

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
des Universitätsklinikums Freiburg i. Br.
Ärztliche Direktorin Univ.-Prof. Dr. med. L. Bruckner-Tuderman

Nutzen und Grenzen der molekularen Diagnostik bei Hymenopterenengiftallergie



INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2017

von Marcel René Frick

geboren in Bad Säckingen

Dekanin

Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Krieglstein

1. Gutachter

Prof. Dr. med. Thilo Jakob

2. Gutachter

Prof. Dr. med. Robert Zeiser

Jahr der Promotion

2018

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	6
2	<u>EINLEITUNG</u>	8
2.1	EPIDEMIOLOGIE DER HYMENOPTERENGIFTALLERGIE.....	8
2.2	AUSLÖSER DER HYMENOPTERENGIFTALLERGIE	8
2.3	PATHOGENESE DER BIENENGIFT-ALLERGIE.....	9
2.4	KLINISCHES BILD	10
2.5	THERAPIE	11
2.5.1	ÖRTLICHE REAKTIONEN.....	11
2.5.2	SYSTEMISCHE REAKTIONEN	12
2.5.3	SPEZIFISCHE IMMUNTHERAPIE	12
2.5.3.1	Therapeutika für die spezifische Immuntherapie	13
2.5.3.2	Therapiekontrolle.....	13
2.5.3.3	Stichprovokation	14
2.5.3.4	Prädiktoren des Therapieergebnisses	14
2.6	DIAGNOSTIK.....	15
2.6.1	ANAMNESE.....	15
2.6.2	HAUTTEST	16
2.6.3	IN-VITRO-TESTUNG.....	17
2.7	MOLEKULARE ALLERGIEDIAGNOSTIK.....	18
2.7.1	HYMENOPTERENGIFT-EINZELALLERGENE	18
2.7.2	SENSIBILISIERUNGSPROFILE BEI BIENENGIFT-ALLERGIKERN	19
2.7.3	KREUZREAKTIVITÄT.....	20
3	<u>FRAGESTELLUNGEN</u>	21
4	<u>METHODIK UND PATIENTEN</u>	22
4.1	PATIENTENKOLLEKTIVE	22
4.1.1	THERAPIEANSPRECHER UND THERAPIEVERSAGER.....	22
4.1.2	KOLLEKTIV BIENENGIFT- UND WESPENGIFTSENSIBILISierter PATIENTEN	24
4.2	MESSMETHODEN	24
4.2.1	GESAMTEXTRAKTE UND EINZELALLERGENE.....	25
4.2.2	HERSTELLUNG DER ANTISEREN.....	26

4.2.3	IMMUNOBLOT-ANALYSEN.....	27
4.3	DATENVERARBEITUNG	27
4.3.1	STATISTISCHE MESSMETHODEN.....	28
4.4	DARSTELLUNG.....	28
5	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>29</u>
5.1	THERAPIEANSPRECHER UND THERAPIEVERSAGER.....	29
5.1.1	DEMOGRAPHISCHE UND KLINISCHE DATEN.....	29
5.1.2	SENSIBILISIERUNGSPROFIL VOR BEGINN DER SPEZIFISCHEN IMMUNTHERAPIE	30
5.1.3	GRUPPENVERGLEICH DER sIGE-REAKTIVITÄTEN GEGEN EINZELALLERGENE.....	31
5.1.3.1	Einzelallergene vor Beginn der spezifischen Immuntherapie.....	32
5.1.3.2	Einzelallergene vor der Stichprovokation.....	33
5.1.4	RATIO sIGE GEGEN EINZELALLERGENE IM VERHÄLTNIS ZUM sIGE GEGEN GESAMTEXTRAKT BIENENGIFT.....	34
5.1.4.1	Ratio vor Beginn der spezifischen Immuntherapie.....	35
5.1.4.2	Ratio vor der Stichprovokation.....	36
5.1.5	RATIO DES sIGE GEGEN EINZELALLERGENE IM VERHÄLTNIS ZUM GESAMT-IGÉ.....	37
5.1.6	ROC-KURVEN.....	39
5.1.6.1	slgE gegen rApi m 10.....	39
5.1.6.2	Ratio slgE gegen rApi m 10 / slgE gegen Bienengift-Gesamtextrakt	40
5.1.6.3	Ratio slgE gegen rApi m 10 / Gesamt-IgE	41
5.1.7	ODDS RATIO FÜR EIN THERAPIEVERSAGEN.....	42
5.1.7.1	Kontingenztafeln vor Beginn der spezifischen Immuntherapie.....	42
5.1.7.2	Kontingenztafeln vor der Stichprovokation.....	45
5.1.8	sIGG4-INDUKTION UNTER DER SPEZIFISCHEN IMMUNTHERAPIE	47
5.1.9	ANALYSE BIENENGIFT-GESAMTEXTRAKT UND SIT-THERAPEUTIKA.....	49
5.1.10	RAPI M 10-SPEZIFISCHE sIGE- UND sIGG4-ANTWORT DER SIT-THERAPEUTIKA	51
5.1.10.1	Vergleich der rApi m 10-spezifischen slgE-Reaktivität.....	52
5.1.10.2	Vergleich der rApi m 10-spezifischen slgG4-Induktion	54
5.2	KOLLEKTIV BIENENGIFT- UND WESPENGIFTSENSIBILISierter PATIENTEN	56
5.2.1	STECHINSEKT BIENE	57
5.2.2	NICHT-IDENTIFIZIERTES STECHINSEKT	58
5.2.3	MEHRWERT ZUSÄTZLICHER EINZELALLERGENE FÜR DIE DIAGNOSTIK	61
6	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>64</u>
6.1	THERAPIEANSPRECHER UND THERAPIEVERSAGER.....	65

6.2	KOLLEKTIV BIENENGIFT- UND WESPENGIFTSENSIBILISierter PATIENTEN	72
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
8	VERZEICHNISSE.....	77
8.1	LITERATURVERZEICHNIS	77
8.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	81
8.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	81
9	ANHANG.....	83
9.1	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
9.2	PUBLIKATIONEN, KONGRESSBEITRÄGE, PREISE UND AUSZEICHNUNGEN	84
9.2.1	PUBLIKATIONEN.....	84
9.2.2	KONGRESSBEITRÄGE	84
9.2.2.1	Abstracts mit Vortrag	84
9.2.2.2	Abstracts mit Posterpräsentation	86
9.3	PREISE UND AUSZEICHNUNGEN	86
9.4	EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG	88
9.5	DANKSAGUNG	89

1 Abkürzungsverzeichnis

95 %-KI	95 %-Konfidenzintervall
ACE-Inhibitor	engl. angiotensin converting enzyme inhibitor = Inhibitor des Angiotensin-konvertierenden Enzyms
AUC	engl. area under the curve = Fläche unterhalb der hier angewandten ROC-Kurve
BG	Bienengift
bpm	engl. beats per minute = Schläge pro Minute
bzw.	beziehungsweise
CCD	engl. cross-reactive carbohydrate determinants = kreuzreagierende Kohlenhydratseitenketten
Cut-off	Toleranzgrenze
d.h.	das heißt
ggf.	gegebenenfalls
GM	Geometrisches Mittel
IgE	Immunglobulin E
LOD	engl. limit of detection = Nachweisgrenze
MIS	engl. mastocytosis in the skin = Hautmastozytose
nApi	natürliches, isoliertes Bienengift-Einzelallergen
NLR	engl. negative likelihood ratio; Gibt an, wie sehr die Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung bei negativem Testergebnis sinkt
ns	nicht signifikant
o.g.	oben genannt
OR	Odds Ratio
PLR	engl. positive likelihood ratio; Gibt an, wie sehr die Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung bei positivem Testergebnis steigt
rApi	rekombinant hergestelltes Bienengift-Einzelallergen
ROC	engl. receiver operating characteristic; ROC-Kurve = Grenzwert-optimierungskurve
slgE	spezifisches IgE
sog.	sogenannt / sogenannte
SIT	Spezifische Immuntherapie
u.a.	unter anderem

vs.	versus, gegenüber
WG	Wespengift
WHO	engl. world health organisation = Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie der Hymenopterenengiftallergie

In der Allgemeinbevölkerung liegt die Prävalenz systemischer Reaktionen auf Stiche von Hymenopteren (Hautflügler) bei 1,2 – 3,5 % (Schäfer, 2009), gesteigerte örtliche Reaktionen treten in 2,4 - 26,4 % der Bevölkerung auf (Bilo et al., 2005). Eine auf IgE-Antikörper basierende Sensibilisierung gegen Bienengift (BG) ist im Rahmen von Hauttests und labordiagnostischer Detektion von Serum-IgE-Antikörpern in bis zu 25 % der Gesamtbevölkerung, bei Kindern sogar in nahezu 50 % nachgewiesen (Golden et al., 1989). Das Statistische Bundesamt erfasst jährlich etwa 20 Todesfälle, die auf eine anaphylaktische Reaktion infolge eines Stiches durch eine Biene, Wespe oder Hornisse zurückzuführen sind. Es sind dabei beinahe ausschließlich Erwachsene betroffen, des Weiteren mit einer Verteilung von etwa 2/3 überwiegend Männer. Die tatsächliche Inzidenz von Todesfällen infolge einer Anaphylaxie nach Hymenopterenstichen wird sehr wahrscheinlich jedoch deutlich unterschätzt, da aufgrund eines Nicht-Erkennens der eigentlich ursächlich zum Tode führenden Anaphylaxie eine andere Todesursache fehldiagnostiziert wird (Przybilla et al., 2007). Schwere Anaphylaxien bei Erwachsenen werden in den deutschsprachigen Ländern überwiegend durch Insektenstiche provoziert, bis zu ein Drittel der Anaphylaxieereignisse werden Insektengiftallergien zugerechnet (Hompes et al., 2008).

