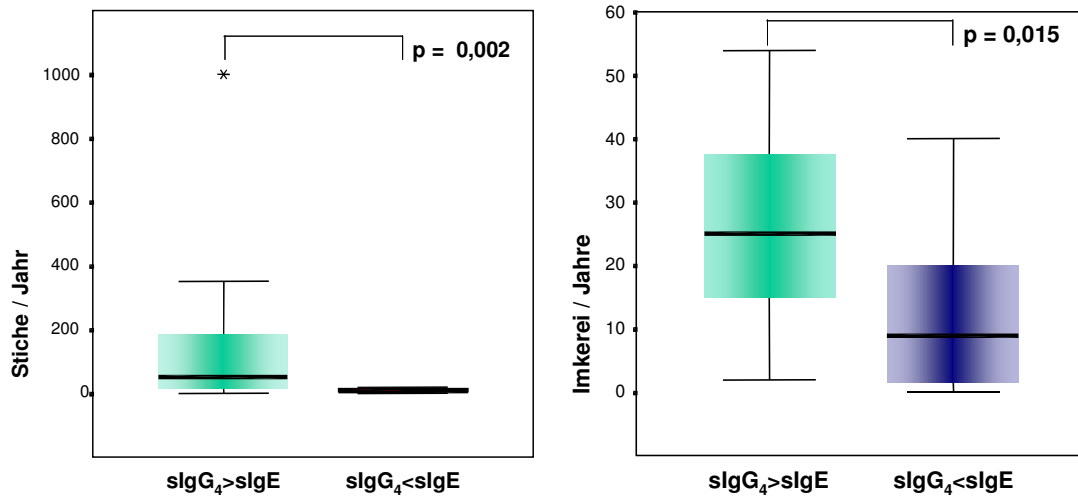


Abbildung 16: Vergleich durchschnittliche Anzahl der Stiche im Jahr / Anzahl der Jahre der Imkerei mit $slgG_4 > slgE$ („geschützt“) und $slgG_4 < slgE$ („nicht-geschützt“)

3.1.3 Vergleich Anamnese und Reaktionsverhalten nach Stichereignis

Um weitere Zusammenhänge zwischen der Anzahl der Stiche im Jahr, der Dauer der Exposition und dem tatsächlichen Reaktionsverhalten nach einem Bienenstich zu definieren, wurden diese Daten mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet. Sowohl für die Anzahl der Jahre der Imkerei als auch für die Anzahl der Stiche im Jahr zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich. Somit sinkt die Wahrscheinlichkeit einer systemischen Reaktion nach einem Stich mit der Länge des Zeitraums der Exposition und demzufolge auch mit der Anzahl der Stiche im Jahr (Imkerei/Jahre $p = 0,006$; Stiche/Jahr $p < 0,001$) (Abbildung 17).

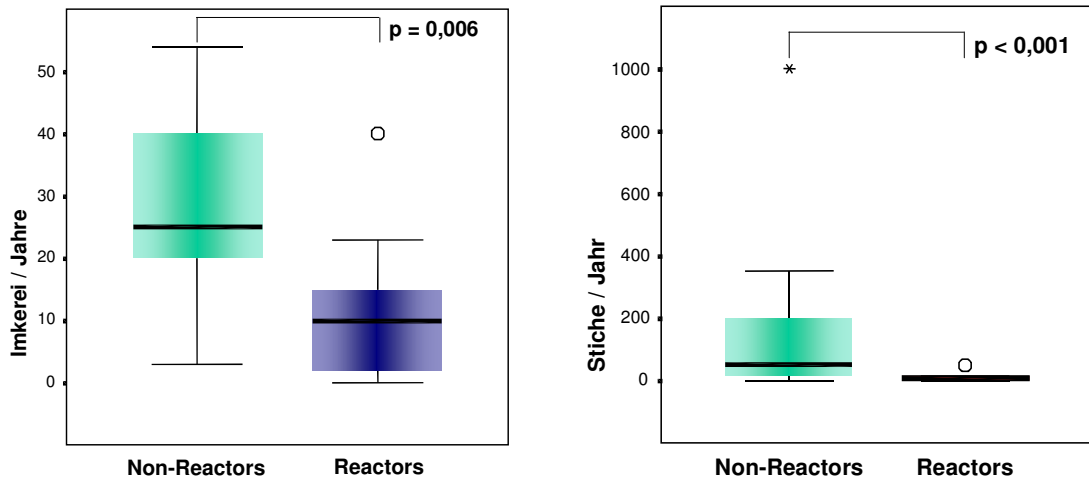


Abbildung 17: Zusammenhang Anzahl der Stiche im Jahr/ Anzahl der Jahre der Imkerei und dem Reaktionsverhalten nach einem Bienenstich

Betrachtet man die allergischen Reaktionen isoliert und vergleicht deren Untergruppen mit der Anzahl der Stiche im Jahr sowie der Länge der Expositionsdauer, so zeigt sich für das Kollektiv der Probanden mit rein kutanen Symptomen eine statistisch signifikant niedrigere Anzahl von Stichen im Jahr ($p = 0,003$). Für die Anzahl der Jahre der Imkerei und dem Auftreten rein kutaner Symptome lässt sich hingegen kein statistisch signifikanter Zusammenhang erkennen ($p = 0,139$) (Abbildung 18).

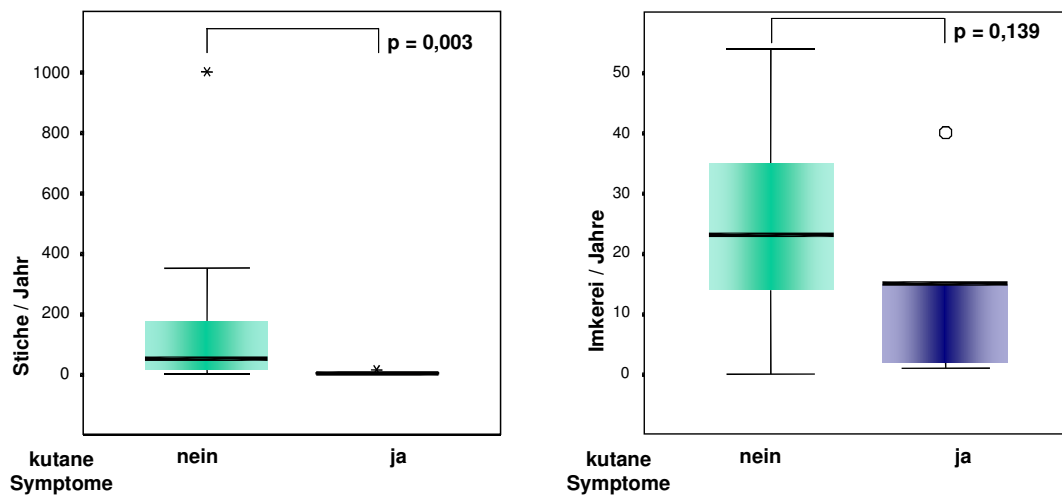


Abbildung 18: Zusammenhang kutane Symptome / Anzahl der Jahre der Imkerei, Anzahl der Stiche im Jahr

Für das Auftreten systemischer Reaktionen zeigt sich ein gegenteiliges Ergebnis. Hierbei ergibt sich mit steigender Dauer der Exposition gegenüber Bienenstichen eine geringere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von systemischen Symptomen ($p = 0,041$).

Zu der Anzahl der Stiche zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation, jedoch ließ sich auch hier eine deutliche Tendenz zu wenigeren Stichen bei Probanden, die systemisch reagierten, nachweisen ($p = 0,124$) (**Abbildung 19**).

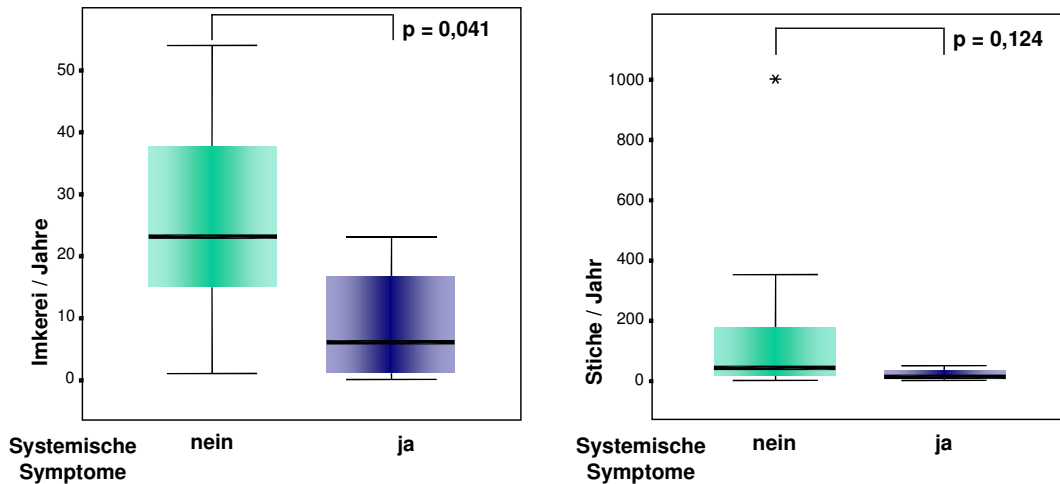


Abbildung 19: Zusammenhang systemische Symptome / Anzahl der Jahre der Imkerei, Anzahl der Stiche im Jahr

3.1.4 Vergleich semiquantitativ-optisch erhobener Daten des Immunoblots mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob zwischen dem Reaktionsverhalten nach einem Stich und den Ergebnissen der semiquantitativ-optisch erhobenen Daten der Immunoblotuntersuchungen Zusammenhänge identifiziert werden konnten. Hierzu wurden die für jeden Probanden in einem Schaubild ermittelten Werte für die Bandenintensität entsprechend der Konzentration der gebundenen Antikörper als Funktion der Lage der Banden auf dem Blotstreifen aufgetragen und hieraus der Peak mit dem größten Flächeninhalt (Integral) unter dieser Kurve in Flächeneinheiten (FE) sowie der Peak mit der größten Höhe ermittelt.

Der größte Peak für sIgE hatte bei 89,74 % eine weit größere Fläche sowie bei 92,3 % eine weit größere Höhe als alle anderen sIgE-Peaks zusammen, weshalb von einer Sensibilisierung gegen wenige oder nur ein Hauptallergen auszugehen war.

Bei den sIgG₄-Peaks ließ sich bei 61,53 % eine größere Fläche sowie bei 51,28 % eine größere Höhe als alle anderen Peaks zusammen nachweisen. Somit zeigte sich, dass

etwa die Hälfte der Probanden nur einen einzigen oder zwei sIgG₄-Peaks aufwiesen. Zum weiteren Vergleich der Ergebnisse des Westernblots mit der klinischen Reaktion nach einem Bienenstich wurde für den Nachweis von sIgE nur der jeweils größte sIgE-Peak der 39 Probanden herangezogen, da keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Darstellung aller Peaks oder nur des größten Peaks zu beobachten war. Ebenso ergaben sich für den Nachweis von sIgG₄ keine Unterschiede zwischen dem größten sowie höchsten Peak, so dass auch hier die Darstellung nur des größten Peaks herangezogen wurde.

Der Vergleich, dargestellt durch den Boxplot in **Abbildung 20**, erbrachte für den größten sIgE-Peak keinen signifikanten Unterschied des Medians zwischen der Gruppe der Non-Reactors und Reactors ($p = 0,366$). Beim größten-sIgG₄-Peak zeigte die statistische Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Reactors und Non-Reactors. Hiernach kam es in der Gruppe der Non-Reactors auch jeweils zum Auftreten größerer sIgG₄-Peaks ($p = 0,019$).

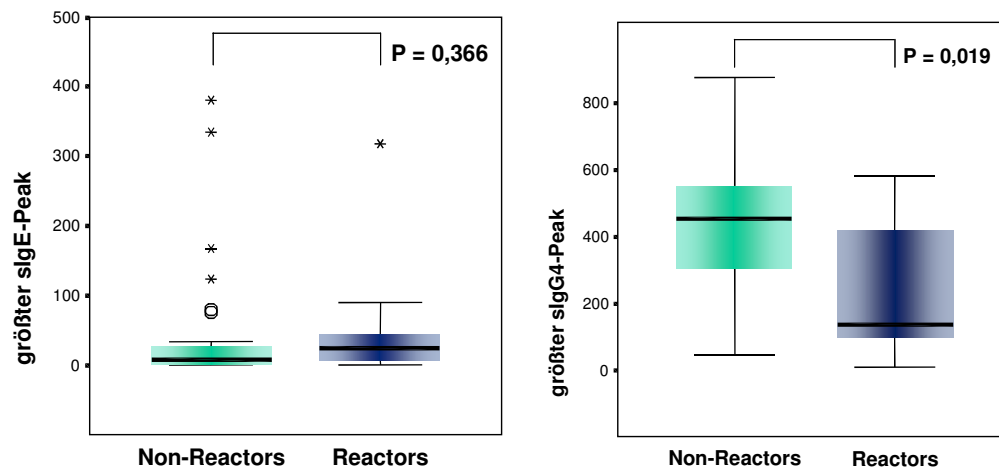


Abbildung 20: Vergleich der größten sIgE- und sIgG₄-Peaks mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich

In einem weiteren Schritt wurde die Gesamtheit aller sIgG₄-Peaks beurteilt, in dem der Flächeninhalt der Einzelpеaks addiert wurde. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test zeigte sich für das Reaktionsverhalten nach einem Stich eine signifikant größere Gesamtintensität der Banden für sIgG₄ bei Non-Reactors ausgedrückt in Gesamtgröße. Umgekehrt konnte festgestellt werden, dass die Reactors im Western-Blot eine niedrigere Gesamtintensität der sIgG₄-Banden aufwiesen. ($p = 0,002$) (**Abbildung 21**).

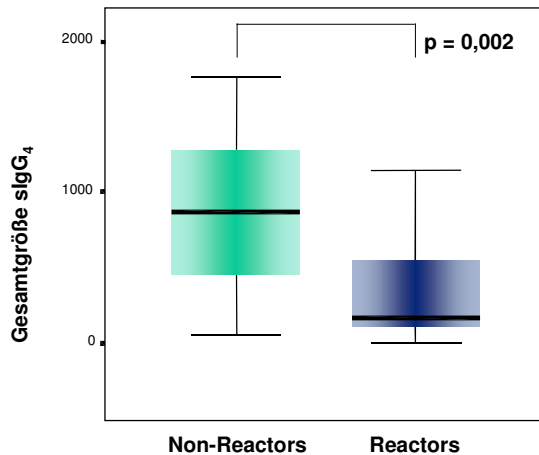


Abbildung 21: Vergleich Gesamtintensität der sIgG₄-Peaks in der Gruppe der Reactors/Non-Reactors

Wird nun die Anzahl der sIgE und sIgG₄ Banden betrachtet, so zeigt sich, dass bei den Imkern im Median $1 \pm 1,442$ (0 bis 5) sIgE- sowie $5 \pm 2,704$ (1 bis 10) sIgG₄-Peaks vorhanden waren. (**Abbildung 22**).