2.2 Auslöser der Hymenopterenengiftallergie

Die Ordnung der Hymenopteren unterliegt der Klasse der Insekten. Sie besteht aus 132 Familien mit > 150 000 beschriebenen Arten (Zhang, 2013). Die ihnen zugehörigen Aceluatae (Stechimmen) gliedern sich unter anderem in Apidae (Echte Bienen), Vespidae (Faltenwespen) und Formicidae (Ameisen). Zur Familie der Apidae gehören die Honigbiene (*Apis mellifera*, von nun an als Biene bezeichnet) und die Hummel (*Bombus*). Die Familie der Vespidae wird in die Subfamilien Vespinae und Polistinae unterteilt. Zu den Vespinae werden die bei uns am häufigsten vorkommenden Faltenwespen *Vespula germanica* (Deutsche Wespe) und *Vespula vulgaris* (Gemeine Wespe) (von nun an gemeinsam als Wespen bezeichnet) gezählt (Bilo et al., 2005). In Mitteleuropa sind insbesondere etwa 40 Bienen- und Faltenwespenarten und Hornissen potentielle Auslöser von Hymenopterenengift-

allergien. Aufgrund ihrer hohen Populationsdichte im Bereich von Siedlungs- und Freizeitbereichen des Menschen und zusätzlich einem ausgeprägten Feindabwehrverhalten am eigenen Nest sind Bienen, Wespen und, zu einem geringeren Anteil, Hummeln besonders häufig Auslöser von allergischen Stichreaktionen. Während bei BG-Allergikern die gesamte Vegetationsperiode von Februar bis Oktober ein erhöhtes Stichrisiko bedeutet, sind gegen Wespengift (WG) allergische Patienten insbesondere vom Hochsommer bis in den Herbst überwiegend gefährdet. Bei beiden Arten kommt es ganz besonders in der Nähe von Futterplätzen und im Nestbereich zu Stichereignissen. Die Angriffsmotivation unterliegt dabei unterschiedlichen Faktoren, u.a. der Entfernung zum Nest und der Witterung, wobei schwül-heißes Wetter ein aggressiveres Verhalten bedingt (Mauss, 2008). Bienen sind aufgrund der am Stechapparat angebrachten Widerhaken zu einem einzigen Stich in die elastische Epidermis fähig, bei dem der gesamte Stechapparat aus dem Hinterleib gerissen wird. Dies bedeutet für die Biene eine letale Verletzung. Es werden zwischen 50 - 140 µg Gift injiziert (Hoffman et al., 1988, Hoffman and Jacobson, 1984). Bei in der Epidermis verbleibendem Stechapparat wird die Giftinjektion noch bis eine Minute nach Entfernung des Insekts fortgesetzt. Demgegenüber haben Wespen die Fähigkeit zu multiplen Stichen, es werden jeweils ca. 3 µg Gift pro Stich injiziert (Tan and Campbell, 2013).

2.3 Pathogenese der Bienengift-Allergie

Die BG-Allergie gehört zu den IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. Zwingende Voraussetzung für eine allergische Erkrankung ist eine vorangehende Sensibilisierung, bei welcher ein Antigen im Rahmen einer spezifischen Immunreaktion als Allergen erkannt wird. Nach Kontakt mit allergenen Komponenten des Insektengiftes werden allergenspezifische IgE-Antikörper gebildet. Anaphylaktische Reaktionen gegen BG gehören zur Sofortreaktion des Typ I nach Coombs und Gell. Nach erneutem Kontakt im Rahmen eines Stichereignisses bindet das Allergen über eine Kreuzvernetzung („Cross-Linking“) an FcεRI-Rezeptoren auf der Oberfläche von gewebständigen Mastzellen und basophilen Granulozyten (Heppit und Bachert, 2011). Es folgt die Degranulation der gebundenen Mastzellen und basophilen Granulozyten und damit zur Ausschüttung von Histamin, Serotonin, Heparin, Prostaglandinen, Leukotrienen, sowie Zytokinen und Chemokinen. Insbesondere die histaminbedingten Symptome sind klinisch apparent. Histamin führt

zu Konstriktion der Atemwege und der Muskulatur des Gastrointestinaltraktes mit folglich Dyspnoe, Nausea und Emesis. Im Rahmen der Erhöhung der Gefäßpermeabilität kommt es zu einer Extravasation mit Ödembildung, an den peripheren Gefäßen bewirkt es eine Vasodilatation mit konsekutiver Blutdrucksenkung bis hin zum Schockzustand (Saloga et al., 2006).

2.4 Klinisches Bild

Man unterscheidet prinzipiell lokale von systemischen Reaktionen infolge eines Hymenopterenstiches. Lokal folgt, neben einer durch das Insektengift provozierten Schmerzreaktion, eine Rötung und Schwellung, welche einen Durchmesser < 10 cm aufweist und innerhalb eines Tages regredient ist. Man spricht von einer gesteigerten örtlichen Reaktion, d.h. schwere Lokalreaktion, sollte die beschriebene Schwellung > 10 cm einnehmen und zeitlich über einen Tag persistieren. Die Ätiologie ist wahrscheinlich allergisch, jedoch am ehesten nicht IgE-vermittelt. Diese überschießende Lokalreaktion kann von einer nicht-infektiösen Lymphangitis und einer milden Allgemeinzustandsreduktion begleitet sein. In sehr seltenen Fällen kann ein Stich im Bereich der Atemwege, toxisch oder allergisch bedingt, eine schwerwiegende Atemwegsobstruktion hervorrufen (Przybilla et al., 2011). Dem gegenüber zeigen systemische Reaktionen, d.h. Allgemeinreaktionen, Symptome, welche über die Einstichstelle hinausgehen bzw. keinen örtlichen Zusammenhang mit der Einstichstelle gemein haben. Eine Anaphylaxie ist beschrieben als Soforttypreaktion systemischen Ausmaßes, die potentiell das Leben bedroht. Der Auslöser einer Anaphylaxie ist zumeist ein einzelner Stich, welcher eine IgE-vermittelte Antikörper-Reaktion des allergischen Patienten gegen im Insektengift enthaltene Einzelallergene provoziert. Das klinische Bild zeigt sich dabei sehr variabel. Der Schweregrad variiert beginnend bei Hautreaktionen wie Pruritus, Urtikaria und Angioödem, gefolgt von gastrointestinalen, respiratorischen oder kardiovaskulären Beschwerdebildern milder bis mäßiger Ausprägung, bis hin zu schwerstgradiger pulmonaler und hämodynamischer Instabilität im Sinne eines anaphylaktischen Schocks (Müller, 1988). Die Schweregrade einer Anaphylaxie sind von Ring und Meßmer beschrieben worden (Tabelle 1) (Ring und Messmer, 1977). Letal sind insbesondere Atemwegsobstruktionen und ein kardiovaskuläres Versagen (Mosbech, 1983).

Grad	Haut	Abdomen	Respirationstrakt	Herz- / Kreislaufsystem
I	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem			
II	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Nausea Krämpfe	Rhinorrhoe Dysphonie Dyspnoe	Tachykardie (Anstieg \geq 20 bpm) Hypotonie (Abfall \geq 20 mmHg systolisch) Arrhythmie
III	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Erbrechen Defäkation	Larynxödem Bronchospasmus Zyanose	Schock
IV	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Erbrechen Defäkation	Atemstillstand	Kreislaufstillstand

Tabelle 1: Anaphylaxiegrade (Ring und Messmer, 1977).

Des Weiteren können multiple, zeitgleiche Stiche eine Intoxikation hervorrufen und im Rahmen der Toxinwirkung letal enden. Die Toxinbelastung ist insbesondere nephro- und hepatotoxisch (Bilo et al., 2005).

2.5 Therapie

Es erfolgt eine Unterscheidung zwischen der Behandlung örtlicher gegenüber der Behandlung von systemischen Reaktionen infolge eines Hymenopterenstiches (Przybilla et al., 2011).

2.5.1 Örtliche Reaktionen

Bei örtlichen Reaktionen erfolgt eine topische Behandlung mittels eines potenten Glukokortikoids. Supportive Maßnahmen wie kühlende, feuchte Umschläge sind zusätzlich symptomlindernd. Oral werden Antihistaminika der H1-Gruppe verabreicht. Gesteigerte örtliche Reaktionen indizieren eine systemische Behandlung durch eine kurzfristige systemische Steroidtherapie. Stiche im Bereich des Kopf- und Halsbereiches, welche mit einer gesteigerten örtlichen Reaktion einhergehen, bergen die Gefahr einer Obstruktion der Atemwege und müssen entsprechend nachbeobachtet werden. Zur Behandlung zukünftiger Stiche erhalten Patienten mit erlittener überschießende Lokalreaktion eine orale Notfallmedikation, bestehend aus einem potenten Glukokortikoid und einem H1-blockierenden Antihistaminikum. Weiter ist eine ärztliche Vorstellung nach Stich mit gesteigerter örtlicher Reaktion

bzw. Gebrauch der Notfallmedikation angezeigt (Przybilla et al., 2011). Sollten wiederholt gesteigerte örtliche Reaktionen auftreten, kann insbesondere bei beruflicher Insektenexposition eine kurative Therapie mittels spezifischer Immuntherapie diskutiert werden (Golden et al., 2009). Eine kürzlich erschienene Studie zeigte, dass vorangehende gesteigerte örtliche Reaktionen nicht mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer anaphylaktischen Reaktion bei einem nachfolgenden Stichereignis einhergehen (Pucci et al., 2015).

2.5.2 Systemische Reaktionen

Liegt eine Anaphylaxie vor, so ist eine notfallmedizinische Versorgung indiziert. Patienten, bei welchen eine Anaphylaxieabklärung bereits erfolgte, sind im Besitz einer Notfallmedikation bestehend aus o.g. oralem Glukokortikoid und Antihistaminikum und insbesondere eines intramuskulären Adrenalin-Auto-Injektors. Bei Eintreten einer Herz-Kreislauf-Reaktion erfolgt die intramuskuläre Applikation des Adrenalins. Im weiteren Verlauf erfolgt abhängig vom Schweregrad neben der Atemwegssicherung die intravenöse Volumensubstitution und Applikation von Katecholaminen, z.B. Adrenalin, sowie eines Glukokortikoids. Bei fehlender Möglichkeit einer intravenösen Applikation werden die Katecholamine intramuskulär oder intraossär appliziert, bei letzterem ist ein tibialer Zugang empfohlen. Inhalativ werden Sauerstoff, β 2-Sympathomimetika und Adrenalin verabreicht. Bei Herzkreislaufversagen wird eine kardiopulmonale Reanimation mit Herzdruckmassage und Beatmung im Verhältnis von 30:2 durchgeführt. Eine Defibrillation ist bei Auftreten eines Kammerflimmerns indiziert. Bei drohender oder bestehender Atemwegsobliteration erfolgt eine Intubation, ggf. eine Koniotomie, bei respiratorischer Insuffizienz eine assistierte oder kontrollierte Beatmung. Je nach Schweregrad und Persistenz der Symptomatik schließt sich eine intensivmedizinische Behandlung an (Ring et al., 2014).

2.5.3 Spezifische Immuntherapie

Tritt nach einem Hymenopterenstich eine systemische Reaktion ein, so ist neben einer Allergenvermeidung und dem Mitführen einer im Notfall anwendbaren Medikation eine spezifische Immuntherapie (SIT) indiziert. Die SIT stellt die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit bei der Hymenoptereingiftallergie dar (Przybilla et

al., 2011). Infolge der Behandlung werden regulatorische T-Zellen, die IL-10 und TGF- β produzieren, induziert. Des Weiteren werden blockierende Antikörper vom IgG4-Typ synthetisiert und reaktive Zellen (Mastzellen, Basophile, Eosinophile) supprimiert. Es erfolgt eine Normalisierung der hyperreaktiven Immunantwort (Heppt und Bachert, 2011).

2.5.3.1 Therapeutika für die spezifische Immuntherapie

Die für die SIT verwendeten Therapeutika liegen als wässrige oder in Depotform an Aluminiumhydroxid adsorbierte Lösungen vor. Es erfolgt eine subkutane Injektion des jeweiligen Präparates. In Form von unterschiedlichen Protokollen wird eine stufenweise Aufdosierung bis zum Erreichen einer Erhaltungsdosis von 100 μg Hymenopterengift durchgeführt. Grundsätzlich können zwei Steigerungsschemata unterschieden werden: bei der Schnellhyposensibilisierung wird das wässrige Hymenopterengift im Rahmen eines stationären Aufenthaltes bis zur Erhaltungsdosis aufdosiert. Beim Rush-Protokoll geschieht dies in wenigen Tagen, beim Ultra-Rush-Protokoll wird die Aufdosierung in wenigen Stunden erreicht. Demgegenüber wird bei der konventionellen SIT, welche mit denselben Allergenzubereitungen ambulant durchgeführt wird, das Erreichen der Erhaltungsdosis in Wochen bis Monaten erzielt. Die Wirksamkeit der Hyposensibilisierung hängt von der Erhaltungsdosis, nicht jedoch vom verwendeten Steigerungsprotokoll ab. Das zu bevorzugende Protokoll ist die im Rahmen eines stationären Aufenthaltes durchgeführte Schnellhyposensibilisierung. Es besteht eine dringliche Indikationsstellung für dieses Schema bei Patienten, die eine schwere Anaphylaxie nach Stichereignis erlitten. Das Ziel bei diesen höchstgefährdeten Patienten ist das möglichst rasche Erreichen einer Schutzwirkung gegenüber einem erneuten akzidentellen Stich (Ruëff et al., 2000). Die SIT wird in der Regel in einem 4-wöchigen Intervall drei Jahre lang, bei besonders hoher Gefährdung fünf Jahre oder unbefristet durchgeführt (Przybilla et al., 2011).

2.5.3.2 Therapiekontrolle

Es zeigen sich im Rahmen der SIT labordiagnostische detektierbare Effekte. Initial steigen die Hauttestreagibilität und die Höhe der im Serum messbaren IgE-Antikörper gegen die im therapeutischen Extrakt enthaltenen Einzelallergene an. Im

Verlauf der Therapie zeigt sich eine vergleichsweise geringer ausfallende Reaktion, teilweise werden prätherapeutisch erhöhte IgE-Werte gar normwertig gemessen (Rieger-Ziegler et al., 1999). Demgegenüber steigen die IgG4-Antikörper unter der SIT an und bleiben längerfristig erhöht (Köhler et al., 2014). Eine Wirksamkeitskontrolle und damit Aussagefähigkeit bezüglich des Schutzes gegenüber einem erneuten Stich des betreffenden, allergieauslösenden Insektes ist in Form von labordiagnostischen Parametern bislang jedoch nicht möglich. Die einzige Möglichkeit, das Therapieergebnis aussagekräftig zu prüfen, liegt in der diagnostischen Testung im Rahmen der Beobachtung der Reaktion auf einen Stich eines lebenden Insekts (Przybilla et al., 2011).

2.5.3.3 Stichprovokation

Zur Prüfung des Therapieerfolges wird die Stichprovokation mit dem lebenden, allergieauslösenden Insekt sechs bis achtzehn Monate nach Erreichen der Erhaltungsdosis durchgeführt (Przybilla et al., 2011). Neben der diagnostischen Kontrolle der Therapie führt ein ohne systemische Reaktion tolerierter Stich zudem zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen (Koschel et al., 2014). Die Provokation wird in einer Klinik mit Möglichkeit einer notfall- und intensivmedizinischen Behandlung unter stationärer Überwachung durchgeführt. Ein tolerierter Stich zeigt einen hohen prädiktiven Wert, dass zukünftige Stiche ebenfalls ohne das Auftreten einer anaphylaktischen Reaktion vertragen werden, d.h. mutmaßlich ein Schutz infolge der Therapie vorliegt. Demgegenüber zeigt eine erneute anaphylaktische Reaktion, dass ein Therapieversagen vorliegt (Ruëff et al., 1996). In diesem Fall des Therapieversagens erfolgt eine Steigerung der Erhaltungsdosis, zumeist auf 200 µg. Die Schutzwirkung wird infolgedessen deutlich verbessert (Ruëff et al., 2001).

2.5.3.4 Prädiktoren des Therapieergebnisses

Während die SIT bei der WG-Allergie bei erneutem Stichereignis eine Protektion in 90 - 95 % der Fälle bewirkt, zeigen sich BG-Allergiker infolge der Therapie lediglich in 80 - 84 % der Fälle vor einer erneuten systemischen Reaktion geschützt (Bilo et al., 2009). Bereits in der Vergangenheit wurden mögliche Risikofaktoren für ein Therapieversagen diskutiert, z.B. das Vorliegen einer Mastozytose. Die tatsächliche

Bedeutung bezüglich eines erhöhten Therapieversagens war unbekannt. In einer 2014 veröffentlichten Studie mit einer Fallzahl von > 1500 BG- und WG-allergischen Patienten konnte mit Hilfe des Ergebnisses der Stichprovokation nach leitliniengerechter Durchführung der SIT gezeigt werden, dass eine zugrunde liegende Mastozytose mit einer Odds Ratio (OR) von 2,74 mit einem erhöhten Therapieversagen vergesellschaftet ist. Daneben zeigte sich ein erhöhtes Risiko für ein Therapieversagen, wenn Patienten mit einem ACE-Inhibitor behandelt wurden (OR 5,24) und sich während der Immuntherapie bereits eine systemische Stichreaktion ereignete (OR 3,07). Des Weiteren zeigte sich die SIT mit BG gegenüber der mit WG unterlegen (OR 5,09). Den Therapieerfolg begünstigende Faktoren wurden mit einer längeren Dauer der Erhaltungsphase vor der Stichprovokation (OR 0,68), bei indizierter Durchführung einer Doppel-SIT gegen BG und WG (OR 0,51) und einer erhöhten Giftdosis von 200 µg (OR 0,58) beschrieben (Ruëff et al., 2014).

2.6 Diagnostik

Die Diagnostik ist grundlegend für eine zielgerichtete Therapie und gründet auf drei Säulen. Allen voran geht eine ausführliche Anamnese, gefolgt von einer Hauttestung und einer labordiagnostischen Bestimmung von spezifischen IgE-Antikörpern (sIgE-Antikörper). Zielführend ist, nachdem die Stichreaktion des Patienten klassifiziert und das individuelle Anaphylaxierisiko ermittelt wurde, eine konklusive Diagnostik, welche Anamnese, Hautreaktion und sIgE-Bestimmung miteinander vereinbart und so eine individuelle Therapie eingeleitet werden kann (Przybilla et al., 2011). Hinzu kommt eine Hautinspektion, um eine bislang nicht diagnostizierte Mastozytose zu erkennen, welche, wie beschrieben, ein erhöhtes Anaphylaxierisiko birgt (Ruëff et al., 2014). Es wird empfohlen, die Diagnostik innerhalb einer Woche und wiederholend vier bis sechs Wochen nach dem Stich- und Anaphylaxieereignis durchzuführen. Dieses zweizeitige Vorgehen erfasst eine Sensibilisierung sensitiver als eine einmalige Untersuchung (Goldberg und Confino-Cohen, 1997).

2.6.1 Anamnese

Eine Vielzahl entscheidender Faktoren sind bei der Anamnese zu erheben: die Anzahl der bis dato stattgefundenen Stiche, die jeweils darauf folgende Symptomatik

und der zeitliche Ablauf der Stichreaktionen, außerdem welche Umstände vorlagen und welches Insekt mutmaßlich verantwortlich ist. Des Weiteren müssen individuelle Risikofaktoren für eine erneute Reaktion und für das Auftreten einer schweren anaphylaktischen Reaktion abgeklärt werden (Przybilla et al., 2011). Ein besonders hoher Stellenwert kommt dabei der sicheren Angabe des allergieauslösenden Insektes zu. Die Differenzierung zwischen Biene und Wespe fällt jedoch häufig trotz visueller Vorlage von Fotos beider Insektenentitäten und der Anamnese der Umstände zum Zeitpunkt des Stiches (Tabelle 2) schwer. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit 95 Allergologen und 134 nicht-allergologisch tätigen Erwachsenen testete die Fähigkeit der Probanden, ein Insekt durch Bildvorgabe und mittels Vorlage getrockneter Insekten in einer Box zu erkennen. Die Wespe wurde auf der Bildvorlage von 86 % der Allergologen und 72 % der Nicht-Allergologen richtig erkannt, die Identifikation über die Box wurde in beiden Gruppen nur in etwa 60 % richtig wiedergegeben. Über 90 % der Probanden beider Gruppen erkannten die Biene auf der Bildvorlage, die Identifikation des getrockneten Insektes fiel ungleich schwerer: weniger als 50 % der Nicht-Allergologen, aber auch der Allergologen, identifizierten das getrocknete Bienenmodell korrekt (Baker et al., 2016).

Biene	Wespe
Eher "friedlich" (außer am Bienenstock)	Eher "aggressiv"
Flugzeit vor allem Frühjahr bis Spätsommer (auch an warmen Wintertagen!)	Flugzeit vor allem Sommer bis Spätherbst
Stachel bleibt nach Stich meist in der Haut zurück	Stachel bleibt nach Stich meist nicht in der Haut zurück
Vorkommen vor allem in der Nähe von Bienenstöcken, Blüten und Klee	Vorkommen vor allem in der Nähe von Speisen oder Abfall

Tabelle 2: Differenzierungsmöglichkeit zwischen Bienen und Wespen aufgrund unterschiedlicher Merkmale (Przybilla et al., 2011).

2.6.2 Hauttest

Zur Hauttestung werden BG und WG, sowie Positiv- und Negativkontrollen verwendet, um eine Sensibilisierung gegen das betreffende Hymenoptergift nachzuweisen. Durchgeführt wird ein Pricktest mit steigenden Giftkonzentrationen zwischen 1,0 und 100 µg/ml, ggf. bis hin zu 300 µg/ml. Bei ausbleibender Pricktestreaktion folgt ein Intrakutantest mit einer Konzentration von 1,0 µg/ml. Der Intrakutantest wird teilweise in Kliniken primär anstelle des Pricktests durchgeführt,

dann in steigenden Konzentrationen von 0,001 bis 1,0 µg/ml. Bei Bedarf werden analog andere Hymenopterenengifte geprüft (Przybilla et al., 2011).