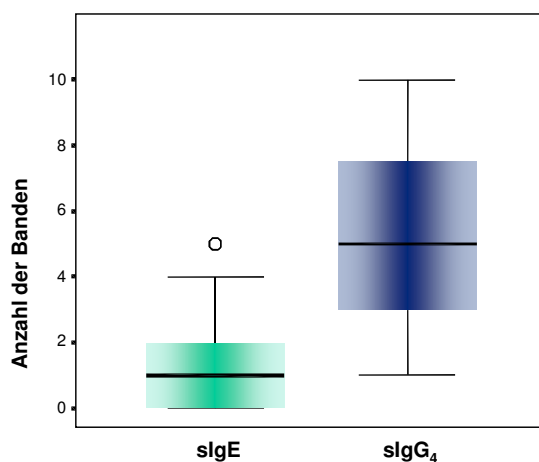


Abbildung 22: Anzahl der Banden für sIgE und sIgG₄

Weiterhin wurde untersucht, ob innerhalb der Gruppe der Reactors/Non-Reactors Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der Banden für sIgG₄ bzw. sIgE herausgearbeitet werden konnten. Hierbei ergab sich in der Gruppe der Non-Reactors ein signifikant gehäufteres Vorkommen von sIgG₄ Banden, wohingegen sich für die Anzahl der sIgE Banden kein signifikanter Unterschied des Medians zwischen der Gruppe der Reactors und Non-Reactors zeigte. (Anzahl sIgE-Banden während IT $p = 0,384$; Anzahl sIgG₄-Banden während IT $p = 0,003$) (**Abbildung 23**).

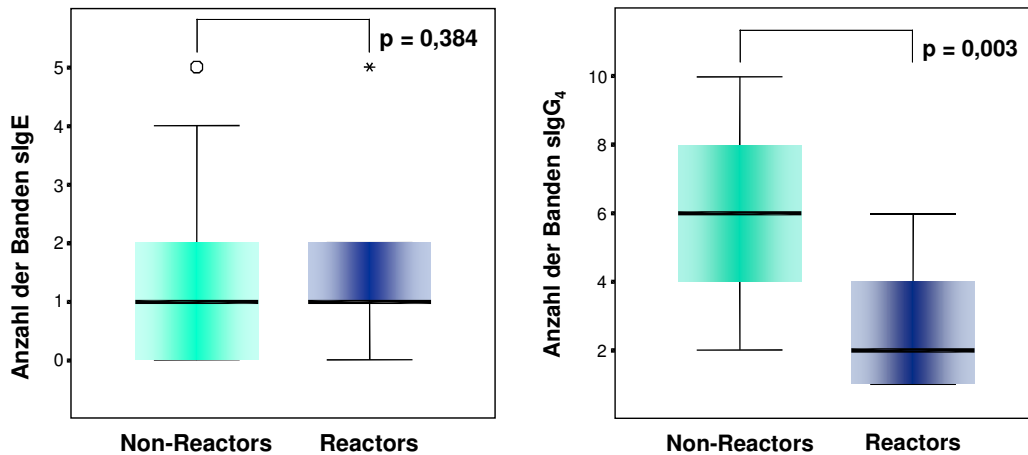


Abbildung 23: Anzahl der sIgE und sIgG₄ Banden in der Gruppe der Reactors/ Non-Reactors

3.1.5 Vergleich der Ergebnisse im CAP-FEIA mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich

Vergleicht man die mit dem CAP-System bestimmten Werte für Gesamt- und spezifisches- IgE mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich, so kann ein statistisch signifikant höherer Spiegel an sIgE bei Probanden, die auf einen Stich mit einer allergischen Reaktion reagiert hatten, nachgewiesen werden. Für die Höhe des Gesamt-IgE Spiegels zeigte sich kein Zusammenhang zu dem Auftreten einer systemischen Reaktion nach einem Stich (sIgE $p = 0,015$; Gesamt IgE $p = 0,44$) (Abbildung 24).

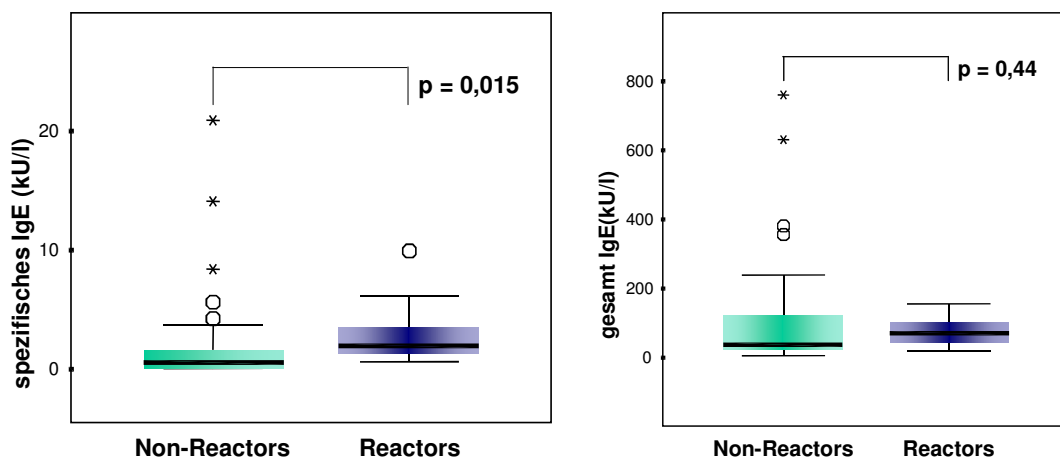


Abbildung 24: Vergleich Gesamt- und sIgE-Spiegel bei Reactors/ Non-Reactors

3.1.6 Vergleich Ergebnisse des Immunoblots und des CAP-FEIA mit den Untergruppen der allergischen Reaktionen

Weiterhin wurden die im CAP-FEIA gemessenen Konzentrationen von Hymenoptergift-sIgE bzw. Gesamt-IgE sowie der im Immunoblot ermittelte größte sIgE- bzw. sIgG₄-Peak und die Gesamtgröße der sIgG₄-Peaks gegen die unterschiedlichen allergischen Reaktionen nach einem Stich untersucht. Für das Auftreten von kutanen Symptomen konnten statistisch signifikant höhere Spiegel an sIgE ($p = 0,019$) sowie eine verminderte Intensität der Banden für sIgG₄ ausgedrückt in Gesamtgröße ($p = 0,014$), verzeichnet werden. Keine Zusammenhänge konnten zu der Höhe des Gesamt IgE-Spiegels sowie der größten sIgE- und sIgG₄-Peaks definiert werden (sIgE $p = 0,378$; größter sIgE-Peak $p = 0,424$; größter sIgG₄-Peak $p = 0,085$). Bei den systemischen Symptomen konnten keine Signifikanzen evaluiert werden. (Gesamt-IgE $p = 0,947$; sIgE $p = 0,460$; Gesamtgröße sIgG₄ $p = 0,139$; größter sIgE-Peak $p = 0,738$; größter sIgG₄-Peak $p = 0,217$). Aufgrund der niedrigen Fallzahlen in den Kollektiven sind die Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig.

3.1.7 Vergleich atopische Diathese mit Reaktionsverhalten nach Stich, Gesamt- und spezifisches IgE

Ferner wurde nachgeprüft, ob ein Zusammenhang zwischen dem Reaktionsverhalten nach einem Stich und dem Vorhandensein einer atopischen Diathese bestand. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Reactors und Non-Reactors ($p = 0,588$).

Nur einer von acht Atopikern zeigte dabei eine systemische Reaktion auf einen Bienenstich. Somit ergibt sich für die Vorhersage einer systemischen Reaktion auf einen Bienenstich bei Atopikern eine Sensitivität von 11 % bei einer Spezifität von 77 % (Tabelle 14).

	Reactors	Non-Reactors	
Atopie	1	7	8
keine Atopie	8	23	31
	9	30	

Tabelle 14: Vergleich Reactors/ Non-Reactors/ Atopiker/ nicht Atopiker

Zusätzlich sollte eruiert werden, ob bei Atopikern ein signifikant höheres Gesamt- oder spezifisches-IgE nachzuweisen ist. Sowohl für das spezifische- als auch für das Gesamt-IgE zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zu der Existenz einer Atopie (IgE $p = 0,162$; sIgE $p = 0,505$). Es fällt jedoch in diesem Zusammenhang auf, dass bei Atopikern ein erhöhter Gesamt-IgE Spiegel zu verzeichnen ist (**Abbildung 25**).

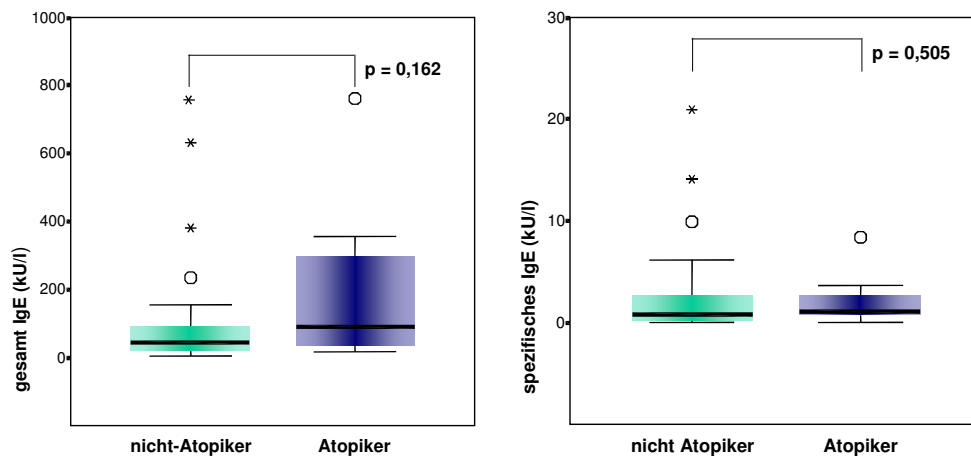


Abbildung 25: Zusammenhang Gesamt-, spezifisches-IgE / Atopie

3.1.8 Einzelallergenanalyse

Weiterhin wurde die Existenz von sIgE- und sIgG₄-Ak gegen die für die Bienengiftallergie entscheidenden Allergene, die Phospholipase A2 (19 kDA), die Hyaluronidase (45 kDA) und das Melitin (3 kDA), überprüft. Bei welchem Molekulargewicht und somit bei welchem Allergen der jeweils größte sowie höchste sIgE- bzw. sIgG₄-Peak im Immunoblot auftrat ist der **Abbildung 26** zu entnehmen.

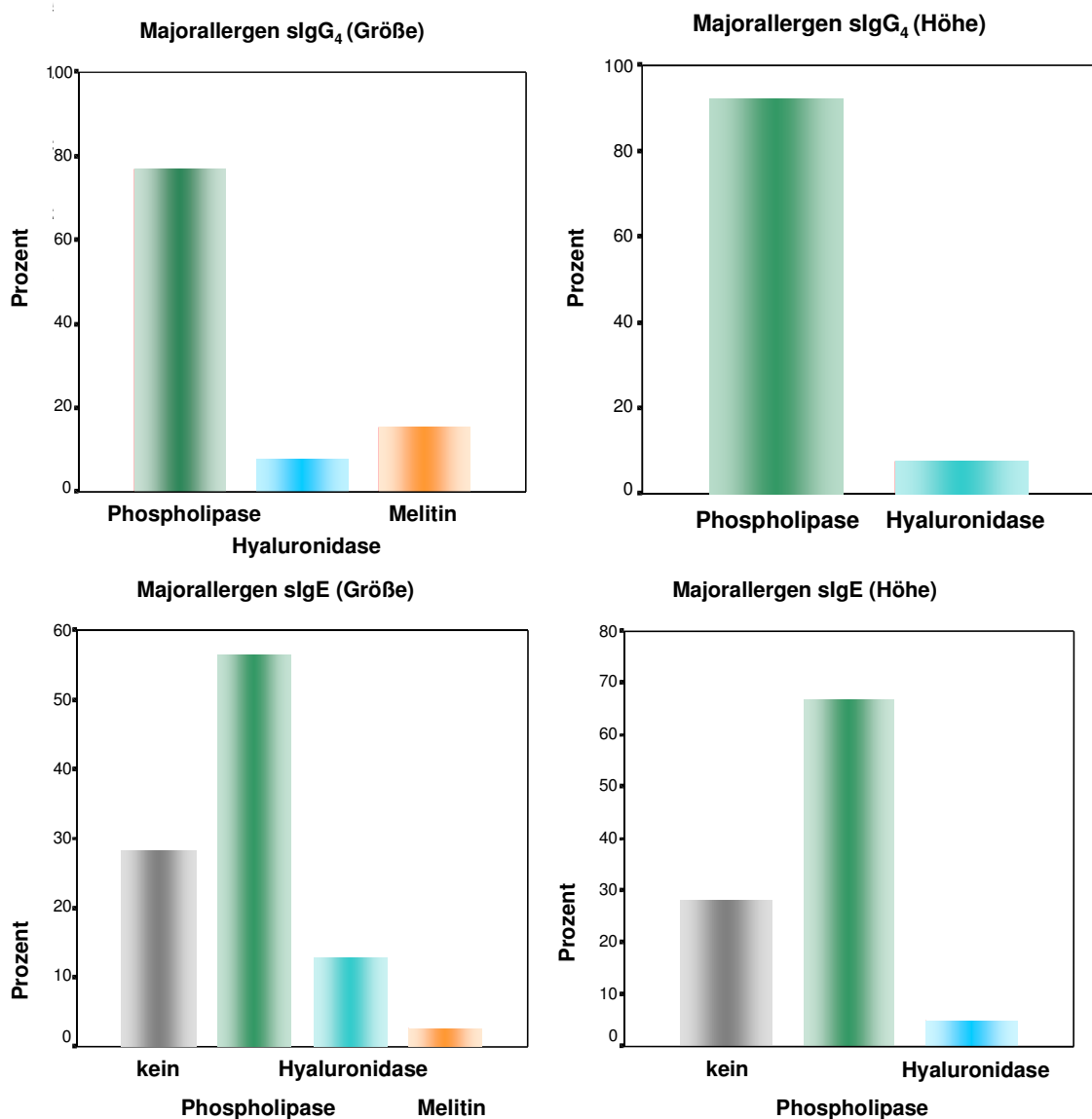


Abbildung 26: Majorallergene für sIgE und sIgG₄

Die stärkste Bande für sIgG₄ lag bei den Probanden am häufigsten zwischen 15 und 16 kDa, was der Phospholipase A2 entspricht, gefolgt von Hyaluronidase (41-44 kDa) für den höchsten Peak sowie Melitin (2-3 kDa) für den größten Peak. Die stärkste Bande für sIgE lag bei den Probanden ebenfalls am häufigsten zwischen 15 und 16 kDa, entsprechend der Phospholipase A2, gefolgt von der Hyaluronidase (41-44 kDa). Diese Reihenfolge ergab sich auch bei der Betrachtung der absoluten Häufigkeiten dieser Allergen-Antikörperbanden. So ließen sich bei 36 der 39 Probanden sIgG₄ gegen Phospholipase A2, bei 28 sIgG₄ gegen Hyaluronidase und bei 19 sIgG₄ gegen Melitin nachweisen. Bei der Untersuchung der sIgE-Allergenbanden zeigte sich eine ähnliche Verteilung wie beim sIgG₄ (**Abbildung 27** und **Tabelle 15**).

	sIgE	sIgG₄
Mellitin (3 kDa)	2	19
Phospholipase A2 (16 kDa)	23	36
Hyaluronidase (44 kDa)	7	28

Tabelle 15: Anzahl der sIgE und sIgG₄-Banden gegen die drei Hauptallergene Melitin, Phospholipase A2 und Hyaluronidase