2.6.3 In-vitro-Testung

Die Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAKI) empfiehlt aktuell zur Insektengiftallergie-Diagnostik die Bestimmung von IgE-Antikörpern gegen die Gesamtextrakte BG (i1) und WG (i3) zum Nachweis einer Sensibilisierung. Ergänzend wird die Tryptase im Serum bestimmt, um das Vorliegen einer indolenten Mastozytose zu prüfen (Przybilla et al., 2011). Der IgE-Antikörper-Test wird als „positiv“ bewertet, sobald eine Antikörperkonzentration $\geq 0,35$ kU_A/l gemessen wird. Bei korrelierender Anamnese, Hauttestung und Antikörperbestimmung ist eine eindeutige Diagnosestellung möglich und damit die Indikationsstellung einer individuellen SIT gegeben. Bei Unsicherheiten empfiehlt die Leitlinie, neben der Wiederholung der Hauttestung, eine Bestimmung der sIgE-Antikörper gegen in den Insektengift-Gesamtextrakten enthaltene Einzelallergene. Routinemäßig angewendet werden aktuell Api m 1 (Majorallergen im BG), sowie Ves v 1 und Ves v 5 (Majorallergene im WG), um zwischen einer genuinen Bienen- oder WG-Allergie unterscheiden zu können (Przybilla et al., 2011). Während die WG-Marker Ves v 1 und Ves v 5 eine Sensitivität > 95 % besitzen und damit eine WG-Allergie zuverlässig zu diagnostizieren vermögen, ist diese durch die Bestimmung von Api m 1 bei BG-allergischen Patienten deutlich schwächer: verschiedene Studien zeigten eine Sensitivität von Api m 1 zwischen 58 und 80 % (Hofmann et al., 2011, Müller et al., 2012, Korosec et al., 2011, Köhler et al., 2014). Weiter wird die eindeutige Diagnosestellung der individuell vorliegenden Insektengiftallergie gegen BG oder WG, bzw. das Vorliegen einer genuinen Doppelsensibilisierung, aufgrund von Kreuzreaktivitäten beider Insektengiftallergene erschwert. Diese Problematik wird unter einem eigenen Punkt im Folgenden behandelt. Ein zusätzlicher Schritt zum Erhalt einer eindeutigen Diagnosestellung liegt in Untersuchungen auf zellulärer Ebene: mit dem Basophilenaktivierungstest, dem Leukotrienfreisetzungstest und dem Histaminfreisetzungstest können allergische und hypersensitive Reaktionen nachgewiesen werden (Spillner et al., 2014). Diese Tests sind aufgrund ihrer Komplexität jedoch spezialisierten allergologischen Zentren vorbehalten.

2.7 Molekulare Allergiediagnostik

Bis vor kurzer Zeit waren nur wenige Hauptkomponenten der Hymenoptereingifte bekannt. Innerhalb der letzten Jahre konnten jedoch bedeutsame Erkenntnisse bezüglich des Wissens über die molekularen Grundlagen der Hymenoptereingifte verzeichnet werden. Moderne Expressionssysteme und die strategische Erforschung des Proteoms haben die Identifizierung und Charakterisierung einer Vielzahl weiterer Einzelallergene erlaubt. Der Fokus wurde entsprechend, ausgehend vom kruden Gesamtextrakt, hin zu den molekularen Grundbestandteilen der Hymenoptereingifte, den Einzelallergenen, verfeinert. Aufgrund der nicht in allen Fällen möglichen exakten Diagnosestellung anhand der Hauttestung und der labordiagnostischen Ergebnisse der Gesamtextraktbestimmung kommt der Bestimmung der Reaktivität gegen die im Gesamtextrakt enthaltenen Einzelallergene eine bedeutende Rolle zu (Spillner et al., 2014).

2.7.1 Hymenoptereingift-Einzelallergene

Die Entschlüsselung der BG- und WG-Gesamtextrakte zeigt eine Vielzahl verschiedener Einzelelemente, welchen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden konnte (Tabelle 3). Das aktuell zur Diagnostik verwendete Majorallergen Api m 1, eine Phospholipase, nimmt 12 % des Trockengewichts des BG-Gesamtextraktes ein. Daneben bilden Melittin (Api m 4) und die Hyaluronidase Api m 2 mit 50 % und 2 % Anteil am Trockengewicht die prominentesten Bestandteile des BG (Spillner et al., 2014). Proteomische Analysen zeigen jedoch, dass gesamthaft > 100 Einzelkomponenten im BG enthalten sind (Van Vaerenbergh et al., 2014). Zu ihnen gehören mit Api m 3, einer sauren Phosphatase, der Dipeptidylpeptidase Api m 5 und Api m 10 (Icarapin) klinisch bedeutsame Einzelallergene, deren Bedeutsamkeit im nächsten Abschnitt ausführlich erläutert wird. Die Hauptbestandteile des WG sind die beiden zur Diagnostik verwendeten Phospholipase Ves v 1 und Ves v 5 (Antigen 5), sowie die Hyaluronidase Ves v 2 (Spillner et al., 2014).

Allergen	Name / Funktion	Molekulargewicht (kDa)	Trockengewicht (%)	N-Glykosylierungen (Potentielle CCD)
Bienengift (<i>Apis mellifera</i>)				
Api m 1	Phospholipase A2	17	12	1
Api m 2	Hyaluronidase	45	2	3
Api m 3	Saure Phosphatase	49	1 - 2	2
Api m 4	Melittin	3	50	0
Api m 5	Allergen C/DPP ¹ IV	100	< 1	6
Api m 6	Proteaseinhibitor	8	1 - 2	0
Api m 7	Protease	39	?	3
Api m 8	Carboxylesterase	70	?	4
Api m 9	Carboxypeptidase	60	?	4
Api m 10	CRP ² / Icarapin	55	< 1	2
Api m 11.0101	MRJP ³ 8	65	?	6
Api m 11.0201	MRJP 9	60	?	3
Api m 12	Vitellogenin	200	?	1
Wespengift (<i>Vespa vulgaris</i>)				
Ves v 1	Phospholipase A1	35	6 - 14	0
Ves v 2.0101	Hyaluronidase	45	1 - 3	4
Ves v 2.0201	Hyaluronidase ⁴	45	?	2
Ves v 3	DPP IV	100	?	6
Ves v 5	Antigen 5	25	5 - 10	0
Ves v 6	Vitellogenin	200	?	4

Tabelle 3: Aktuell bekannte Einzelallergene im BG und WG (Spillner et al., 2014).

2.7.2 Sensibilisierungsprofile bei Bienengift-Allergikern

In einem Kollektiv von 144 BG-allergischen Patienten konnte nachgewiesen werden, dass einige der beschriebenen, in den letzten wenigen Jahren entdeckten Einzelallergene, eine bedeutende Sensibilisierungsrate aufweisen. Eine IgE-Reaktivität $\geq 0,35$ kU_A/l gegen Api m 1 konnte bei 72,2 % der BG-Allergiker gemessen werden. Während gegen Api m 2 bei 47,9 % und gegen Api m 4 bei 22,9 % der Patienten eine Messung $\geq 0,35$ kU_A/l dokumentiert wurde, zeigten ≥ 50 % der Patienten eine Sensibilisierung gegen die Einzelallergene Api m 3, Api m 5 und Api m 10 (jeweils 50 % / 58,3 % / 61,8 %). Api m 3, Api m 5 und Api m 10 konnten entsprechend als Majorallergene neben Api m 1 identifiziert werden. Eine Sensibilisierung gegen Api m 3 und / oder Api m 10 lag bei 68 % der Patienten vor.

¹ Dipeptidylpeptidase

² Carbohydrate-rich protein

³ Major royal jelly protein

⁴ inaktive Isoform

Bei 5 % des Kollektivs zeigte sich gar lediglich eine Sensibilisierung gegen Api m 3 und / oder Api m 10, während bei diesen Patienten gegen die übrigen Allergene keine Sensibilisierung detektierbar war (Köhler et al., 2014).

Diese Ergebnisse waren von ganz besonderem Interesse, weil von Api m 3 und Api m 10 bereits berichtet worden war, dass sie in therapeutischen Extrakten unterrepräsentiert sind oder gänzlich fehlen (Blank et al., 2011).

2.7.3 Kreuzreaktivität

Die Diagnostik mit Gesamtextrakten ist aufgrund von IgE-Kreuzreaktivitäten innerhalb der Hymenopteringifte behindert, insbesondere zwischen BG und WG. So ist eine Differenzierung zwischen einer genuinen Doppelsensibilisierung gegen beide Gifte und einer IgE-Reaktivität gegen eines der beiden Gifte aufgrund einer Kreuzreaktivität in vielen Fällen deutlich erschwert. In der klinischen Testung zeigen bis zu 50 % der Patienten doppelt-positive Befunde gegen BG und WG (Egner et al., 1998, Hoffman et al., 1980). Ob nun eine genuine Doppelsensibilisierung oder eine Kreuzreaktivität vorliegt, kann nicht in allen Fällen konklusiv beurteilt werden. Diese Kreuzreaktivitäten gründen zum einen auf einer IgE-Reaktivität bedingt durch homologe Einzelallergene, die im BG und WG gemeinsam vorkommen. Homologe Peptidsequenzen findet man in beiden Giften bei den Hyaluronidasen Api m 2 und Ves v 2, den Dipeptidylpeptidasen Api m 5 und Ves v 3, sowie den Vitellogeninen Api m 12 und Ves v 6. Zum anderen besteht eine IgE-Kreuzreaktivität aufgrund kreuzreagierender Kohlenhydratseitenketten, sog. CCD (cross-reactive carbohydrate determinants) (Aalberse et al., 2001). Dieses CCD-Epitop ist ein alpha-1,3-Fucose-Rest an der Kohlenhydratkernstruktur. Weil diese Glykanstruktur im menschlichen Kohlenhydratmuster nicht vorkommt, ist sie hoch immunoreaktiv und provoziert die Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern. CCD-spezifische Antikörper werden für beinahe 75 % der Doppelsensibilisierungen gegen BG und WG verantwortlich gemacht (Jappe et al., 2006). Während diese Reaktivität klinisch irrelevant zu sein scheint, d.h. aufgrund einer CCD-Kreuzreaktivität keine Symptomatik zu erwarten ist, ist die Diagnostik infolge dessen umso mehr in ihrer Aussagekraft eingeschränkt und der Zugang zu einer indizierten SIT wird erheblich behindert (Ollert und Blank, 2015).