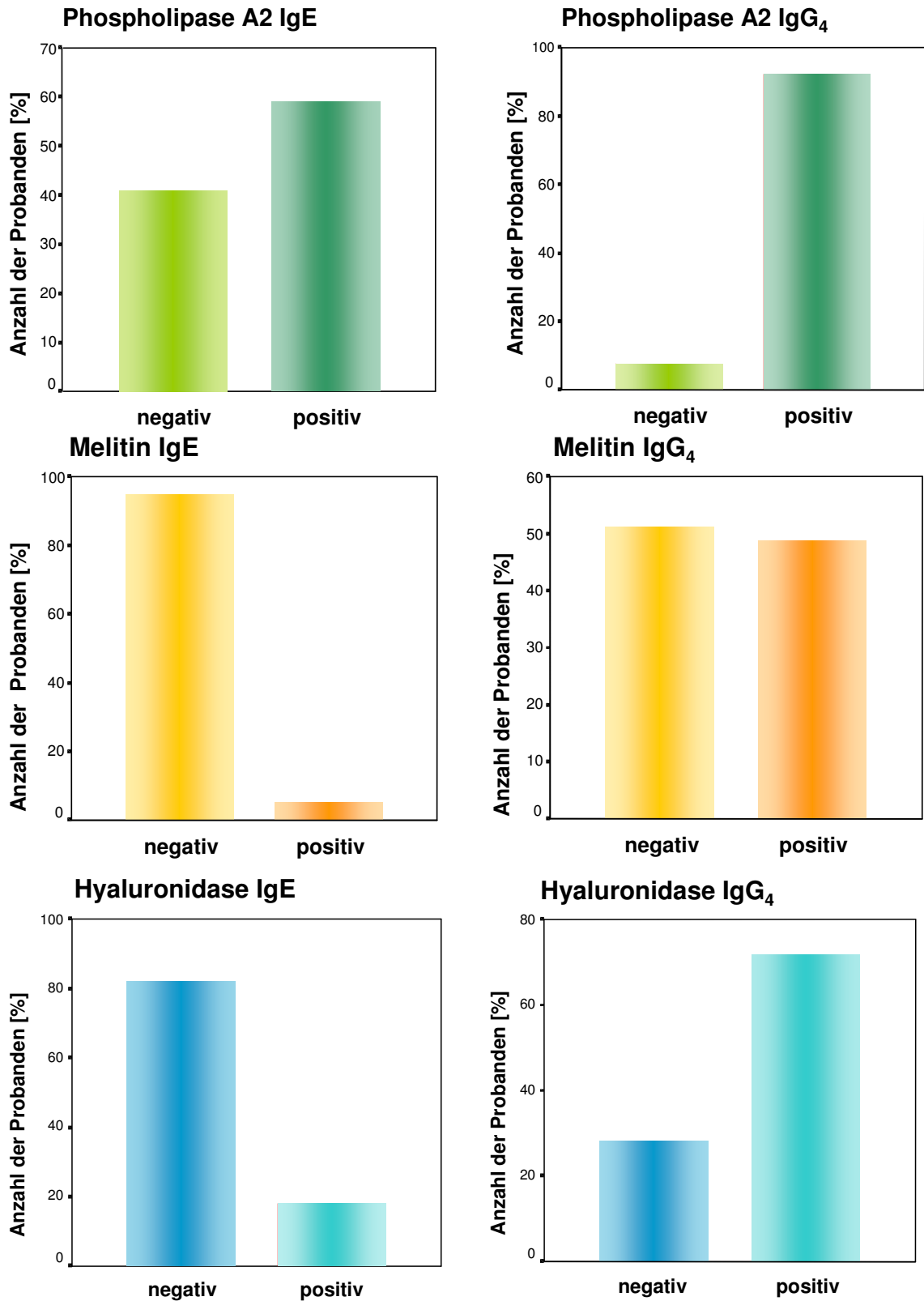


Abbildung 27: Anzahl der sIgE- und sIgG₄-Banden gegen Melitin, Phospholipase A2 und Hyaluronidase

3.2 Wespengifthyposensibilisierung (Kollektiv B)

Bei den Patienten der Gruppe B wurden von jedem Patienten jeweils zwei Seren untersucht. Ein Serum, das vor Beginn der spezifischen Immuntherapie gewonnen worden war, und ein zweites Serum, das vor der Stichprovokation nach ca. 1 Jahr entnommen wurde. Eine quantitative Bestimmung des Gesamt- und spezifischen-IgEs aus den Seren erfolgte mittels CAP System der Firma Pharmacia. Zur Bestimmung der sIgE- und sIgG₄-Reaktivität aus den Seren dienten Western Blot Streifen mit aufgetrenntem Wespengift der Firma DPC Biermann als Allergenträger. Die semiquantitative Auswertung der Western-Blot-Streifen erfolgte mit dem Computerprogramm QuantiScan. Hierbei wurde wie bei den Imkern für jeden Patienten in einem Schaubild die Bandenintensität entsprechend der Konzentration der gebundenen Antikörper als Funktion der Lage der Banden auf dem Blotstreifen aufgetragen. Der Nachweis von sIgG₄-Reaktivität gegenüber all jener Allergenbanden, die sIgE gebunden hatten, wurde als Hinweis auf eine eingetretene Schutzwirkung betrachtet. Zur weiteren statistischen Auswertung wurde der Peak mit dem größten Flächeninhalt (Integral) unter der Kurve sowie der Peak mit der größten Höhe ermittelt. Es zeigte sich, dass mehr als drei Viertel aller Patienten (77,78%) zu Beginn der IT nur einen einzigen oder 2 sIgE-Peaks aufwiesen. Der größte sowie der höchste Peak hatten meist eine weit größere Fläche/ Höhe als alle anderen Peaks zusammen, weshalb wie auch in der Gruppe der Imker von einer Sensibilisierung gegen nur wenige oder ein Hauptallergen auszugehen war. Noch ausgeprägter zeigte sich dieses für die sIgG₄-Reaktivität. Hier hatte bei 100% der Patienten der höchste Peak sowie bei 94,44% der größte Peak eine weit größere Fläche/ Höhe als alle anderen Peaks zusammengenommen.

Im Rahmen der Stichprovokation, welche im Mittel nach einem Jahr erfolgte, zeigte sich bei 3 Patienten weiterhin eine Reaktion auf einen Stich, die sich bei allen Patienten in einer Schwellung > 10 cm sowie weiterer allergischer Reaktionen äußerte, die in **Tabelle 16** aufgezeigt sind.

Reaktionen nach der Stichprovokation	Anzahl der Patienten (n = 3)
Tachykardie	2
Atembeklemmung	2
Hypertonie	1
Juckreiz	1

Tabelle 16: Reaktionen im Rahmen der Stichprovokation während IT (Mehrfachnennung möglich)

3.2.1 Vergleich der im Immunoblot erhobenen Daten mit der Anamnese

Zum Vergleich der Ergebnisse der klinischen Reaktion nach der Stichprovokation und dem Nachweis von sIgE und sIgG₄ im Westernblot wurde der jeweils größte sowie höchste sIgE- bzw. sIgG₄-Peak der 19 Patienten herangezogen, da keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Darstellung aller Peaks oder nur der größten bzw. höchsten Peaks zu beobachten war. Die statistische Analyse erbrachte keinen signifikanten Unterschied des Medians zwischen dem größten sowie höchsten sIgE- bzw. sIgG₄-Peak und der klinischen Reaktion im Rahmen der Stichprovokation (größter sIgE-Peak $p = 0,421$; höchster sIgE-Peak $p = 0,487$; größter sIgG₄-Peak $p = 1,0$; höchster sIgG₄-Peak $p = 0,487$).

In einem weiteren Schritt wurden die Allergenbandenmuster für sIgE und sIgG₄ vor der Stichprovokation betrachtet. Von insgesamt 19 hyposensibilisierten Patienten wurden anhand des Western-Blot-Reaktionsmusters für sIgE und sIgG₄ vor der Stichprovokation sechs Patienten als „nicht geschützt“ und 13 als „geschützt“ prognostiziert. Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit der klinischen Reaktion im Rahmen der Stichprovokation, so zeigten drei Patienten eine anaphylaktische Reaktion. Diese drei Patienten waren jedoch in der Gruppe der als „geschützt“ prognostizierten Patienten enthalten. Von den 13 als „geschützt“ prognostizierten Patienten zeigte sich hingegen bei drei Patienten eine anaphylaktische Reaktion auf die Stichprovokation. Somit ergibt sich für die Vorhersage einer anaphylaktischen Allgemeinreaktion bei einmaligem Stichereignis mit Hilfe des Western Blots eine Sensitivität von 0 % bei einer Spezifität von 63 %. Umgekehrt betragen Sensitivität und Spezifität für die Vorhersage eines immunologischen Schutzes bei einmaligem Stichereignis 63 % bzw. 0 % (**Tabelle 17**).

	Reactors	Non-Reactors	
$sIgG_4 < sIgE$	0	6	6
$sIgG_4 > sIgE$	3	10	13
	3	16	

Tabelle 17: Verteilung Reactors/ Non-Reactors mit vollständigem-/ unvollständigem Bandenmuster

Mittels des Mann-Whitney-U-Tests ergab sich für die als „nicht-geschützt“ prognostizierten Patienten ($sIgG_4 < sIgE$) kein statistisch signifikant häufigeres Auftreten von allergischen Reaktionen nach einem Stichereignis ($p = 0,36$).

Weiterhin zeigte sich, dass 13 Patienten vor Beginn der spezifischen Immuntherapie ein unvollständiges Bandenmuster ($sIgG_4 < sIgE$) aufwiesen und somit als „nicht-geschützt“ prognostiziert galten. In der Verlaufskontrolle nach einem Jahr reduzierte sich der Anteil der Patienten, der als „nicht-geschützt“ prognostiziert galt, auf sechs Patienten (**Abbildung 28**). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Test, wobei eine signifikante Änderung des Allergenbandenmusters für $sIgG_4$ und $sIgE$ vor und nach Hyposensibilisierungsbehandlung verzeichnet werden konnte ($p = 0,021$).

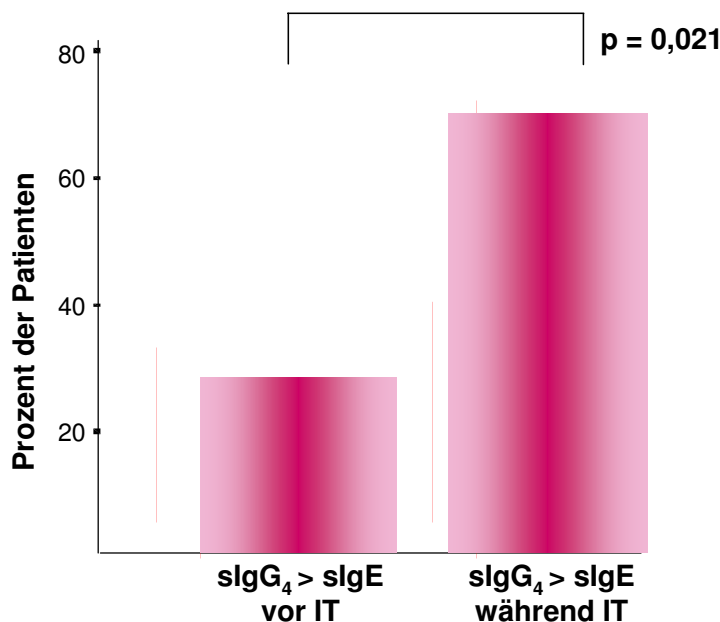


Abbildung 28: Prozentualer Anteil der Patienten mit vollständigem ($sIgG_4 > sIgE$) Bandenmuster vor und während IT

Betrachtet man die Anzahl der Banden für sIgG₄ bzw. sIgE innerhalb der Gruppe der Reactors/ Non-Reactors, so ergab sich kein signifikanter Unterschied des Medians zwischen der Gruppe der Reactors und Non-Reactors. Bei den Reactors liessen sich jedoch weniger sIgG₄- und sIgE-Banden nachweisen (Anzahl sIgE-Banden nach IT $p = 0,064$; Anzahl sIgG₄-Banden nach IT $p = 0,634$) (**Abbildung 29**).

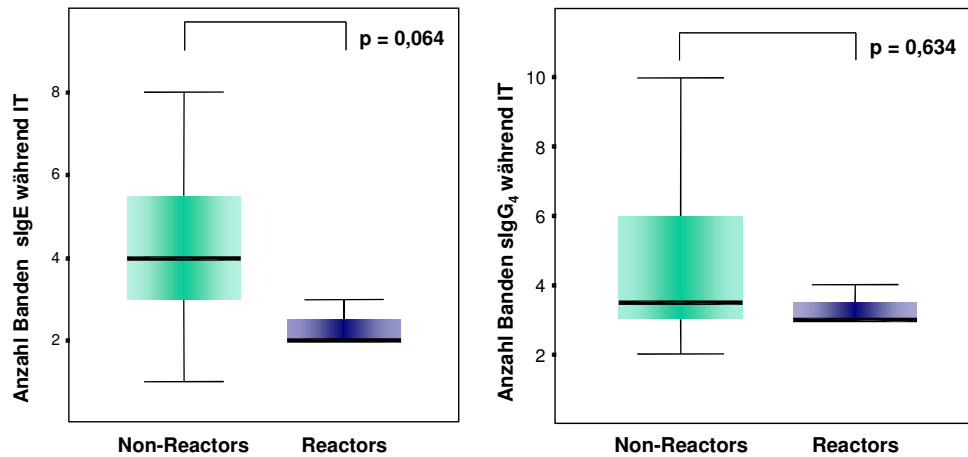


Abbildung 29: Anzahl der Banden für sIgE bzw. sIgG₄ während IT in der Gruppe der Reactors und Non-Reactors

3.2.2 Verlauf Allergenbandenmuster vor und während IT

Betrachtet man die Anzahl der Banden für sIgG₄ und sIgE im Verlauf der spezifischen Immuntherapie, so zeigt sich mit Hilfe des Wilcoxon-Test ein signifikanter Anstieg der Anzahl der sIgE sowie der sIgG₄ Banden während der IT (sIgG₄ $p < 0,001$; sIgE $p = 0,009$) (**Abbildung 30**).

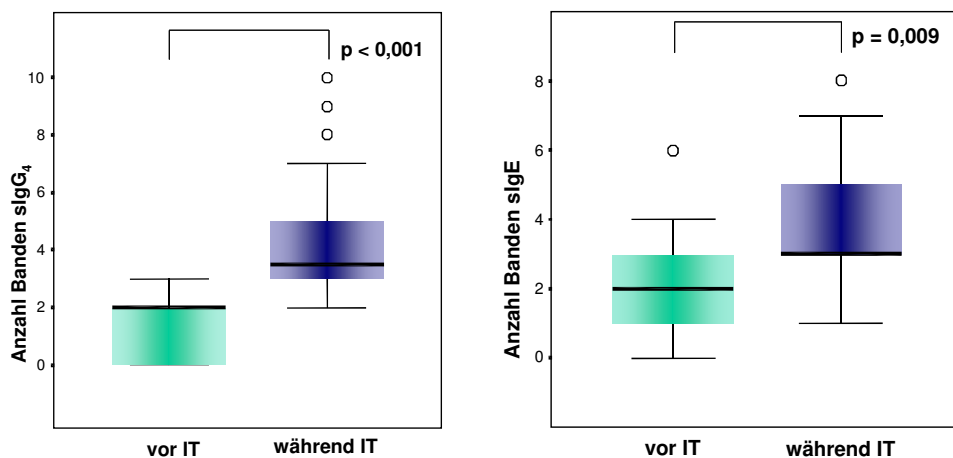


Abbildung 30: Anzahl der Banden für sIgE und sIgG₄ vor und während IT

Ebenso kam es im Laufe der Immuntherapie zu einer signifikanten Zunahme der größten und höchsten sIgE- bzw. sIgG₄-Peaks (größter sIgE-Peak $p = 0,001$; höchster sIgE-Peak $p = 0,001$; höchster sIgG₄-Peak $p < 0,001$; größter sIgG₄-Peak $p < 0,001$) (Abbildung 31).

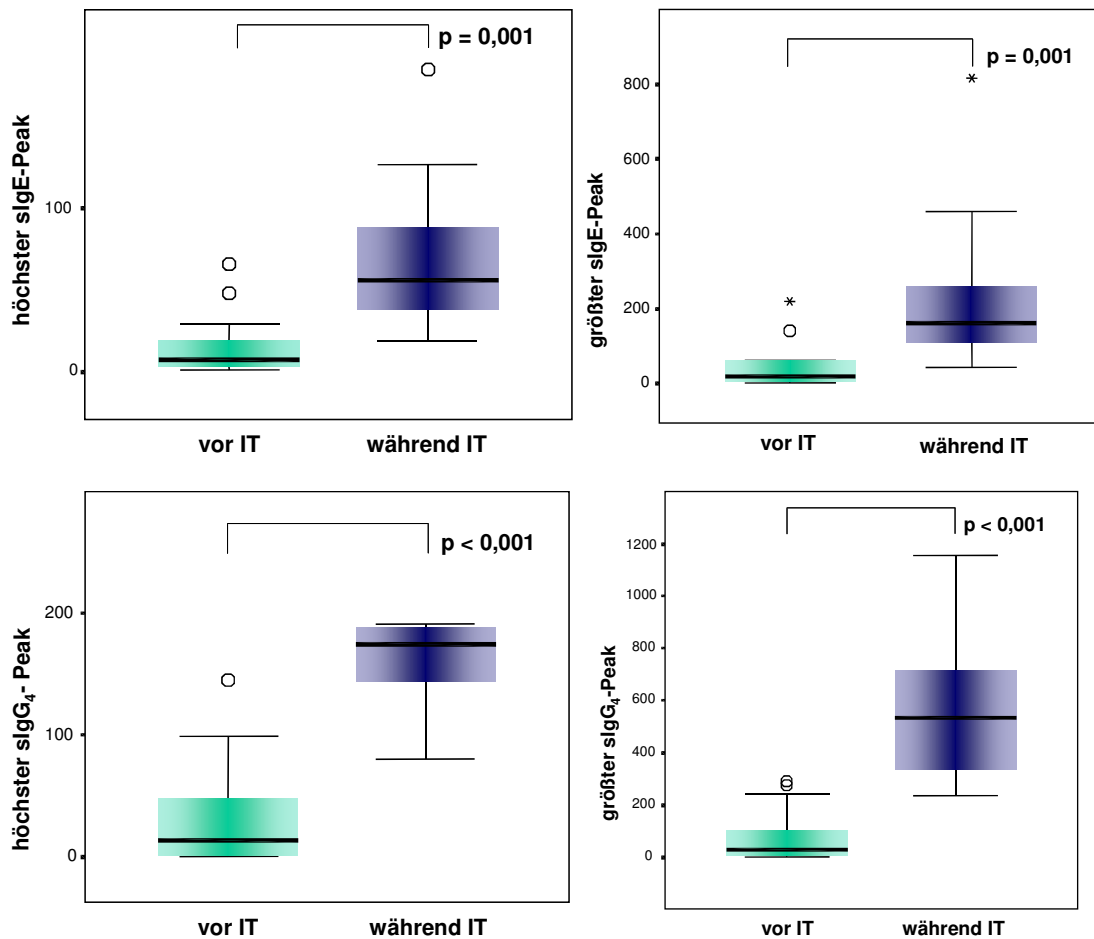


Abbildung 31: Größter/ höchster Peak für sIgE bzw. sIgG₄ vor und während IT

3.2.3 Vergleich der Ergebnisse des sIgE (CAP-Methode) und der klinischen Reaktion nach der Stichprovokation

Zusätzlich wurde ermittelt, ob zwischen der klinischen Reaktion nach der Stichprovokation und dem mittels Cap-System bestimmtem Gesamt- und spezifischen-IgE ein Zusammenhang besteht. Bei den Reactors konnten signifikant niedrigere Gesamt-IgE-Spiegel nachgewiesen werden ($p = 0,047$). Für das spezifische-IgE zeigte sich kein Unterschied zwischen Reactors und Non-Reactors ($p = 0,573$) (**Abbildung 32**).

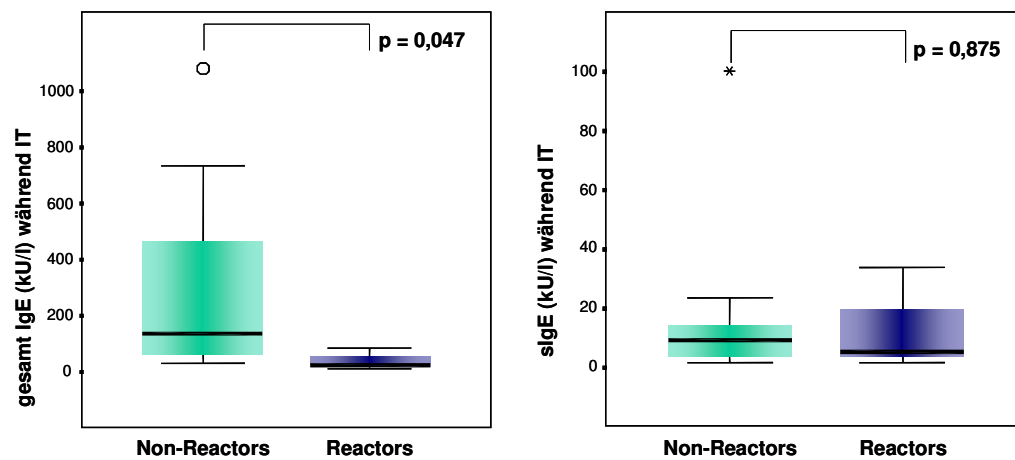


Abbildung 32: Vergleich Reactors, Non-Reactors, Gesamt- und spezifisches IgE

3.2.4 Gesamt- und spezifischer-IgE-Spiegel vor und während der IT

Zur Untersuchung des Verlaufs des Gesamt- und spezifischen-IgE-Spiegels vor und während der Hyposensibilisierung wurden die Werte mit Hilfe des Wilcoxon-Test statistisch ausgewertet. Für den Verlauf der Gesamt- und spezifischen-IgE Werte ergab sich keine signifikante Änderung während der Hyposensibilisierungsbehandlung (Gesamt-IgE $p = 0,396$; spezifisches-IgE $p = 0,573$) (**Abbildung 33**).

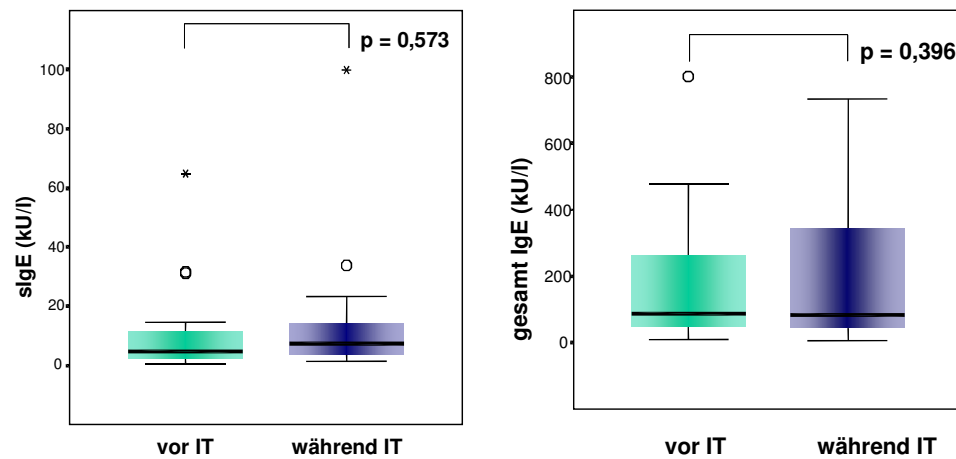


Abbildung 33: Gesamt- und spezifischer IgE-Spiegel vor und während der IT

3.2.5 Einzelallergenanalyse

Als Hauptallergene des Wespengifts konnten das Antigen 5 bei 23 kDa, die Phospholipase A1 bei 35 kDa und die Hyaluronidase bei 44 kDa identifiziert werden, da bei 17 der 18 Wespengiftallergiker bereits vor Beginn der spezifischen Immuntherapie gegen mindestens eines dieser Proteine sIgE-Antikörper im Serum mittels Immunoblot nachgewiesen werden konnten. Der größte- (55,6 %) sowie höchste- (66,7 %) Peak für sIgE lag bei den Wespengiftallergikern zwischen 23 und 25 kDa, was dem Antigen 5 entspricht, gefolgt von Phospholipase A1 (größter-Peak 33,3 %; höchster-Peak 27,8 %) und Hyaluronidase (größter-Peak 5,6 %; höchster-Peak 5,6 %). Diese Reihenfolge ergab sich auch bei der Betrachtung der absoluten Häufigkeiten der Allergen-Antikörperbanden, die in **Tabelle 18** aufgezeigt sind.

	sIgE	sIgG ₄
Antigen 5 (23 kDa)	14	11
Phospholipase A1 (35 kDa)	13	11
Hyaluronidase (44 kDa)	6	1

Tabelle 18: Anzahl der Patienten mit sIgE, und sIgG₄-Ak gegen Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase vor Beginn der Hyposensibilisierung

Bei der Untersuchung der sIgG₄-Allergenbanden lag der größte- (38,89%) sowie höchste- (44,44 %) Peak für sIgG₄ zwischen 23 und 25 kDa, was dem Antigen 5 entspricht, gefolgt von Phospholipase A1 (größter-Peak 38,89 %; höchster-Peak 33,3 %) Gegen die Hyaluronidase konnten vor Beginn der Hyposensibilisierungsbehandlung keine sIgG₄-Allergenbanden nachgewiesen werden. Bei vier von 19 Patienten zeigte sich zu Beginn der IT überhaupt keine sIgG₄-Allergenbande, bei einem Patienten zeigte sich keine sIgE-Allergenbande.

Bei 6 (7) Patienten lag der größte (höchste) sIgE und sIgG₄-Peak bei Allergenen des gleichen Molekulargewichts, bei 12 (11) lag der größte (höchste) Peak von sIgE und sIgG₄ bei unterschiedlichen Allergenen. Ein Jahr nach Beginn der IT erhöhte sich der Anteil der Patienten, deren größter (höchster) sIgE und sIgG₄-Peak bei Allergenen des gleichen Molekulargewichts lag, auf 10 (15) Patienten. Bei der Überprüfung, ob es im Verlauf der IT zu Verlagerungen der größten (höchsten) sIgE-Peaks hin zu bestimmten

Allergenen gab, zeigte sich bei 4 von 18 Patienten eine Änderung des größten sIgE-Peaks im Westernblot von Hyaluronidase, Phospholipase oder einem anderen Allergen zu Beginn auf Antigen 5 im Verlauf. Eine Änderung zu Gunsten der Hyaluronidase trat bei 6 (2) von 18 Patienten auf und eine Änderung zum Vorteil von Phospholipase bei 2 (0) Patienten. Bei 6 (13) der Patienten mit Wespengiftallergie befand sich der größte sIgE-Peak zum Zeitpunkt der Messung im Bereich des gleichen Molekulargewichts wie zu Beginn der IT (**Abbildung 34**).

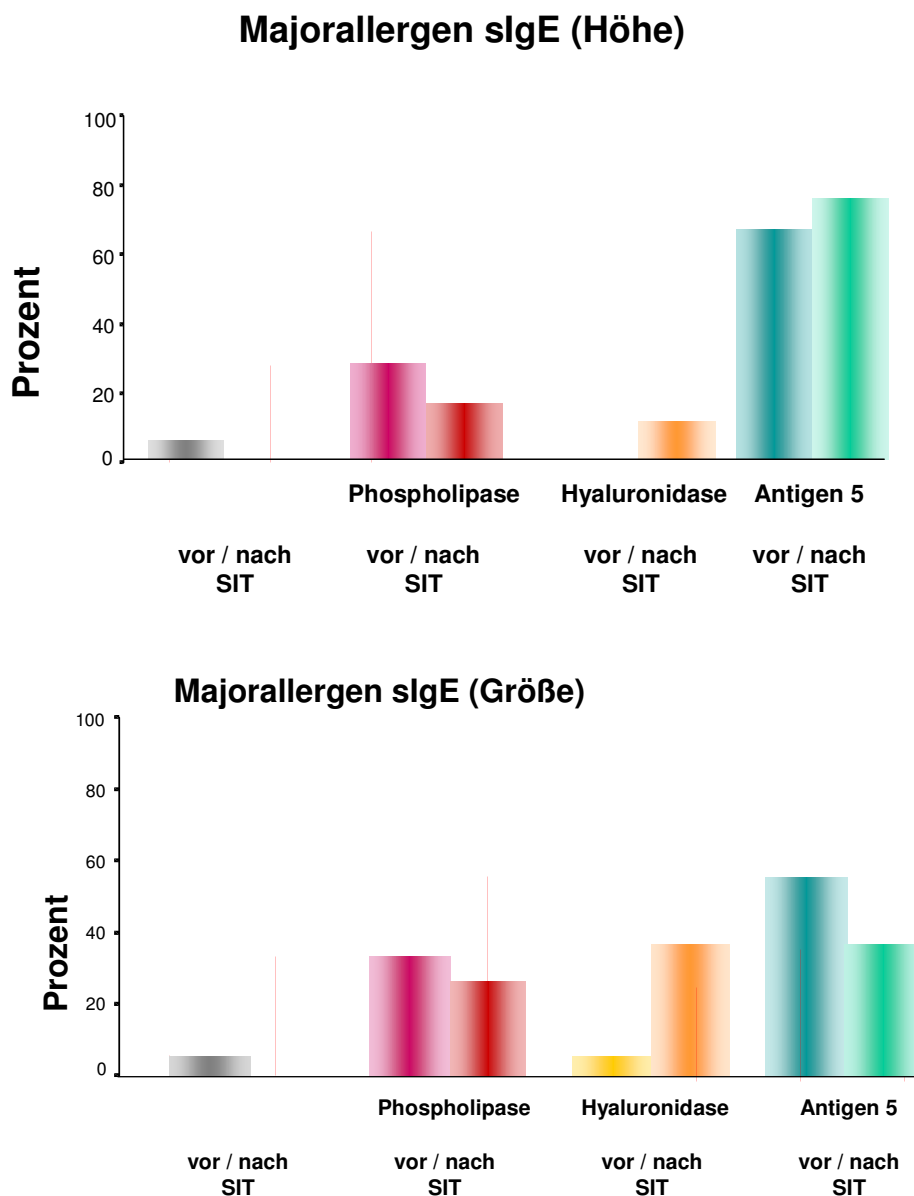


Abbildung 34: Änderung des Antikörperprofils während der IT bezüglich der höchsten sowie größten sIgE Peaks

Bei der Überprüfung der sIgG₄-Peaks zeigte sich bei 7 von 18 Patienten eine Änderung des größten (höchsten) sIgG₄-Peaks im Westernblot von Hyaluronidase, Phospholipase oder einem anderen Allergen zu Beginn auf Antigen 5 im Verlauf. Eine Änderung zugunsten der Hyaluronidase trat bei 2 (0) von 18 Patienten auf und eine Änderung auf Phospholipase bei 2 (1) Patienten. Bei 7 (7) der Patienten mit Wespengiftallergie befand sich der größte (höchste) sIgG₄-Peak zum Zeitpunkt der Messung im Bereich des gleichen Molekulargewichts wie zu Beginn der IT (**Abbildung 35**).