3 Fragestellungen

Die vorgelegte Studie wurde von den folgenden Fragestellungen geleitet:

- An einem monozentrischen Kollektiv (n = 144), bestehend aus Patienten mit einer BG-Allergie, konnten wir in Vorarbeiten zeigen, dass neben Api m 1 auch andere Einzelallergene, insbesondere Api m 3 und Api m 10, als Majorallergene im BG vorliegen. Kann dieses Sensibilisierungsmuster an einem multizentrischen Kollektiv (n = 115) bestätigt werden?
- Die Wirkung der SIT beruht auf einer kontrollierten Giftzufuhr, welche eine Hyposensibilisierung bewirkt. Von Api m 3 und Api m 10 wurde berichtet, dass sie in therapeutischen Extrakten unterrepräsentiert sind oder fehlen. Zudem konnten wir in Vorarbeiten aufzeigen, dass Patienten nach durchgeführter SIT eine deutliche sIgG4-Induktion gegen rApi m 1, rApi m 2 und nApi m 4 aufweisen, jedoch nicht oder nur sehr gering gegen rApi m 3 und rApi m 10. Zeigen sich im Vergleich von Therapieansprechern und Therapieversagern der SIT unterschiedliche sIgE-Reaktivitäten gegen rApi m 3 und rApi m 10?
- Bei der vorhergehenden Untersuchung des Vorkommens von Api m 3 und Api m 10 in therapeutischen Extrakten wurden rekombinant hergestellte, isolierte, monoklonale Antikörper eingesetzt. Bestätigt die hier vorliegende Untersuchung mittels spezifischer, polyklonaler Antiseren, dass Api m 3 und Api m 10 in therapeutischen Extrakten unterrepräsentiert sind?
- Haben Patienten mit rApi m 3- oder rApi m 10-Sensibilisierung ein höheres Risiko für ein Therapieversagen der SIT?
- Die BG-Allergiediagnostik weist im Rahmen der Bestimmung von sIgE gegen rApi m 1 eine deutliche diagnostische Lücke auf (Sensitivität 58 – 80 %). Von ganz besonderem Interesse ist die Verbesserung der Sensitivität bei Patienten, die das allergieauslösende Stechinsekt nicht identifizierten und gleichzeitig eine Doppelpositivität gegen BG und WG aufweisen. Dies birgt eine große diagnostische und folglich weitreichende therapeutische Unsicherheit. Kann die Sensitivität der BG-Diagnostik durch Bestimmung von weiteren Einzelallergenen verbessert werden? Wird die Differenzierung zwischen einer genuinen und einer auf Kreuzreaktivität beruhenden Doppelsensibilisierung gegen BG und WG verbessert? Können Patienten einer BG-SIT zugeführt werden, die sie ohne Bestimmung nicht erhalten hätten?

4 Methodik und Patienten

4.1 Patientenkollektive

In dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Patientenkollektive untersucht, um die aufgeworfenen Fragen beantworten zu können.

Als erstes wurde im Rahmen einer multizentrischen, retrospektiven Studie ein Gesamtkollektiv BG-allergischer Patienten analysiert, welches mittels der im Verlauf der SIT durchgeführten Stichprovokation in die Subkollektive Therapieversager, d.h. erneutes Auftreten einer systemischen Reaktion bei der Stichprovokation, und Therapieansprecher, d.h. problemlos vertragene Stichprovokation, unterteilt wurde. Infolge der Aufteilung in Therapieversager und Therapieansprecher sind im Vergleich der beiden Subgruppen gegebenenfalls Sensibilisierungsprofile differenzierbar, welche ein Therapieversagen begünstigen.

In einem weiteren Schritt wurde ein Gesamtkollektiv BG- und WG-sensibilisierter Patienten, welche zur Diagnosestellung ihrer individuellen Insektengiftallergie klinisch in der Universitätsklinik Freiburg vorstellig wurden, zur Bearbeitung der Frage nach einer verbesserten BG-Allergiediagnostik untersucht.

4.1.1 Therapieansprecher und Therapieversager

Beim untersuchten Kollektiv wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie Seren von 115 Patienten mit einer BG-Allergie eingeschlossen, welche eine klinisch kontrollierte Stichprovokation nach mindestens sechs Monate durchgeführter SIT mit Applikation einer monatlichen Dosis von 100 µg BG erhalten hatten. Alle Zentren hatten den Auftrag, Therapieansprecher und Therapieversager in einem Verhältnis von 2:1 einzuschließen. Primärer Endpunkt war, ob bei der Stichprovokation eine systemische Reaktion auftrat oder ob diese problemlos, d.h. ohne Auftreten einer systemischen Reaktion, toleriert wurde. Infolge dessen erfolgte die Einteilung des Gesamtkollektives in Therapieansprecher (n = 79), welche die Stichprovokation problemlos tolerierten, und Therapieversager (n = 36), bei welchen eine erneute systemische Reaktion infolge des Stiches zu beobachten war. Die Studie erfolgte in einem retrospektiven Design, zur labordiagnostischen Auswertung wurden die Seren der 115 Patienten verwendet, welche im Zeitraum zwischen August 1993 und November 2013 in 5 verschiedenen klinischen Zentren in Deutschland (Gießen,

Hannover, München, Tübingen) und in der Schweiz (Bern), in denen die Stichprovokation jeweils routinemäßig durchgeführt wird, gesammelt und bei minus 20 Grad gelagert wurden. Die Stichprovokationen wurden zwischen April 1998 und Januar 2015 durchgeführt. Notwendiges Einschlusskriterium war das Vorliegen einer Serumprobe vor Beginn der SIT und das protokollierte Ergebnis der durchgeführten Stichprovokation, daneben nach Möglichkeit das Vorliegen einer Serumprobe während der SIT bzw. vor der Stichprovokation. Die Diagnose der BG-Allergie basierte auf der Anamnese einer systemischen Reaktion infolge eines Bienenstiches, einer positiven Hauttestung und eines sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt (ImmunoCAP i1) $\geq 0,35$ kU_A/l. Es erfolgte die Erhebung folgender Daten durch Aktenstudie: Anamnese und Grad der systemischen Reaktion infolge des Indexstiches, klassifiziert nach Schweregraden von I bis IV (Ring und Messmer, 1977), Ergebnisse der Hauttestung und serologische Tryptasewerte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Zeitpunkt und Durchführungsprotokoll der Einleitung der SIT, Auftreten von systemischen Reaktionen während der SIT, verwendetes Therapeutikum, Erhaltungsdosis der SIT, Dauer der SIT vor Durchführung der Stichprovokation, Protokoll der Stichprovokation, insbesondere die Symptome bei Auftreten einer systemischen Reaktion infolge des diagnostischen Bienenstiches, Vorliegen einer Doppel-SIT gegen BG und WG, sowie das Vorliegen einer antihypertensiven Behandlung zum Zeitpunkt der Stichprovokation. Es erfolgte jeweils bei den Serumproben vor Beginn der SIT und vor Durchführung der Stichprovokation, d.h. nach einer Mindestdauer von 6 Monaten SIT, die labordiagnostische Bestimmung des sIgE und des sIgG4 gegen folgende BG-Allergene (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden):

- BG-Gesamtextrakt (kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i1)
- rApi m 1 (kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i208)
- rApi m 3 (Forschungs-ImmunoCAP i403)
- rApi m 10 (unter dessen kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i410).

Zusätzlich erfolgte bei den Seren vor SIT-Beginn die Bestimmung des Gesamt-IgE und des sIgE gegen:

- rApi m 2 (Forschungs-ImmunoCAP i213)
- rApi m 5 (Forschungs-ImmunoCAP i405).

Das sIgE gegen rApi m 2 (Forschungs-ImmunoCAP i213) wurde auch vor Durchführung der Stichprovokation gemessen.

4.1.2 Kollektiv bienengift- und wespengiftsensibilisierter Patienten

Beim in der Studie untersuchten Kollektiv wurden 755 Seren von Patienten mit eindeutiger Anamnese einer Hymenopterenngiftallergie eingeschlossen, welche im Zeitraum zwischen 2010 und 2015 in der Allergie-Abteilung der Universitätsklinik Freiburg i. Br. gesammelt und bei minus 20° C gelagert wurden. Die Diagnose einer Hymenopterenngiftallergie wurde basierend auf der Anamnese einer systemischen Reaktion infolge eines Insektenstiches mit Hilfe einer Klassifikation nach Schweregrad von I bis IV (Ring und Messmer, 1977), der Hauttestung und der labordiagnostischen Bestimmung des sIgE gegen kommerziell erhältliche ImmunoCAP-Tests und zusätzlich Forschungs-ImmunoCAP-Tests (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden) gestellt:

- BG-Gesamtextrakt (kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i1)
- WG-Gesamtextrakt (kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i3)
- rApi m 1 (kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i208)
- rApi m 2 (Forschungs-ImmunoCAP i213)
- rApi m 3 (Forschungs-ImmunoCAP i403)
- nApi m 4 (Forschungs-ImmunoCAP i214)
- rApi m 5 (Forschungs-ImmunoCAP i405)
- rApi m 10 (unter dessen kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i410)
- rVes v 1 (kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i211)
- rVes v 5 (kommerziell erhältlicher ImmunoCAP i209).

Anhand der Gesamtheit der Laborparameter wurde die individuelle Sensibilisierung des Patienten festgestellt und ein Vergleich angeführt, inwiefern die Bestimmung zusätzlicher Einzelallergene die Diagnostik und folglich die Therapieauswahl verbessert.

4.2 Messmethoden

Die Quantifizierung der sIgE- und sIgG4-Antikörper gegen die Gesamtextrakte, die Insektengift-Einzelallergene und das Gesamt-IgE erfolgte mit Hilfe des Messgerätes Phadia 250 (Thermo Fisher, Freiburg i.Br.). Grundlage der Labormessung ist ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA). Beim hierbei verwendeten ImmunoCAP-System liegt das spezifische Allergen in einer kovalenten Bindung zu einer Festphase vor, welche aus einem aktivierten, hydrophilisierten Polymer

(Cellulosederivat) besteht. In einem ersten Schritt werden 40 µl Patienten-Serum in das Teströhrchen pipettiert. Das an die Festphase gebundene Allergen bindet nun die spezifischen Patienten-Antikörper. Im Anschluss daran wird der Überstand abgetragen und ein Waschschrift durchgeführt, um die unspezifischen Antikörper zu entfernen. Daraufhin wird ein Enzym-markierter Antikörper, der an das Enzym β -Galactosidase gebunden ist, hinzugefügt (ImmunoCAP Specific IgE bzw. IgG4 Conjugate), was zu einer Komplexbildung mit den Patienten-Antikörpern führt. Es folgt eine Inkubationsphase, welche wiederum mit einem Waschschrift abgeschlossen wird, um nicht-gebundenes Enzym-markiertes Anti-IgE /-IgG4 zu entfernen. Der Komplex wird dann mit einem Entwicklerreagenz inkubiert (ImmunoCAP Development Solution), welches Methylumbelliferyl- β -D-Galactosidase enthält. Als letzter Schritt folgt das Abstoppen der Reaktion (ImmunoCAP Stop Solution).