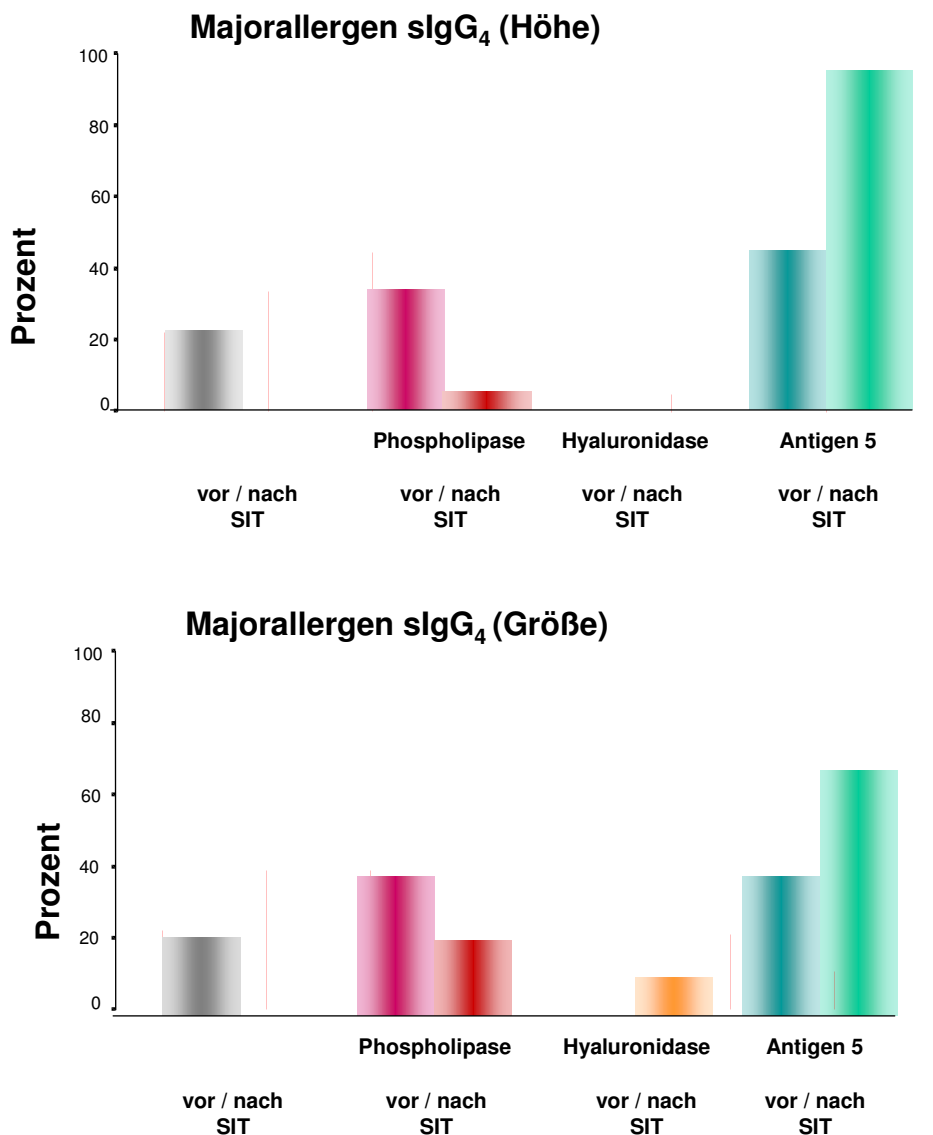


Abbildung 35: Änderung des Antikörperprofils während der IT bezüglich der höchsten sowie größten sIgG₄ Peaks

Beim Vergleich der Entwicklung des zu Beginn der IT größten (höchsten) sIgE-Peaks mit der Entwicklung der Summe der einzelnen Peaks während der IT nahm der zu Beginn der IT größte (höchste) Einzelpeak mehr Fläche (Höhe) ein als die Summe der übrigen zusammen. Im Laufe der IT kam es jedoch zu einem starken Anstieg der restlichen und dem Auftreten neuer Peaks.

In der statistischen Analyse, welche mittels des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt wurde, ergab sich im Laufe der Hyposensibilisierungsbehandlung ein signifikanter Anstieg der Existenz von sIgG₄-Ak gegen Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase (Antigen 5 $p = 0,008$; Phospholipase A1 $p = 0,008$; Hyaluronidase $p = 0,001$). Für die sIgE-Ak gegen Phospholipase A1 ließ sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg ($p = 0,025$) nachweisen. Für die sIgE-Ak gegen Hyaluronidase und Antigen 5 ließen sich keine signifikanten Anstiege verzeichnen, jedoch zeigte sich bei beiden ein tendenzieller Anstieg (Antigen 5 $p = 0,18$; Hyaluronidase $p = 0,058$) (**Abbildung 36** und **Abbildung 37**).

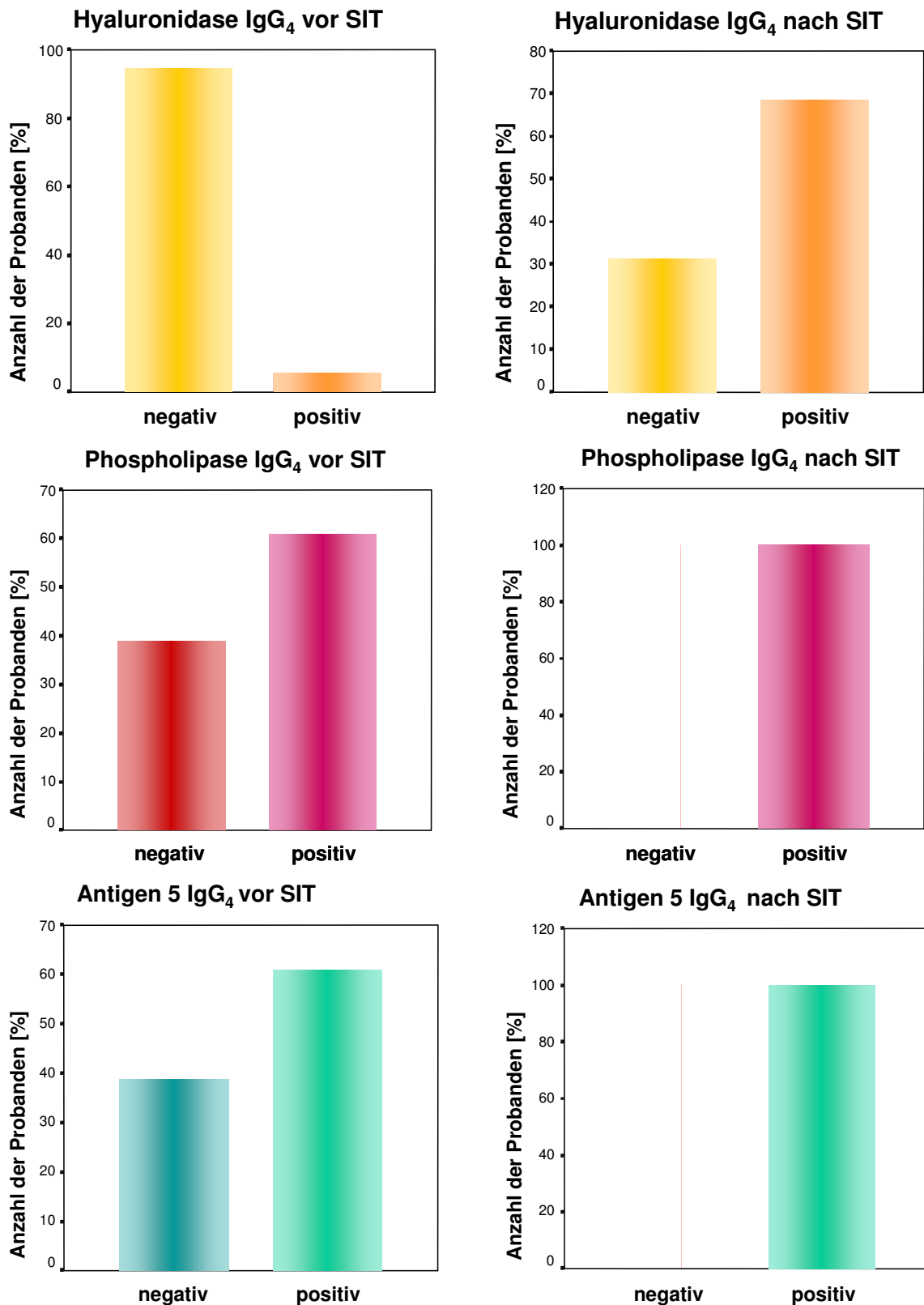


Abbildung 36: Vorhandensein von IgG₄-Ak gegen Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase im Verlauf der SIT

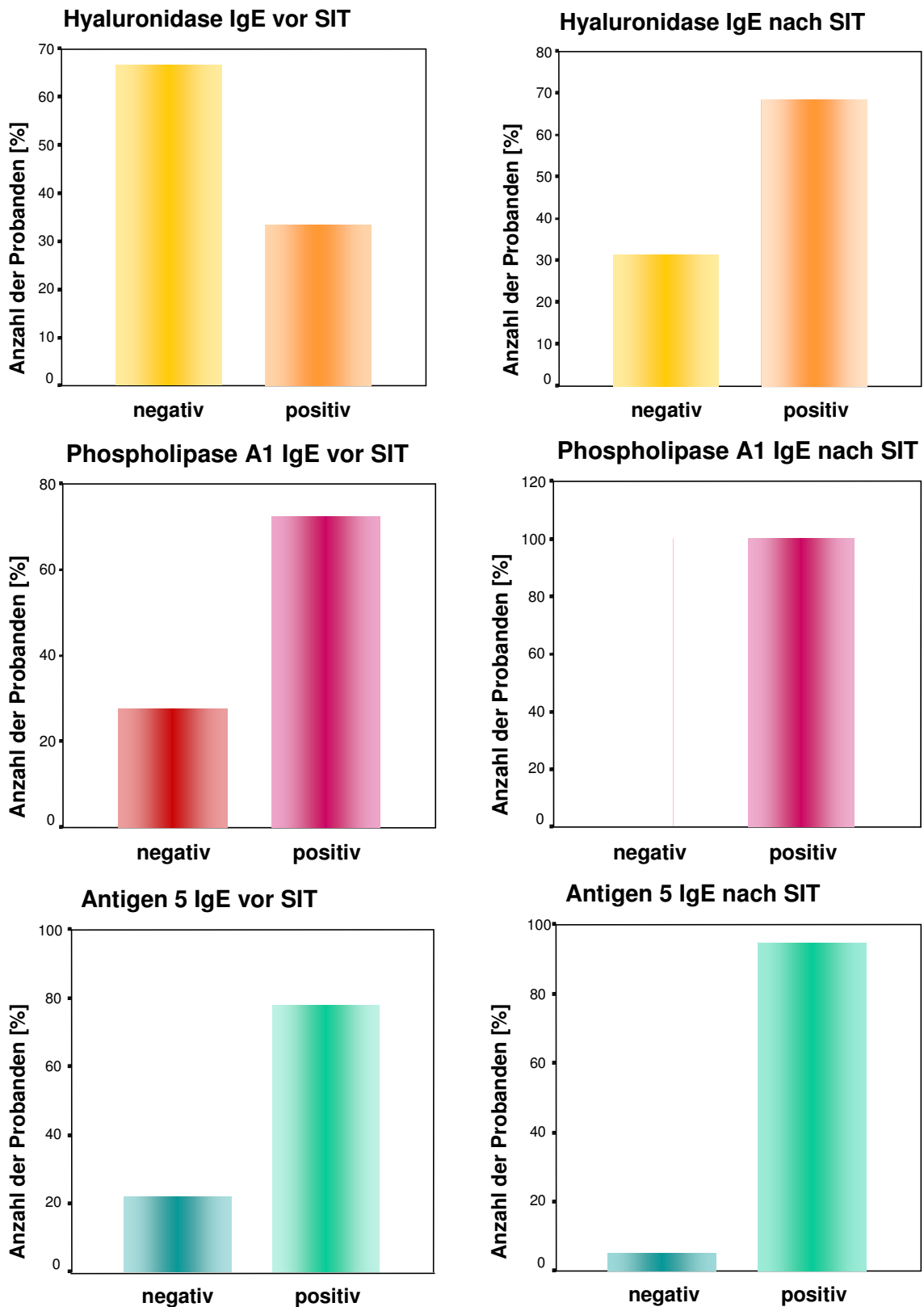


Abbildung 37: Vorhandensein von IgE-Ak gegen Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase im Verlauf der SIT

4 Diskussion

In der Literatur ist die Frage, welche Patienten durch die IT nicht ausreichend gut geschützt oder nicht geschützt sind und wie lange die Wirksamkeit nach Beendigung einer IT anhält, häufig Gegenstand von Diskussionen. Dabei stehen bis heute keine zuverlässigen Laborparameter zur Verfügung, die den Therapieerfolg einer Hyposensibilisierungsbehandlung vorhersagen können. Somit stehen Testverfahren, die eine Aussage diesbezüglich ermöglichen, im Mittelpunkt der Forschung. Der Immunoblot, der in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit im Hinblick auf seine prognostische Wertigkeit gewonnen hat, wurde in unserer Studie reevaluiert. Ziel unserer Studie war es, Änderungen im Muster der spezifischen Antikörper u.a. im Rahmen der Hyposensibilisierungsbehandlung zu erfassen, um damit eine weitere Grundlage in der Diagnostik und Hyposensibilisierungstherapie-Verlaufskontrolle zu finden. Weiterhin sollte ebenfalls herausgearbeitet werden, inwiefern die semiquantitativ-optische Analyse der Immunoblotstreifen mittels des Computerprogramms Quanti Scan weitere Vorteile gegenüber der rein optischen Analyse ergibt. Ebenso sollte überprüft werden, ob während der IT IgE-Antikörper gegen Proteine des Giftextrakts gebildet werden, die vor der Therapie noch nicht vorhanden waren.

4.1 Prognostische Wertigkeit des Immunoblots

Der Immunoblot stellt bislang die einzige Methode dar, mit dem eine semiquantitative Bestimmung der sIgE- und sIgG₄-Antikörper gegen Einzelallergene der Hymenoptergifte praktikabel ist. Es ist somit nicht nur eine Bestimmung der sIgE- bzw. sIgG₄-Spiegel im Patientenserum erzielbar, sondern der Immunoblot ermöglicht die Erstellung eines für jeden Patienten individuellen Allergenbandenmusters. Mit Hilfe der Software Quantiscan der Firma Biosoft (Cambridge, UK) ist sogar ein semiquantitativer Antikörpernachweis gegen die Einzelallergene möglich. Den Empfehlungen der Fachgesellschaft zufolge dient der Immunoblot derzeit als unterstützende Zusatzuntersuchung im Verlauf einer Immuntherapie (PRZYBILLA et al. 2004), da bereits nicht zuletzt in der Vergangenheit die hohe Sensitivität dieses Testverfahrens im Rahmen der Detektion von Allergen-sIgE und -sIgG₄ im Verlauf einer Immuntherapie nachgewiesen werden konnte (ZOLLNER et al. 2001, OLLERT et al. 2002, JEEP et al. 1996). Überdies wurde der

Immunoblot zuvor für die Vorhersage des Erfolges einer Hyposensibilisierungsbehandlung in einzelnen Studien evaluiert (OLLERT et al. 2002, JEEP et al. 1996). Ziel unserer Arbeit war es, anhand der Daten und Seren zweier Studienkollektive die prognostische Wertigkeit des Immunoblots für die Vorhersage des Erfolgs einer Hyposensibilisierungsbehandlung zu reevaluieren. Untersucht wurden zwei Studienkollektive. In dem Studienkollektiv A wurden Probanden getestet, die aufgrund beruflicher Exposition gehäuft von Bienen gestochen wurden. Hierzu zählten Imker und deren Familienangehörige. In das Studienkollektiv B wurden Patienten der Allergologie, der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten -Allgemeine Dermatologie und Venerologie- Münster mit nachgewiesener Hymenopteren Giftallergie einbezogen, die sich in einem Zeitraum von Februar 1996 bis Juli 2001 zur Einleitung einer spezifischen Immuntherapie sowie zur Stichprovokation vorstellten.