Das an den Enzym-markierten Antikörper gebundene Enzym β -Galactosidase transformiert die im Folgeschritt hinzugefügte Methylumbelliferyl- β -D-Galactosidase in das fluoreszierende 4-Methylumbilliferon. Die Intensität der später bestimmten Fluoreszenz ist von der Konzentration des produzierten 4-Methylumbilliferon abhängig und korreliert entsprechend mit dem Serum-IgE des Patienten. Anhand einer Standardkurve wird die ermittelte Signalstärke in eine mit kU_A/l bezeichnete Aktivität berechnet. Es wird eine quantitative Angabe der Resultate von 0,1 kU_A/l bis 100 kU_A/l wiedergegeben. Als positiv gelten Werte, welche über dem Cut-off von $\geq 0,35 kU_A/l$ liegen. Bei diesem Cut-off wird die Sensitivität, im Rahmen von multizentrischen Studien geprüft, mit 84 – 95 %, die Spezifität mit 85 – 94 % bezeichnet.

4.2.1 Gesamtextrakte und Einzelallergene

Alle Allergene wurden in kommerziell erhältlichen und experimentellen ImmunoCAP-Tests (Phadia AB, Uppsala, Schweden) zur Testung verwendet. Die Gesamtextrakte BG und WG wurden aus dem kruden Giftextrakt gewonnen. Die rekombinant hergestellten Allergene Api m 1, Api m 2, Api m 3 und Api m 5 wurden von immortalisierten Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* (SF9), Api m 10 bakteriell durch *E. coli* exprimiert. SF9-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie keine CCD synthetisieren und folglich die rekombinant hergestellten Einzelallergene CCD-frei

sind, weil SF9-Zellen den alpha-1,3-Fucose-Rest an der Kohlenhydratkernstruktur nicht bilden. Das prokaryotisch-rekombinant gewonnene Api m 10 wird nicht-glykosyliert hergestellt, so dass keine Kreuzreaktivitäten auftreten. Das native Api m 4 wurde aus dem BG-Gesamtextrakt chromatographisch aufgereinigt und besitzt nativ keine potentiellen N-Glykosylierungen. Die Messung des Gesamt-IgE und die Bestimmung des sIgE gegen die Gesamtextrakte und Einzelallergene wurden mit unverdünntem Patientenserum durchgeführt. Bei der Bestimmung des sIgG4 wurde gemäß Herstellerempfehlung eine Verdünnung der Patientenseren durchgeführt: das sIgG4 gegen BG und Api m 1 wurde mit einer Verdünnung von 1:100, gegen Api m 3 mit einer Verdünnung von 1:20 und gegen Api m 10 mit einer Verdünnung von 1:5 durchgeführt.

4.2.2 Herstellung der Antiseren

Zur Immunisierung von Kaninchen wurden von unseren Kollaborationspartnern in Aarhus rekombinant hergestellte Api m 1, Api m 3 und Api m 10 nach etablierten Protokollen verwendet. Die Immunreaktivität und Spezifität der resultierenden Antiseren wurden mittels ELISA durch rekombinante BG-Allergene geprüft. Gereinigte, rekombinante Api m 1, Api m 2, Api m 3, Api m 5 und Api m 10 (10 µg/ml) wurden auf einer 384 Nüpfchen fassenden Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) bei 4° C über Nacht gekoppelt und mit 40 mg/ml Milchpulver in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) geblockt. Anschließend wurden die Antiseren 1:5000 bis 1:20000 mit 2 % Milchpulver in TBS (Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-gepufferte Salzlösung) verdünnt, in einem finalen Volumen von 50 µl in die korrespondierenden Nüpfchen verteilt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T (Phosphatgepufferte Salzlösung Tween 20) und PBS wurden mit alkalischer Phosphatase konjugierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper, welche 1:30000 in 20 mg/ml Milchpulver in PBS verdünnt wurden, für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt. Die Signalmessung wurde nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS-T und PBS und darauf folgendem Zusatz von 50 µl Substratlösung durchgeführt.

4.2.3 Immunoblot-Analysen

Das BG-Gesamtextrakt wurde von Latoxan (Valence, Frankreich) und Entomon (Florenz, Italien) geliefert. Es wurden folgende therapeutische Extrakte untersucht: Pharmalgen (ALK-Abelló), Alyostal Venin (Stallergenes), Aquagen (ALK-Abelló), Venomhal (HAL Allergy) und Venomil (Allergy Therapeutics). Für das Immunoblot-Verfahren wurden sowohl das Gesamtextrakt als auch die therapeutischen Extrakte zu einer Standardkonzentration von 1 mg/ml gelöst. Für die Bestimmung von Api m 1, Api m 3 und Api m 10 wurden Mengen von 5 µl unter Reduktions-Bedingungen in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mittels Criterion XT Bis-Tris Gels und MES Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) (Biorad, München) aufgetrennt und im Tank-Blotting-Verfahren in Towbin Puffer auf Nitrocellulose-Membranen (Roth, Karlsruhe) übertragen. Die Membranen wurden mit 4 % Milchpulver in TBS-Puffer geblockt. Die allergenspezifischen Seren wurden 1:5000 bis 1:50000 mit 2 % Milchpulver in TBS verdünnt und auf die korrespondierenden Membranen appliziert. Die Visualisierung des gebundenen sIgG wurde mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Kaninchen-IgG von Ziegen (Sigma-Aldrich, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:20000 in 2 % Milchpulver in TBS und Nitroblautetrazoliumchlorid / X-Phosphat (Sigma-Aldrich, Hamburg) gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt.

4.3 Datenverarbeitung

Die Datenverarbeitung erfolgte mit tabellarischer Bearbeitung in Microsoft Excel 2010. Die statistische Analyse und die graphische Darstellung wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Bei sIgE-Werten, die unter dem Detektionslimit von 0,10 kU_A/l lagen, wurde statistisch und graphisch folgendermaßen vorgegangen: sIgE-Werte < 0,10 kU_A/l wurden für die statistische Bearbeitung auf 0,10 kU_A/l gesetzt und die Fallzahl der betroffenen Seren graphisch gesammelt unter < 0,10 kU_A/l bezeichnet. Beim sIgG4 wurde die beschriebene Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) von 89 ± 22 µg_A/l verwendet (Armbruster und Pry, 2008), entsprechend wurden gemäß des LOD von BG und Api m 1 Werte < 0,1 mg_A/l für die statistische Analyse auf 0,1 mg/l gesetzt und zur graphischen Darstellung getrennt unter < 0,10 mg_A/l bezeichnet. Aufgrund der unterschiedlichen Verdünnung ergaben sich für Api m 3 und Api m 10 davon abweichende Nachweisgrenzen von 0,02 mg_A/l und 0,01 mg_A/l, das Vorgehen war dasselbe.

4.3.1 Statistische Messmethoden

Für unabhängige Stichproben wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test benutzt. Gepaarte Daten wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test statistisch analysiert. Die Berechnung der OR wurde anhand von Kontingenztafeln mit dem exakten Test nach Fisher durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant bewertet. Die Berechnung der Sensitivität, Spezifität, positive (PLR) und negative (NLR) Likelihood-Ratio ($PLR = \text{Sensitivität} / (1 - \text{Spezifität})$; $NLR = (1 - \text{Sensitivität}) / \text{Spezifität}$), ROC-Kurve (receiver operating characteristic) und Fläche unterhalb der ROC-Kurve (AUC) wurde durch SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 22.0.0.0, Ehningen) und die Statistiksoftware Environment R durchgeführt. Der Youden-Index wurde im Rahmen der Interpretation der ROC-Kurven zur Bestimmung des am besten geeigneten Schwellenwertes bei der Unterscheidung der Therapieansprecher und Therapieversager verwendet.

4.4 Darstellung

Beim Vergleich der sIgE-Absolutwerte wurden zwei Grenzmarkierungen angegeben: Die Markierung von $0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$ gibt den WHO-Grenzwert für eine Sensibilisierung gegen ein Allergen wieder. Die Kennzeichnung $0,10 \text{ kU}_A/\text{l}$ ist gemäß Herstellerangaben die sichere Nachweisgrenze für eine Sensibilisierung, bei welcher zwischen spezifischer Bindung und unspezifischer IgE-Reaktivität unterschieden werden kann. Die folgenden Graphiken wurden mit der unteren Nachweisgrenze von $0,10 \text{ kU}_A/\text{l}$ bezeichnet.

Bei der Analyse und graphischen Darstellung der Ratio des sIgE gegen die Einzelallergene im Verhältnis zum sIgE gegen das Gesamtextrakt bzw. zum Gesamt-IgE wurde das arithmetische Mittel verwendet. Bei den Absolutwerten des sIgE wurde aufgrund der ausgeprägten Verteilung das geometrische Mittel angewendet.

Bei der Darstellung des sIgG4 wurden Boxplots benutzt, die Box repräsentiert die 25. und die 50. Perzentile, innerhalb der Box ist das geometrische Mittel bezeichnet, die vertikalen Linien geben die 5. und 95. Perzentile wieder, die Punkte zeigen die Ausreißer an.

5 Ergebnisse

5.1 Therapieansprecher und Therapieversager

Der Erfolg der BG-SIT ist im Vergleich zu dem der WG-SIT deutlich geringer (BG-SIT 80 – 84 % vs. WG-SIT 90 – 95 %). Patienten haben ein entsprechend höheres Risiko für ein Therapieversagen bei der BG-SIT. Unsere Vorarbeiten ergaben, dass ein breites Spektrum an Sensibilisierungen vorliegt. Neben Api m 1 wurden weitere Majorallergene im BG identifiziert. Von diesen sind Api m 3 und Api m 10 von ganz besonderem Interesse. Es wurde berichtet, dass sie in therapeutischen Extrakten unterrepräsentiert sind oder gänzlich fehlen. Die Hyposensibilisierung basiert jedoch auf der Applikation der allergieauslösenden Substanz, um den Organismus desensibilisieren zu können. Dieser Teil der Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, ob die zusätzlich beschriebenen Majorallergene in einem multizentrischen Kollektiv (n = 115) bestätigt werden können. Im Weiteren wird untersucht, ob sich im Vergleich von Therapieansprechern und Therapieversagern der SIT unterschiedliche sIgE-Reaktivitäten gegen rApi m 3 und rApi m 10 zeigen. Die Frage soll beantwortet werden, ob die Unterrepräsentanz von Api m 3 und Api m 10 in den therapeutischen Extrakten durch den Einsatz spezifischer, polyklonaler Antiseren bestätigt werden kann. Schlussendlich soll geklärt werden, ob Patienten mit Api m 3- oder Api m 10-Sensibilisierung ein höheres Risiko für ein Therapieversagen der SIT aufweisen?

5.1.1 Demographische und klinische Daten

Mit Hilfe der Krankengeschichte wurden die demographischen und klinischen Daten gesammelt (Tabelle 4), dabei wurden die von Ruëff et al. beschriebenen Prädiktoren für ein Therapieversagen der BG-SIT berücksichtigt. Im Vergleich der Gruppen ergab sich kein Unterschied bezüglich der einzelnen Faktoren. Insbesondere bei den beschriebenen Prädiktoren der ACE-Inhibitor-Einnahme und der SIT-Dauer vor Stichprovokation konnte kein Unterschied beobachtet werden.

Variable	Therapieansprecher	Therapieversager
Alter, Ø in Jahren (Spannweite)	40,1 (10 – 77)	41,4 (10 – 65)
Geschlecht, weiblich (♀) / männlich (♂) in %	♀ 41,8 / ♂ 58,2	♀ 42,5 / ♂ 57,5
Gesamt-IgE, Ø in kU _A /l (Spannweite)	329,5 (2 – 9360)	245,6 (8 – 3525)
Grad der systemischen Stichreaktion Grad I – IV (Ring und Messmer, 1977) in n (%)	I: 13 (16,5) II: 49 (62,0) III: 16 (20,3) IV: 1 (1,3)	I: 2 (5,5) II: 22 (61,1) III: 11 (30,5) IV: 1 (2,7)
Tryptase > 20 µg/l oder MIS in n (%)	4/79 (5,1)	1/36 (2,8)
Doppel-SIT mit BG & WG in n (%)	21/79 (26,0)	7/36 (19,4)
Antihypertensive Therapie in n (%)	10/79 (6,3)	3/36 (8,3)
ACE-Inhibitor-Einnahme in n (%)	1/79 (1,3)	0/36 (0)
SIT-Dauer vor Stichprovokation, Ø in Monaten (Spannweite)	31,4 (7 – 127)	37,3 (7 – 90)

Tabelle 4: Demographische und klinische Daten der Therapieansprecher (n = 79) und Therapieversager (n = 36).

5.1.2 Sensibilisierungsprofil vor Beginn der spezifischen Immuntherapie

Das gesamte Kollektiv zeigte per definitionem eine Sensibilisierung, d.h. sIgE \geq 0,35 kU_A/l, gegen das BG-Gesamtextrakt, daneben gegen rApi m 1 in 81,7 %, gegen rApi m 2 in 52,2 %, gegen rApi m 3 in 49,6 %, gegen rApi m 5 in 61,7 % und gegen rApi m 10 in 72,2 % der Fälle. Das sIgE lag im geometrischen Mittel gegen BG bei 9,58 kU_A/l, gegen rApi m 1 bei 2,13 kU_A/l, gegen rApi m 2 bei 0,33 kU_A/l, gegen rApi m 3 bei 0,43 kU_A/l, gegen rApi m 5 bei 0,55 kU_A/l und gegen rApi m 10 bei 1,07 kU_A/l (Abbildung 1).

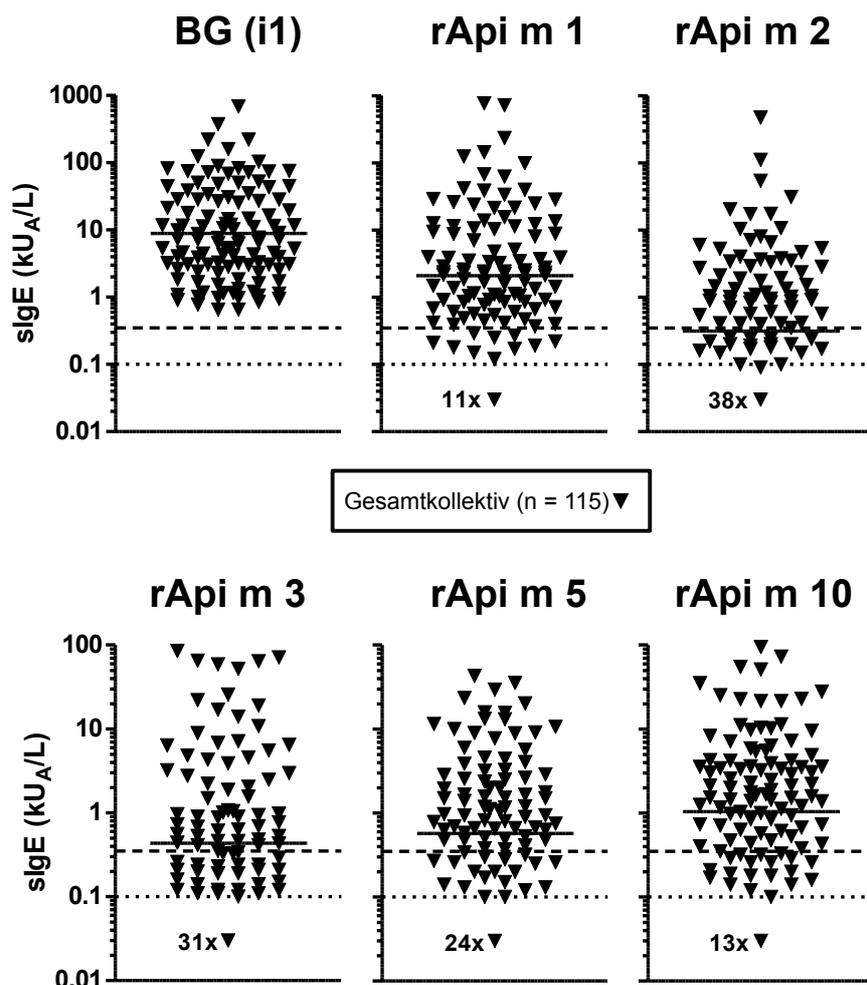


Abbildung 1: Verteilung der sIgE-Reaktivitäten gegen BG, rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5 und rApi m 10 beim Gesamtkollektiv ($n = 115$) vor Beginn der SIT. Der durchgezogene Strich zeigt das geometrische Mittel an. Die gestrichelte Linie gibt die Grenze $0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$, die gepunktete Linie die Grenze $0,10 \text{ kU}_A/\text{l}$ an. Die Anzahl der Seren mit sIgE-Werten $< 0,10 \text{ kU}_A/\text{l}$ wurden jeweils gesammelt unter der Linie von $0,10 \text{ kU}_A/\text{l}$ bezeichnet.

5.1.3 Gruppenvergleich der sIgE-Reaktivitäten gegen Einzelallergene

In einem ersten Schritt wurden sIgE-Reaktivitäten gegen die Einzelallergene innerhalb der Gruppe der Therapieansprecher und innerhalb der Gruppe der Therapieversager getrennt aufgetragen und geprüft, ob ein Unterschied zwischen den Subgruppen detektierbar ist. Die labordiagnostischen Messungen und die gegenüberstellende Datenbearbeitung erfolgte zu zwei Zeitpunkten: zum einen anhand der Seren vor Beginn der SIT (Therapieansprecher $n = 79$, Therapieversager $n = 36$), zum anderen mit denjenigen Seren, welche nach mindestens 6 Monate durchgeführter SIT mit Erhaltungsdosis von $100 \mu\text{g}$ BG vor der Stichprovokation vorlagen (Therapieansprecher $n = 74$, Therapieversager $n = 35$). Aufgrund fehlender

ImmunoCAP-Ressourcen konnte keine Überprüfung des rApi m 5 vor der Stichprovokation erfolgen.

5.1.3.1 Einzelallergene vor Beginn der spezifischen Immuntherapie

Bei der Untersuchung der Einzelallergene vor der SIT zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen betreffend der sIgE-Reaktivitäten gegen rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 und rApi m 5. Ein diskreter Unterschied konnte beim BG-Gesamtextrakt beobachtet werden. Während das geometrische Mittel des sIgE gegen BG bei den Therapieansprecher bei 8,24 kU_A/l lag, war es bei den Therapieversager bei 13,36 kU_A/l. Ein moderater, jedoch deutlicherer und signifikanter Unterschied ergab sich bei der Betrachtung des rApi m 10. Während das geometrische Mittel in der Gruppe der Therapieansprecher bei 0,93 kU_A/l lag, war es in der Gruppe der Therapieversager mit 2,56 kU_A/l 2,75-fach höher. Deutlich wird, dass bei allen Einzelallergenen eine große Spannweite der Verteilungsmuster vorliegt (Abbildung 2).

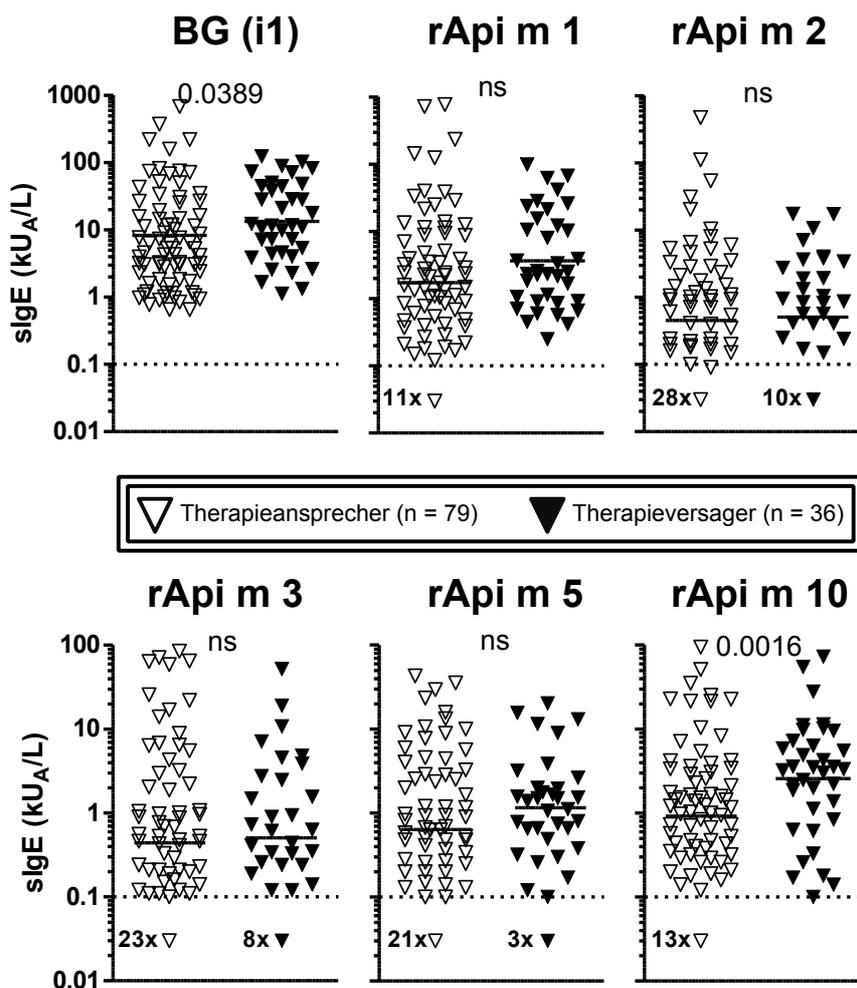


Abbildung 2: sgE-Reaktivitäten gegen BG, rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5 und rApi m 10 vor Beginn der SIT im Gruppenvergleich: die Klassifizierung in Therapieansprecher (n = 79) und Therapieversager (n = 36) basierte auf der Abwesenheit oder des Auftretens einer systemisch allergischen Reaktion im Rahmen der Stichprovokation nach mindestens 6 Monaten SIT. Der durchgezogene Strich zeigt das geometrische Mittel an. Die Anzahl der Seren mit sgE-Werten < 0,10 kUA/l wurden jeweils gesammelt unter der gepunkteten Linie von 0,10 kUA/l bezeichnet.