Zur Auswertung des Immunoblots wurden die Immunoblotstreifen optisch sowie semi-quantitativ-optisch mittels der Software Quantiscan ausgewertet. Hierbei wurde für jeden Immunoblotstreifen ein Schaubild erstellt, in dem die Bandenintensität entsprechend der Konzentration der gebundenen Antikörper als Funktion der Lage der Banden auf dem Immunoblotstreifen aufgetragen wurde. Bei der Auftragung der Blotstreifen von Hand kann es hierbei zu einigen Ungenauigkeiten kommen. Da die Auftrennung der Einzelallergene in der Elektrophorese mit exponentiell ansteigender Fließgeschwindigkeit erfolgt, sind die Ungenauigkeiten bei niedermolekularen Allergenen geringer als bei höhermolekularen. Um diese Ungenauigkeit zu minimieren und somit eine exaktere Bestimmung des Molekulargewichts zu ermöglichen, könnte der rosarote, unscharf begrenzte Startpunkt vom Hersteller durch eine dünne, Linie präzisiert werden.

Die für die Wespengiftallergie relevanten Allergene sind das Antigen 5 bei 23 kDa, die Phospholipase A1 bei 35 kDa und die Hyaluronidase bei 44 kDa. Somit besitzen die im Wespengift enthaltenen Enzyme mit relevanter Immunogenität allesamt ein mittleres Molekulargewicht und lassen sich mit Hilfe des Programms gut dem entsprechenden Molekulargewicht zuordnen. Die für die Bienengiftallergie bedeutenden Allergene, die Phospholipase A2 16 kDa, die Hyaluronidase 44 kDa und das Melitin 3 kDa, lassen sich ebenfalls mit Hilfe des Programms gut dem entsprechenden Molekulargewicht zuweisen. Peaks der spezifischen Bindung von Antikörpern mit Einzelallergenen eines

höheren Molekulargewichts, bei denen die Zuordnung aufgrund der exponentiellen Fließgeschwindigkeit bei der Auftrennung der Allergene in der Gelelektrophorese schwierig war, waren in beiden Gruppen weniger häufig zu beobachten und zeigten zumeist eine geringere Intensität als Peaks im mittleren kDA Bereich. Die in unserer Studie beobachtete hohe Immunogenität gegen die oben beschriebenen Majorallergene des Bienen- und Wespengifts bestätigt überdies die Resultate zahlreicher anderer Arbeiten (EDERY et al., 1978; HABERMANN, 1972; MATZKE & BOGDANOV, 1997; NAKAJIAMA, 1984; O'CONNOR & PECK, 1978; OLLERT, 1999; SHIPOLINI, 1984). Auch die höchsten und größten sIgG₄-Peaks fanden sich am häufigsten gegen die oben genannten Allergene.

Laut einer Arbeit von Ollert et al. aus dem Jahre 1999 gilt eine systemische Reaktion nach einem Stich dann als wahrscheinlich, wenn sich im Serum sIgE-Antikörper gegen ein bestimmtes Allergen finden, gegen das sich keine sIgG₄-Antikörper nachweisen lassen. Übertragen auf unsere Studie würde dies bedeuten, dass, je größer ein sIgE-Peak und je kleiner der sIgG₄-Peak gegen das betreffende Allergen ist, desto größer demzufolge der Überhang an sIgE-Antikörpern gegen das bestimmte Allergen und entsprechend höher das Risiko einer schweren Allgemeinreaktion nach einem Stich ist. In der vorliegenden Studie korrelierte in der Gruppe der Wespengiftallergiker weder die Anzahl der sIgE- noch der sIgG₄-Allergenbanden im Westernblot mit der Reaktion im Rahmen der Stichprovokation, wie es nach der Hypothese von Ollert et al. zu vermuten wäre. Demnach würde eine zunehmende Anzahl an sIgE-Allergenbanden die vollständige „Deckung“ durch sIgG₄-Allergenbanden zunehmend unwahrscheinlicher und damit eine schwere klinische Reaktion wahrscheinlicher werden lassen. In der Gruppe der Imker und deren Angehörigen konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der sIgG₄-Banden, nicht jedoch der Anzahl der sIgE-Banden und der Reaktion nach einem Stich konstatiert werden.

Jeep et al. konnten in einer Studie mit 20 Bienengiftallergikern zeigen, dass sich bei Patienten, die in der Stichprovokation ungeschützt waren, bei mindestens einer Allergenbande, bei der sie sIgE-Ak aufzeigten, keine sIgG₄-Ak nachweisen ließen. Bei geschützten Patienten ließen sich bei allen Banden, bei denen sie vor IT sIgE-Ak besaßen, auch sIgG₄-Ak nachweisen. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass sich

diejenigen Patienten als geschützt erwiesen, die gegen all jene Allergenbanden, die sIgE gebunden hatten, auch eine sIgG₄-Reaktivität aufzeigten. Überträgt man wiederum diese Beobachtung auf die vorliegende Studie, so zeigten 31 von 39 Probanden aus der Gruppe der Imker gegen alle sIgE-Antigenbanden auch gleichzeitig gleichstarke oder stärkere sIgG₄-Antigenbanden gegen dieselben Allergene. Fünf Probanden wiesen jedoch trotzdem eine systemische Reaktion nach einem Hymenopterenstich auf. Die Sensitivität für die Vorhersage einer anaphylaktischen Reaktion nach einem Insektenstich in der Gruppe der Imker liegt somit nur bei 44 %. Wesentlich ungünstiger fiel das Ergebnis bei den Patienten mit Wespengiftallergie aus. Hier konnte mit dem Western-Blot kein anaphylaktisches Ereignis in der Stichprovokation vorhergesagt werden. Die Vorhersage eines Schutzes unter Hyposensibilisierung mit Wespengift ist mit einer Spezifität von 63 % zwar höher, dies beruht jedoch lediglich darauf, dass nur wenige Patienten in der Stichprovokation reagiert hatten und der Großteil der Patienten bereits nach kurzer Zeit nach Einleitung der SIT geschützt waren. Somit gibt der Immunoblot in beiden Kollektiven aufgrund der schlechten Sensitivität sowie Spezifität keine valide prognostische Aussage bezüglich der zu erwartenden Reaktion nach einem Stich.

Mögliche Ursachen für falsch klassifizierte, positive Reaktionen im Rahmen eines Stichereignisses könnten Angstzustände und psychische Reaktionen seitens der Patienten sein, die allergische Reaktionen vortäuschen könnten. Eine weitere Fehlerquelle, wie sie bereits in der Vergangenheit von Freising et al. beschrieben wurde, könnte darin liegen, dass die Allergene denaturiert werden und Konformationsdeterminanten verlorengelangen, so dass sIgE- oder sIgG₄-Antikörper die korrespondierende Bindungsstelle nicht mehr vorfinden (FREISING et al. 2006). Zudem können technische Ursachen die Aussagekraft des Westernblots beeinflussen. Zu nennen seien hier die Standardisierung in der Beladung mit dem Allergengemisch, zum anderen die Wahl der Methode für die Blockierung von freien Proteinbindungsstellen auf der Blot-Membran sowie die Detektionsmethode für die gebundenen sIgG₄- beziehungsweise sIgE-Antikörper (OLLERT et al. 2002).

4.2 Vergleich der semiquantitativ-optischen Beurteilung gegenüber der rein optischen Beurteilung der Immunoblotstreifen

Um zu evaluieren, ob die semiquantitative Analyse der Immunoblotstreifen einen weiteren prognostischen Aussagewert bezüglich einer eingetretenen Schutzwirkung im Rahmen der Hymenopteren Giftallergie ermöglicht, wurden die Immunoblotstreifen mittels Scanner und Software der Firma Biosoft weiter ausgewertet. Beim Vergleich des jeweils höchsten-/ größten- sIgE- bzw. sIgG₄-Peaks sowie der Gesamthöhe/-größe der sIgE- bzw. sIgG₄-Peaks mit der Reaktion im Rahmen der Stichprovokation ließ sich in der Gruppe der Wespengiftallergiker kein signifikanter Unterschied des Medians zwischen der Gruppe der Non-Reactors und Reactors herausarbeiten. Es zeigte sich jedoch in der Gruppe der Reactors ein Vorkommen niedrigerer/ oder kleinerer sIgE- bzw. sIgG₄-Peaks. In der Gruppe der Imker konnten bei den Non-Reactors signifikant größere/ höhere sIgG₄-Peaks sowie eine größere Gesamtgröße/-höhe der sIgG₄-Peaks nachgewiesen werden.

4.3 Sensibilisierung gegen Allergene im Verlauf der Immuntherapie

Des Weiteren wurde in unserer Studie der Frage nachgegangen, ob während der Immuntherapie IgE-Antikörper gegen Proteine des Giftextraktes gebildet werden, die vor Beginn der Therapie noch nicht vorhanden waren und somit im Verlauf der Immuntherapie eine Sensibilisierung gegen bestimmte Allergene stattfindet. Betrachten wir unsere Majorallergene Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase unseres Studienkollektivs B, so zeigt sich, dass die Häufigkeit der Antikörperpeaks gegen alle drei Allergene tendenziell zunimmt. Im Verlauf der Hyposensibilisierung traten somit sIgE-Antikörper gegen Majorallergene auf, die zu Beginn nicht vorhanden waren. Bei 5 der 19 Patienten konnte mit Hilfe des Immunoblots festgestellt werden, dass unter der Hyposensibilisierung spezifische IgE-Antikörper gegen einzelne Wespengiftallergene neu auftraten. Für die Phospholipase war dieser Anstieg sogar signifikant ($p=0,025$). Es ist daher anzunehmen, dass es erst durch die regelmäßige Injektion des Wespengifts im Rahmen der IT zu einer Sensibilisierung gekommen ist. Für die Zukunft bleibt zu diskutieren, ob durch eine Therapie nur mit genau den Allergenen, gegen die der Patient eine Sensibilisierung im Westernblot aufweist, nicht eine solche zusätzliche Sensibilisierung vermie-

den werden könnte. Sobald alle relevanten Allergene eines Extrakts in rekombinanter Form verfügbar sind, kann mittels Westernblots das genaue Sensibilisierungsprofil jedes einzelnen Patienten bestimmt und dementsprechend ein individueller Extrakt für die IT zusammengestellt werden (MÜLLER, 2003), der anschließend hinsichtlich seiner therapeutischen Wirksamkeit zu überprüfen sein wird.

5 Literaturverzeichnis

AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY (AAAAI), Board of Directors: Position statement. Measurements of specific and nonspecific IgG₄ levels as diagnostic and prognostic tests for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(3):652-4

ABKIEWICZ C, LOMNITZER R, RABSON AR: Desensitization of patients with bee sting allergy using pure venom. *S Afr Med J* 1979; 55(8):258-7

AGRESTI A, VERCELLI D: Analysis of gamma4 germline transcription in human B cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118:279-81

AKDIS CA, AKDIS M: Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest* 1998; 98:1676-83

AKDIS CA, BLESKEN T, AKDIS M, WÜTHERICH B, BLASER K: Role of IL-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106

AKDIS CA, BLASER K: Mechanism of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2000; 55:522-30

AKDIS CA, BLASER K, AKDIS M: Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59(9):897-913

ALBEGGER K: Aktuelle Aspekte der Hyposensibilisierung. *HNO* 1990; 38(7):233-41

BELLINGHAUSEN I, METZ G, ENK AH, CHRISTMANN S, KNOP J, SALOGA J: Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2- to- Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol* 1997; 27:1131-1139

BOUSQUET J, BRAQUEMOND P, FEINBERG J, GUERIN B, MAASCH H, MICHEL FB: Specific IgE response before and after rush immunotherapy with a standardized allergen or allergoid in grass pollen allergy. *Ann Allergy* 1986; 56:456-9

BOUSQUET J, FONTEZ A, AZNAR R, ROBINET LEVY M, MICHEL FB: Combination of passive and active immunization in honeybee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1987a; 79:947-54

BOUSQUET J, MÜLLER UR, DREBORG S: Immunotherapy with Hymenoptera venoms. Position paper of the Working group on immunotherapy of the European Academy of allergy and clinical immunology. *Allergy* 1987b; 42:401-13

BOUSQUET J, MICHEL FB: Advances in specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1992; 22(19):889-96

BOUSQUET J, LOCKEY RF, MALLING HJ: Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. WHO position paper. *Allergy* 1998; (1):1-42

BRESSER H, SANDNER C, RAKOSKI J: Insektenstichnotfälle in München 1992. *Allergo J* 1995; 7:373-377

BURNEY P, MALMBERG E, CHINN S, JARVIS D, LUCZYNSKA C, LAI E: The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99:314-322

CAHEN YD, WÜTHERICH B: Hymenoptera venom immunotherapy with aluminium hydroxide adsorbed extracts. *Int J Immunopathology and Pharmacology* 1997; 10(2):175-176

CAHEN YD, MALY FE, WÜTHERICH B: Cellular antigen stimulation test (CAST)- Verwendbarkeit in der Diagnostik von Insektengiftallergikern. *Schweiz Med Wochenschr* 1997; 127:5-11

CHARPIN D, BIRNBAUM J, VERVLOET D: Epidemiology of hymenoptera allergy. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:1010-1015

CLARK T, REES J: Asthma-Diagnose und Therapie. Hrsg. Rees J, Clark T. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag:1997. ISBN 3-7691-0362-9

CRETICOS PS: The role of immunotherapy in allergic rhinitis/allergic asthma. *Allergy Proc* 1995; 16(6):297-302

DE WECK AL, FURUKAWA K, URWYLER A, STADLER BM, DAHINDEN CA, MALY FE: Sufidoleukotriene-ELISA-Assay: A new cellular approach to the diagnostic of allergies. *Allergy* 1992; 47:150

DJURUP R, MALLING HJ: The IgE and IgG subclass antibody response in patients allergic to yellow jacket venom undergoing different regimes of venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76:46-55

DURHAM SR, VARNEY V, GAGA M, FREW AJ, JACOBSON M, KAY AB: Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1991; 21(1):206-210

DURHAM SR, TILL SJ: Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:157-64

EBNER H, NEUCHRIST C, HAVELEC L, KRAFT D: Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit einer spezifischen Immuntherapie bei Hausstaubmilben-Allergie. *Wien Klein Wochenschrift* 1989; 101(15):504-11

EDERY H, ISHAY J, GITTER S, JOSHUA H: Venoms of Vespidae. In: *Arthropod venoms, handbook exp. Pharmacol.* Bettini ed., Springer Verlag, New York 1978:690-771

EICH-WANGER C, MÜLLER UR: Bee sting allergy in beekeepers. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1292-8

- EINARSSON R, KARLSSON R, OLSSON R, UHLIN T, OEHLMAN S:** Crossed immunoelectrophoresis and crossed radioimmunoelectrophoresis analysis of "Yellow Jacket"-common wasp (*Vespula* ssp.). *Allergy* 1985; 40:257-263
- 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; 59:1102-9
- EVANS R, PENCE H, KAPLAN H, ROCKLIN RE:** The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed hayfever. *J Clin Invest* 1976; 57:1378-85
- EWAN PW:** Venom allergy, *Bmj* 1998; 316:1365-8
- FERNANDEZ J, BLANCA M:** Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to Hymenoptera in a rural population in the Mediterranean area, *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1069-74
- FORCK G:** Hyposensibilisierung bei Wespengift- und Bienengiftallergie. *Med Monatsschr Pharm* 1985; 8(4):107-12
- FREISING C, JAPPE U:** Evaluation des semiquantitativen Westernblots, des CAP-FEIA und des Hauttests bezüglich der Hymenoptereingiftallergie im Hinblick auf eine Hyposensibilisierungsbehandlung. *Allergologie* 2006; 29(2):46-54
- FREITAG M, HÖXTERMANN S, FREITAG AP, STRAUBE M, VON KOBYLETZKI G, ALTMEYER PP, SZLISKA C:** Flowzytometrische Messung der Aktivierung basophiler Granulozyten zur Diagnose der Wespengiftallergie. *Allergologie* 2001; 24:2-8
- FRICKER M, HELBLING A:** Hymenoptera sting anaphylaxis and urticaria pigmentosa: clinical findings and results of venom immunotherapy in ten patients, *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:11-5
- GÄDEKE R, HELWIG H, OTTO M, SCHINDRA F, WEINECK B:** Tödliche Vergiftungskrankheit eines Kindes nach massenhaften Wespenstichen. *Med. Klein.* 1977; 72:1487-1492
- GEHLHAR K, SCHLAAK M, BECKER W, BUFE A:** Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen specific IgG₄ to IgG₁ correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:479-506
- GLEICH GJ, ZIMMERMANN EM, HENDERSON LL, YUNGINGER JW:** Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:261-71
- GOLDEN DB:** Discontinuing venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1:353-6
- GOLDEN DB, KAGEY-SOBOTKA A, VALENTINE MD:** Dose dependence of Hymenoptera venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67:370-4.

- GOLDEN DB, VALENTINE MD:** Insect sting allergy. *Ann Allergy* 1984; 53:444-9
- GOLDEN DB, BREISCH NL, HAMILTON RG, GURALNICK MW, GREENE A, CRAIG TJ, KAGEY-SOBOTKA A:** Clinical and entomological factors influence the outcome of sting challenge studies. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(3):670-5
- GOLDEN DBK, KWITEROVICH KA, VALENTINE MD, KAGEY-SOBOTKA A, LICHTENSTEIN LM:** Risk and benefit of discontinuing venom immunotherapy (VIT) after 5 years. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:237
- GOLDEN DBK, LAWRENCE ID, HAMILTON RH, KAGEY-SOBOTKA A, VALENTINE MD, LICHTENSTEIN LM:** Clinical correlation of the venom –specific IgG antibody level during maintenance venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:386-93
- GOLDEN DBK, KWITEROVICH KA, KAGEY-SOBOTKA A, VALENTINE MD, LICHTENSTEIN LM:** Discontinuing venom immunotherapy: outcome after five years. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97(2):579-87
- GOLDEN DBK, KWITEROVICH KA:** Discontinuing venom immunotherapy: extended observations, *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:298-305.
- GRAFT DF & SCHOENWETTER WF:** Insect sting allergy: analysis of a cohort of patients who initiated venom immunotherapy from 1978 to 1986. *Ann Allergy* 1994; 73(6):481-5
- HABERMANN E:** Bee and wasp venoms. *Science* 1972; 177:314-322
- HAMILTON RG, KAGEY-SOBOTKA A:** In vitro diagnostic tests of IgE-mediated diseases. *Clin Allergy Immunol* 2000; 15:89-110
- HAUGARD L, NORREGARD O, DAHL R:** In hospital sting challenge in insect venom allergic patients after stopping venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 699-702
- HAUK P, OTTO J, SCHWAB KO, KAUFMEHL K, URBANEK R, EICHLER HG, FORSTER J:** Anaphylactic reactions to bee sting challenges in allergic children are not modified by endogeneous catecholamines. *Pediatr Res* 1995; 38(6):998-1002
- HAUX P, SAWERTHAL H, HABERMANN E:** Sequenzanalyse des Bienengift-Neurotoxins (Apamin) aus seinen tryptischen und chymotryptischen Spaltstücken. *Z. Physiol. Chem.* 1967; 348:737-738
- HIPLER U-C, BAUER A, SCHLENVOIGT G, ELSNER P:** Untersuchungen zur Verlaufskontrolle der Hyposensibilisierung mit Hilfe des Zellantigenstimulationstests (CAST). *Allergologie* 2001; 24:9-13
- HIRAI Y, YASUHARA T, YOSHIDA H, NAKAJIAMA T, FUJINO M, KITADA C:** A new mast cell degranulating peptide „Mastoparan“ in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem. Pharm. Bull.* 1979; 27:1942-1944

HOFFMANN DR, SHIPMAN WH: Allergens in bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 58:551-562

HOFFMAN DR: Insect Venom Allergy, Immunology and Immunotherapy. In: Tu ATMD, Inc., ed. *Handbook of natural toxins*. New York, 1984: 184-224

HOFFMAN DR, JACOBSEN RS: Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting?, *Ann Allergy* 1984; 52:276-8

HOFFMAN DR: Allergens in Hymenoptera venom XIII: Isolation and purification of protein components from three species of vespid venoms. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:599-605

HOLFORD-STREVEVS V, WARREN P, WONG C, MANFREDA J: Serum total immunoglobulin E levels in Canadian adults. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:516-22

HÖXTERMANN S, AUER TH, ALTMAYER P: Zellulärer Antigen-Stimulationstest und Basophiler Degranulationstest in der in-vitro-Diagnostik der Wespengiftallergie. *Z Dermatol* 1995; 181:211

HUNT KJ, VALENTINE MD, SOBOTKA AK, BENTON AW, AMODIO FJ, LICHTENSTEIN LM: A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 1978 299: 157-61

HUSSAIN R, POINDEXTER RW, OTTESEN EA: Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG₄ subclass. *J Immunol* 1992; 148:2731-7

ISHIZAKA T, SOTO CS, ISHIZAKA K: Mechanisms of passive sensitization, III: number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes. *J Immunol* 1973; 111:500-511

JARISCH R: Passive immunotherapy in bee venom allergic patients. *Arch Dermatol Res* 1981; 270:230

JARISCH R, HEMMER W: Spezifische Immunotherapie bei Allergien- eine Standortbestimmung. *Wien Med Wochenschrift* 1996; 146(15):422-425

JEEP S, EICKHOLT M: Wespengiftspezifisches IgE: Vergleich von Phadebas-RAST, Magic-Lite und Pharmacia CAP System, *Allergo J* 1993; 2:136-140

JEEP S, PAUL M, MÜLLER UR, KUNKEL G: Honeybee venom allergy: immunoblot studies in allergic patients after immunotherapy and before sting challenge. *Allergy* 1996; 51:540-546

JUGERT FK, ROOS T, MERK HF: Nachweis von spezifischem IgE, IgG, und IgG-Subklassen bei Wespengiftallergikern vor und während Hyposensibilisierung mittels Immunoblot. *Allergo J* 1993; 2(2):103-107

JUNG K, LEHMANN B, LINSE R: Die Bedeutung des AlaSTAT-AlaBLOT Immunoblot für die Diagnose von Insektengiftallergien. *Allergologie* 1999; 22:421-427

JUTEL M, PICHLER WJ: Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen stimulated T-cell cultures, *J Immunol* 1995; 154:4187-94

JUTEL M, AKDIS M, BUDAK F, AEBISCHER-CASUALTA C, WRZYSZCZ M, BLASER K, AKDIS CA: IL-10 und TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33:1205-14

KARLSSON R, EINARSSON R: Determination of histamine in Hymenoptera venoms. *Allergy* 1982; 37:29

KARPAS AB, BAER H, HOOTON ML, EVANS R: A high molecular weight allergenic fraction of honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 60:155-162

KEMENY DM, BANKS B, LAWRENCE A, PEARCE F: The purification of hyaluronidase from the venom of the honeybee (*Apis mellifera*). *Biochem Int* 1981; 2:145-151

KERSTEN W, WAHL PG, LANGE CE, WENNING J: Empfehlung zur in vitro-Diagnostik allergischer Erkrankungen. Positionspapier des Ärzteverbands Deutscher Allergologen e.V. *Allergo J* 2000; 9(1):21-24

KING TP, SOBOTKA AK, KOCHOUMIAN L, LICHTENSTEIN LM: Allergens of honey bee venom. *Arch Biochem Biophys* 1976; 172(2):661-71

KING TP, SPANGFORT MD: Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123(2):99-106

KLEINE-TEBBE J, FUCHS T, KLIMEK L, KÜHR J, LEPP U, NIGGEMANN B, RAKOSKI J, RENZ H, SALOGA J, SIMON J: Allergen immunotherapy- A position paper of the German society for allergology and clinical immunology. *Allergo J* 2000; 9:137-24

KLEINE-TEBBE J: Immunologisch basierte allergologische Diagnostik in vitro und ex vivo. *Allergo J* 2003; 12:198-200

KLEINE-TEBBE J, BERGMANN KC, FRIEDRICHS F, FUCHS T, JUNG K, KLIMEK L, KÜHR J, LÄSSIG W, LEPP U, NIGGEMANN B, RAKOSKI J, REBIEN W, RENZ H, SALOGA J, SIMON J, SITTER H, VIRCHOW C, WORM M: Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. Leitlinie der DGAKI, ÄDA, GPA. *Allergo J* 2006; 15:56-74

KNOL EF, MUL FPJ, JANSEN H, CALAFAT J, ROOS D: Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:328-338

KOWALSKI ML, JUTEL M: Mechanism of specific immunotherapy of allergic diseases, *Allergy* 1998; 53:485-92

- KULIG M, TACKE U, FORSTER J, EDENHARTER G, BERGMANN R, LAU S, WAHN V, ZEPP F, WAHN U:** Serum IgE levels during the first 6 years of life. *J Pediatr* 1999; 134:453-8
- KULIKE H, STRAUß B:** Zur Struktur und Funktion des Hymenopterenstachels. *Amts- und Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Materialprüfung (BAM)* 1986; 16:S519-50
- LERCH E UND MÜLLER UR:** Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients, *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:606-12.
- LESSOF MH, SOBOTKA AK, LICHTENSTEIN LM:** Effects of passive antibody in bee venom anaphylaxis: *Johns Hopkins Med J* 1977; 142:1-7
- LIGHT W, REISMAN RE, ILEA V, WYPYCH JL, OKAZAKI T, ARBESMAN CE:** Studies on the antigenicity and allergenicity of phospholipase A2 of bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 58:322-329
- LOCKEY RF:** Immunotherapy for allergy to insect stings. *N Engl J Med* 1990; 323(23):1627-28
- MARCOTTE GV, BRAUN CM, NORMAN PS, NICODEMUS CF, KAGEY-SOBOTKA A, LICHTENSTEIN LM, ESSAYAN DM:** Effects of peptide therapy on ex vivo T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:506-13
- MASCHWITZ U, KLOFT W:** Morphology and function of the venom apparatus of insects-bees, wasps, ants and caterpillars. In: Bucherl W, Buckley E, eds. *Venomous Invertebrates*. New York: Academic Press, 1971:1-60
- MATZKE A, BOGDANOV S:** Bienenprodukte und Apitherapie. *Fachschriftenverlag des Vereins deutsch-schweizerischer Bienenfreunde*. Liebfeld, Bern 1997, 82-83
- MAUSS V:** Diversity, occurrence, foraging and defensive behavior of allergologically relevant bees and folded-winged wasps in Germany. *Allergo J* 2003; 12:S7-15
- MILLEWR SC, MUNESMASA KH, BER D, KLEIN DE, BOYD GK:** Follow up of hymenoptera sensitive patients without active immunotherapy. *Allergy Proc* 1994; 15:65-68
- MORET C, ENZEL C, LECLERECQ M:** Un cas d'enveimacion mortelle par piqures multiples d'abeilles (*apis mellifera* L.). *Rev. Med. Liege* 1983; 38:815-822
- MOSBECH H, MALLING HJ, BIERING I:** Immunotherapy with yellow jacket venom. A comparative study including three different extracts, one adsorbed to aluminium hydroxide and two unmodified. *Allergy* 1986; 41:95-103.
- MÜLLER A, KREBS A, AMIET F:** Bienen: mitteleuropäische Gattungen, Lebensweise, Beobachtung. München: Naturbuch-Verlag, 1997
- MÜLLER HL:** Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J. Astma Res.* 1966; 3:331-333

- MÜLLER U, MORRIS T, BISCHOF M, FRIEDLI H, SKAVARIL F:** Combined active and passive immunotherapy in honey-bee-sting allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78:115-22
- MÜLLER U, HELBLING A:** Mastocytosis and atopy: a study of 33 patients with urticaria pigmentosa, *Allergy* 1990; 45:597-603
- MÜLLER U, BERCHTOLD E, HELBLING A:** Honeybee venom allergy: results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:702-9.
- MÜLLER U, HELBING A, BERCHTOLD E:** Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:529-35.
- MÜLLER U, BERCHTOLD E, HELBLING A:** Wie lange soll eine Insektengift-Hyposensibilisierung durchgeführt werden? *Allergo J* 1993; 2(2):S120
- MÜLLER U, MOSBECH H:** Position paper: Immunotherapy with hymenoptera venoms. (EAACI) The European Academy of Allergology and Clinical Immunology, *Allergy* 1993; 48:36-46.
- MÜLLER U, AKDIS CA, FRICKER M, AKDIS M, BLESKEN T, BETTENS F, BLASER K:** Successful immunotherapy with T-cells epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:747-54
- MÜLLER UR, HORAT W:** Anaphylaxis after Hymenoptera stings in three patients with urticaria pigmentosa, *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72:685-9
- MÜLLER UR:** Insektenstichallergie: Klinik, Diagnostik und Therapie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1988
- MÜLLER UR:** Insect sting allergy: Clinical picture, diagnosis and treatment. Stuttgart/New York: Gustav Fischer Verlag 1990
- MÜLLER UR:** Der Stellenwert der Immunotherapie in der Behandlung IgE-vermittelter allergischer Krankheiten. *Ther Umsch* 1994a; 51(1):67-76
- MÜLLER UR:** Insektengiftallergie. *Ther Umsch* 1994b; 51(1):38-44
- MÜLLER UR:** Rekombinante Hymenopterengiftallergene. *Allergo J* 2003; 12:25-31
- NAKAGAWA T:** The role of IgG₄ subclass in the clinical response to immunotherapy in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:289-96
- NAKAJIMA T:** Biochemistry of Vespid Venoms. In: *Handbook of Natural Tox ins*. Vol.2. Ed..Tu, AT. Marcel Dekker, Inc., New York 1984:109-134
- NOON L:** Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1572-3

NORMAN PS: Modern concepts of immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(6):968-73

NOURI-ARIA KT, WACHHOLZ PA, FRANCIS JN, JACOBSON MR, WALKER SM, WILCOCK LK, STAPLE SQ, AALBERSE RC, TILL SJ, DURHAM SR: Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10, responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004; 172:3252-9

NYGEN KL, GILLIS S, MACGLASHAN DWJ: A comparative study of releasing and non-releasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE crosslinking. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:1020-1029

O`CONNER R, PECK ML: Venoms of apidae. In. Bettini S: *Arthropod venoms handbook of exp pharmacol* 1978; 48:613-659

OLLERT M: Prognostische Bedeutung von Immunoblot-Untersuchungen bei Hymenoptergiftallergie. *Allergologie* 1999; 22(2):78-79

OLLERT M, RAKOSKI J, JESSBERGER B, RING J: Prognostic value of immunoblotting in patients on immunotherapy with Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(1):S59

OLLERT M: Immunoblot in der Allergiediagnostik. *Blackwell Med. Report* 2002; 23:2

OLLERT M, RUËFF F, PRZYBILLA B, MÜLLER U, RING J: Results of a multicenter study on the prognostic value of immunoblot tests in patients on Hymenoptera venom immunotherapy. *Allergo J* 2003; 12(1):S71-2

OUDE-ELBRINK JN, DE MONCHY JG, KORS JW, VAN DOORMAAL JJ, DUBOIS AE: Fatal anaphylaxis after a Yellow jacket sting, despite venom immuno-therapy, in two patients with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:153-154

PARKER JL, SANTRACH PJ, DAHLBERG JE: Evaluation of hymenoptera-sting sensitivity with deliberate sting challenges: inadequacy of present diagnostic methods. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69:200-7

PATTERSON R: The role of immunotherapy in respiratory allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(2):S403-405

PIERKES M, BELLINGHAUSEN I, HULTSCH T, METZ G, KNOP J, SALOGA J: Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN- γ production of T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:326-332.

PRZYBILLA B: Bienen und Wespengiftallergie, *Hautarzt* 1993; 44:611-22

PRZYBILLA B, RUËFF F: Insektengiftallergie- Gemeinsame Leitlinie von DGAI und ÄDA. *Allergo J* 1999; 8:235-8.

- PRZYBILLA B, RUËFF F, FUCHS T, PFEIFFER CH, RAKOSKI J, STOLZ W, VIELUF D:** Insect venom allergy. *Allergo J* 2004; 13:186-90
- REIMERS A, MÜLLER U:** Bienen- und Wespengiftallergie. *Schweiz Med Forum* 2004; 4:661-665
- REINHARDT D:** Asthma bronchiale im Kindesalter. Hrsg. Reinhardt D. Berlin: Springer Verlag, 1996. ISBN 3-540-60256-9
- REISMAN RE:** Venom immunotherapy- when is it reasonable to Stopp? *J.Allergy Clin Immunol* 1991; 87:618-620
- RENZ H, BECKER WM, BUFE A, KLEINE-TEBBE J, RAULF-HEIMSOTH M, SALOGA J, WERFEL T, WORM M:** In-vitro-Allergiediagnostik, Positionspapier der DGAI. *Allergo J* 2002; 11:492-506
- RIEHELMANN H, BACHERT C, GOLDSCHMIDT O, HAUSWALD B, KLIMEK L, SCHLENTNER WW, TASMAN AJ, WAGENMANN M:** Durchführung des nasalen Provokationstests bei Erkrankungen der oberen Atemwege. *Allergo J* 2002; 11:29-36
- RIEGER-ZIEGLER V, RIEGER E:** Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first weeks after a sting, *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120:166-8
- RIHET P, DEMEURE CE:** Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG₄, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemica area. *Eur J Immunol* 1992; 22:2063-70
- RING J, PRZYBILLA B, MÜLLER UR:** Insektengiftallergie: Aktuelles für die Praxis. *Allergo J* 1997; 6:71-72
- ROCKLIN RE, SHEFFER A, GREINER DK, MELMON KL:** Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization. *N Engl J Med* 1980; 302:1213-9
- RÖVER AC, HENZ BM, WORM M:** B-Zellen als Effektorzellen und potentielle Zielzellen bei der Behandlung von Typ I-allergischen Erkrankungen. *Allergologie* 2002; 25:475-483
- RUËFF F, PRZYBILLA B:** Venom Immunotherapy: adverse reactions and treatment failure. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:307-11
- RUËFF F, PRZYBILLA B, MULLER U, MOSBECH H:** The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on Insect Venom Allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1996; 51:216-25
- RUËFF F, PRZYBILLA B, FUCHS T, GALL H, RAKOSKI J, STOLZ W, VIELUF D:** Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. Positionspapier der DGAI. *Allergo J* 2000; 9:458-472

- RUPPERT V:** Asthmafibel. Hrsg. V Ruppert. Stuttgart: Schwarzeck-Verlag GmbH, 1985
- SALOGA J:** Immunologische Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie. *Allergo J* 2003; 12:201-3
- SCHÄFER T, PRZYBILLA B:** IgE antibodies to Hymenoptera venoms in the serum are common in the general population and are related to indications of atopy. *Allergy* 1996; 51: 372-7
- SCHOENWETTER WF:** Safe allergen immunotherapy. The correct allergen, the appropriate patient, the adequate dose. *Postgrad Med* 1996; 100(2):123-6
- SCHUBERTH KC, LICHTENSTEIN LM, KAGEY-Sobotka A, Szklo M, Kwiterovich KA, Valentine MD:** Epidemiologic study of insect allergy in children. II. Effect of accidental stings in allergic children. *J Pediatr* 1983; 102(3):361-5
- SECRETIST H, CHELEN CJ, WEN Y, MARSHALL JD, UMETSU DT:** Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178:2123-30
- SETTIPANE GA, NEWSTEAD GJ, BOYD GK:** Frequency of hymenoptera allergy in an atopic and normal population. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1972; 50:146-150
- SHIPOLINI RA:** Biochemistry of bee venom. In: *Handbook of Natural Toxins Vol. 2* Ed..Tu, AT Marcel Dekker Inc., New York 1984; 49-86
- SITZMANN F:** Normalwerte. München: Hans Marseille Verlag, 1986
- SOBOTKA AK, FRANKLIN RM, ADKINSON NF, VALENTINE M, BAER H, LICHTENSTEIN LM:** Allergy to insect stings.II. Phospholipase A: the major allergen in honeybee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 57(1):29-40
- SOLDATOVA LN, BAKST JB, HOFFMAN DR, SLATER JE:** Molecular cloning of a new honeybee venom allergen, acid phosphatase. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:S378
- STORCH V, WELSCH U:** Systematische Zoologie. Gustav-Fischer Verlag 1997, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- TIKKAINEN U, KLOCKARS M:** Clinical significance of IgG subclass antibodies to wheat flour antigens in bakers. *Allergy* 1990; 45:497-504
- TREUDLER R, TEBBE B, ORFANOS CE:** Standardisierte Schnellhyposensibilisierung mit einem gereinigten Hymenopterengift bei Wespengiftallergie. *Hautarzt* 1997; 48(10):734-39
- TSANZ:** Thoracic Society of Australia and New Zealand: Specific allergen immunotherapy for asthma. A position paper of the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Australian Society of Clinical Immunology and Allergy. *Med J Aust* 1997; 167:540-544

URBANEK R, FORSTER J, KUHN W, ZIUPA J: Discontinuation of bee venom immunotherapy in children and adolescents. *J Pediatr* 1985; 107:367-371

URBANEK R, KEMEY DM, RICHARDS D: Sub-class of IgG anti-bee venom antibody produced during bee venom immunotherapy and its relationship to long-term protection from bee stings and following termination of venom immunotherapy, *Clin Allergy* 1986; 16:317-22

VALENTINE MD, SCHUBERTH KC, COBOTKA AK, GRAFT DH, KWITEROVICH KA, SLOH M, LICHTENSTEIN L: The value of immunotherapy with venom in children with allergy to insect stings. *N Engl J Med* 1990; 323:1601-1603

VAN NEERVEN RJ, WIKBORG T, LUND G: Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol* 1999; 163:2944-2952.

VERCELLI D, DE MONTE L: Can an IL-4-induced B cell choose between IgE and IgG₄?. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116:1-4

WAHN U: Hyposensitization in allergic diseases of the respiratory tract: indications, effectiveness, management. *Dtsch Med Wochenschr* 1991; 116(18):701-4

WANG JY, LEI HY, HSIEH KH: The change of allergen-specific IgG subclass antibodies during immunotherapy in mite-sensitive asthmatic children. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1996; 111(2)::173-81

WILSON DR, IRANI AM, WALKER SM: Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *Clin Exp. Allergy* 2001a; 31:1705-1713

WILSON DR, NOURI-ARIA KT, WALKER SM: Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 2001b; 107:971-976

WÜTHERICH B, DIETSCHI R, BERLINGER F, MARTI-WYSS S, CUHAT J: Der Basophilen-Degranulationstest in der Diagnostik der Hymenopteren Giftallergie. *Schweiz. Med. Wschr.* 1987; 117:1333-1341

WÜTHERICH B, SCHEITLIN T, WYSS M: Resultate einer prospektiven Studie über die Hyposensibilisierung mit Aluminiumhydroxid-adsorbierten Insektengiftextrakten. *Allergo J* 1993; 2:S95-102

YUNGINGER JW, PAULL BR, JONES R: Rush venom immunotherapy program for honeybee sting sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 63:340-7.

YUNGINGER J, REED C, ELLIS E, ADKINSON N, BUSSE W: Allergy, Principles and Practice. *Insect Allergy* 1993; 4:1511-1521

ZOLLNER TM, SPENGLER K, PODDA M: The westen blot is a highly sensitive and efficient technique in diagnosing allergy to wasp venom. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1754-1761

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Allergische Immunantwort und Wirkungsweise der IT	21
Abbildung 2: Allergiefragebogen Studienkollektiv A	31
Abbildung 3: Altersverteilung in Gruppe B	32
Abbildung 4: Geschlechtsverteilung in Gruppe B	32
Abbildung 6: Protokoll Insektengifthyposensibilisierung (Universitätsklinikum Münster)	34
Abbildung 7: Nachweis sIgE-Ak gegen die Hauptallergene des jeweiligen Insektengifts (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland).....	35
Abbildung 8: AlaBLOT-Streifen mit aufgetrennten Proteinen eines Allergenextraktes zum Nachweis epitop-spez. IgE-/IgG ₄ -Antikörper im Patientenserum (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland).....	37
Abbildung 9: Scannerauswertung Immunoblotstreifen.....	38
Abbildung 10: Anzahl der Jahre der Imkerei	43
Abbildung 12: Anzahl der Stiche im Jahr	43
Abbildung 13: Auswertungsbogen der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland.....	45
Abbildung 14: sIgG ₄ < sIgE = unvollständiges Bandenmuster = „nicht-geschützt“	46
Abbildung 15: sIgG ₄ < sIgE = vollständiges Bandenmuster = „geschützt“	46
Abbildung 16: Vergleich durchschnittliche Anzahl der Stiche im Jahr / Anzahl der Jahre der Imkerei mit sIgG ₄ >sIgE („geschützt“) und sIgG ₄ <sIgE („nicht-geschützt“)	49
Abbildung 17: Zusammenhang Anzahl der Stiche im Jahr/ Anzahl der Jahre der Imkerei und dem Reaktionsverhalten nach einem Bienenstich	50
Abbildung 18: Zusammenhang kutane Symptome / Anzahl der Jahre der Imkerei, Anzahl der Stiche im Jahr	50
Abbildung 19: Zusammenhang systemische Symptome / Anzahl der Jahre der Imkerei, Anzahl der Stiche im Jahr.....	51
Abbildung 20: Vergleich der größten sIgE- und sIgG ₄ -Peaks mit dem Reaktionsverhalten nach einem Stich	52
Abbildung 21: Vergleich Gesamtintensität der sIgG ₄ -Peaks in der Gruppe der Reactors/Non-Reactors	53
Abbildung 22: Anzahl der Banden für sIgE und sIgG ₄	53
Abbildung 23: Anzahl der sIgE und sIgG ₄ Banden in der Gruppe der Reactors/ Non- Reactors.....	54
Abbildung 24: Vergleich Gesamt- und sIgE-Spiegel bei Reactors/ Non-Reactors.....	54
Abbildung 25: Zusammenhang Gesamt-, spezifisches-IgE / Atopie	56

Abbildung 26: Majorallergene für sIgE und sIgG ₄	57
Abbildung 27: Anzahl der sIgE- und sIgG ₄ -Banden gegen Melitin, Phospholipase A2 und Hyaluronidase	59
Abbildung 28: Prozentualer Anteil der Patienten mit vollständigem (sIgG ₄ >sIgE) Bandenmuster vor und während IT	62
Abbildung 29: Anzahl der Banden für sIgE bzw. sIgG ₄ während IT in der Gruppe der Reactors und Non-Reactors.....	63
Abbildung 30: Anzahl der Banden für sIgE und sIgG ₄ vor und während IT	63
Abbildung 31: größter/ höchster Peak für sIgE bzw. sIgG ₄ vor und während IT	64
Abbildung 32: Vergleich Reactors, Non-Reactors, Gesamt- und spezifisches IgE	65
Abbildung 33: Gesamt- und spezifischer IgE-Spiegel vor und während der IT	66
Abbildung 34: Änderung des Antikörperprofils während der IT bezüglich der höchsten sowie größten sIgE Peaks	68
Abbildung 35: Änderung des Antikörperprofils während der IT bezüglich der höchsten sowie größten sIgG ₄ Peaks.....	69
Abbildung 36: Vorhandensein von IgG ₄ -Ak gegen Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase im Verlauf der SIT	71
Abbildung 37: Vorhandensein von IgE-Ak gegen Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase im Verlauf der SIT	72

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Systematische Einteilung einiger Hymenopteren (PRZYBILLA 2004, STORCH 1997).....	2
Tabelle 2:	Inhaltsstoffe von Bienengift (HABERMANN 1972, O'CONNOR 1978, SHIPOLINI 1984).....	3
Tabelle 3:	Inhaltsstoffe von Wespengift (EDERY 1978, NAKAJIAMA 1984)	4
Tabelle 4:	Einteilung der allergischen Allgemeinreaktionen auf Hymenopterenstiche nach H. L. MÜLLER 1990 (leicht modifiziert).....	9
Tabelle 5:	Referenzbereiche für das Gesamt-IgE (RENZ et al. 2002)	14
Tabelle 6:	Einflussgrößen bei der Messung spezifischer IgE-Antikörper (RENZ et al. 2002).....	16
Tabelle 7:	Testverfahren für den Nachweis von allergen- bzw. antigen-spezifischem IgG.....	17
Tabelle 8:	Pathophysiologische Überlegungen zur Wirkungsweise der spezifischen Hyposensibilisierung	22
Tabelle 9:	Einteilung und Interpretation der IgE-Konzentration nach WHO-Klassifikation	40
Tabelle 10:	Häufigkeit begleitender allergischer Symptome nach einem Bienenstich (Mehrfachnennung möglich).....	42
Tabelle 11:	Verteilung Reactors/ Non-Reactors/ vollständiges-/ unvollständiges Bandenmuster.....	47
Tabelle 12:	Vergleich kutane Symptome/ vollständiges-/ unvollständiges Bandenmuster.....	47
Tabelle 13:	Vergleich systemische Symptome/ vollständiges-/ unvollständiges Bandenmuster.....	48
Tabelle 14:	Vergleich Reactors/ Non-Reactors/ Atopiker/ nicht Atopiker	55
Tabelle 15:	Anzahl der sIgE und sIgG ₄ -Banden gegen die drei Hauptallergene: Melitin, Phospholipase A2 und Hyaluronidase.....	58
Tabelle 16:	Reaktionen im Rahmen der Stichprovokation während IT (Mehrfachnennung möglich).....	61
Tabelle 17:	Verteilung Reactors/ Non-Reactors mit vollständigem-/ unvollständigem Bandenmuster	62
Tabelle 18:	Anzahl der Patienten mit sIgE, und sIgG ₄ -Ak gegen Antigen 5, Phospholipase A1 und Hyaluronidase vor Beginn der Hyposensibilisierung	67

DANKSAGUNG

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Brehler, für die Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung und Betreuung, danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. P. Boknik gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine unkomplizierte Unterstützung meines Promotionsverfahrens an der WWU Münster.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern der allergologischen Abteilung, der WWU Münster, bedanken. Die Zusammenarbeit mit ihnen war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen der Arbeit.

Für die Einarbeitung in das Computerprogramm QuantiScan möchte ich der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland danken.

Herrn Stefan Vogels danke ich für die Hilfe beim Layouten sowie für seine wertvollen Ratschläge bei diversen Computerproblemen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Krieg. Ohne seine konstruktive Kritik, sein fundiertes Fachwissen und weitreichende Unterstützung wäre mein Forschungsprojekt nicht zur Doktorarbeit ausgereift. Er hat mich stets bestärkt, wenn ich an mir gezweifelt habe und mich stets aufs Neue motiviert.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. A-Ram Jo, ohne den ich nie ein Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen hätte.

Des Weiteren möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken, ohne die mein Studium und diese Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären. Sie haben mir die ganze Zeit den Rücken frei gehalten und daher widme ich ihnen diese Arbeit.