5.1.3.2 Einzelallergene vor der Stichprovokation

Im Vergleich der sgE-Reaktivitäten vor der Stichprovokation zeigte sich wiederum kein Unterschied im Gruppenvergleich bei rApi m 2 und rApi m 3. Ein geringer Unterschied ergab sich für die Reaktivität gegen BG und rApi m 1, bei diesen war das geometrische Mittel in der Therapieversager-Gruppe mit 7,01 kUA/l und 2,15 kUA/l gegenüber der Reaktivität innerhalb der Therapieansprecher-Gruppe mit 4,04 kUA/l und 1,05 kUA/l erhöht. Der deutlichste Unterschied ergab sich erneut für die Reaktivität gegen rApi m 10: mit einem geometrischen Mittel von 1,27 kUA/l bei den Therapieversager war die Reaktivität gegenüber 0,57 kUA/l bei den Therapieansprechern signifikant höher (Abbildung 3).

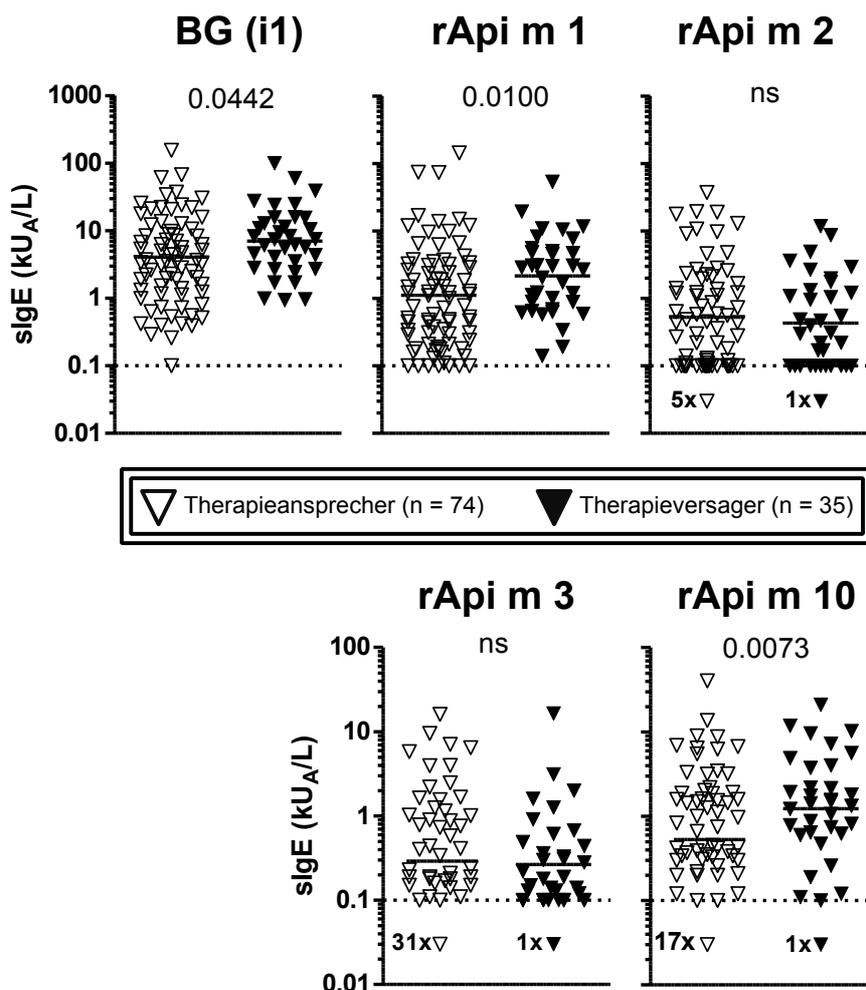


Abbildung 3: sgE-Reaktivitäten gegen BG, rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 und rApi m 10 vor der Stichprovokation im Gruppenvergleich: bei der Mehrheit der Patienten konnten Seren nach einer SIT von mindestens 6 Monaten Dauer untersucht werden (Therapieansprecher n = 74, Therapieversager n = 35). Der durchgezogene Strich zeigt das geometrische Mittel an. Die Anzahl der Seren mit sgE-Werten < 0,10 kUA/l wurden jeweils gesammelt unter der gepunkteten Linie von 0,10 kUA/l bezeichnet.

5.1.4 Ratio sgE gegen Einzelallergene im Verhältnis zum sgE gegen Gesamtextrakt Bienengift

In einem nächsten Schritt wurden nicht die Absolutwerte des sgE gegen die jeweiligen Einzelallergene, sondern das jeweilige Verhältnis des sgE gegen das Einzelallergen zum sgE gegen das BG-Gesamtextrakt im Gruppenvergleich betrachtet, d.h. der Prozentsatz des sgE gegen das Einzelallergen am sgE gegen das BG-Gesamtextrakt. Dieser Ansatz basiert auf folgender Rationale: vergleicht man lediglich die Absolutwerte, so wird dem möglicherweise entscheidenden Fakt nicht Rechnung getragen, dass ein Patient zwar eventuell ein nur gering- oder mäßiggradig erhöhtes sgE gegen ein Einzelallergen aufweist, bei allerdings vergleichsweise niedrigem sgE gegen das BG-Gesamtextrakt dieses Einzelallergen

de facto eine große Ratio aufweist und entsprechend eine entscheidende Rolle bezüglich des allergischen Potentials spielen kann (Abbildung 4). Des Weiteren wird durch die Analyse der Ratio dem Fakt Beachtung geschenkt, dass durch die bloße Betrachtung der absoluten Höhe der sIgE-Reaktivität kein Rückschluss auf das Ausmaß der allergischen Reaktion gewonnen werden kann (Köhler et al., 2014).

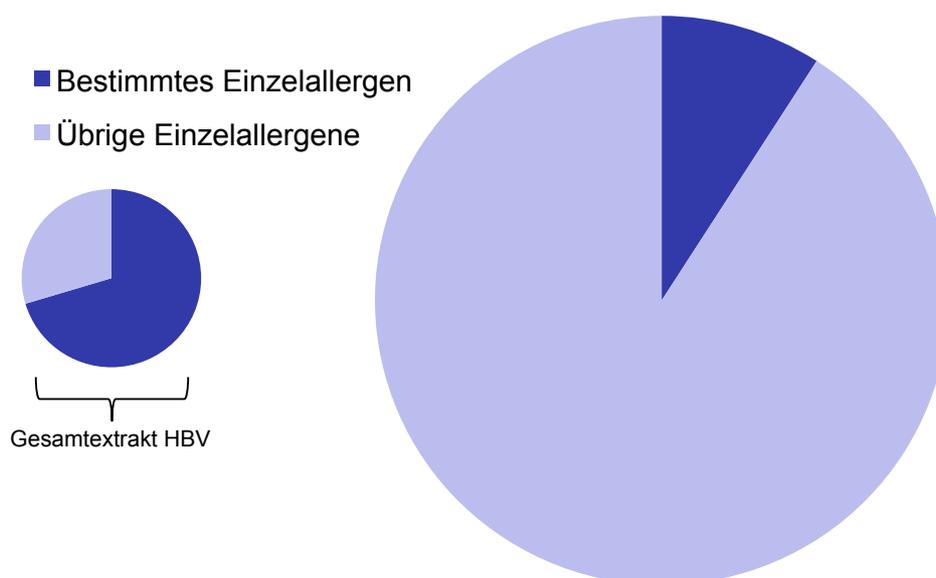


Abbildung 4: Prozentuale Darstellung des sIgE gegen das Einzelallergen im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt. Während im linken Kreisdiagramm ein bestimmtes Einzelallergen bei verhältnismäßig kleinem sIgE gegen das Gesamtextrakt einen dominanten prozentualen Anteil einnimmt, zeigt sich im rechten Kreisdiagramm ein anderes Bild: zwar ist der direkte Vergleich mit dem bestimmten Einzelallergen des linken Kreisdiagramms ähnlich, der prozentuale Anteil am Gesamtextrakt hingegen ist deutlich geringer.

5.1.4.1 Ratio vor Beginn der spezifischen Immuntherapie

Berechnet man nun dieses Verhältnis des individuellen Einzelallergens zum BG-Gesamtextrakt zeigt sich bei der Betrachtung der beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ratio des sIgE gegen rApi m 1, rApi m 2 und rApi m 5 im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt vor Beginn der SIT. Beim rApi m 3 konnte in der Gruppe der Therapieansprecher ein im Vergleich etwas größerer Prozentanteil am Gesamtextrakt beobachtet werden (Therapieansprecher 12,3 % vs. Therapieversager 8,5 %). Hinsichtlich der Ratio des sIgE gegen rApi m 10 zum sIgE gegen BG zeigte jedoch wiederum die Gruppe der Therapieversager einen signifikant höheren prozentualen Anteil: während der Anteil des rApi m 10 im arithmetischen Mittel in der Gruppe der Therapieansprecher 17,6 % betrug, nahm er in der Gruppe der Therapieversager mit 33,2 % nahezu doppelt so viel ein. Auffällig

ist, dass in der Gruppe der Therapieansprecher das Serum mit dem maximalen prozentualen Anteil des rApi m 10 bei 52 % lag, hingegen 25 % (9/36) Seren der Therapieversager diesen Wert überschritten (Abbildung 5).

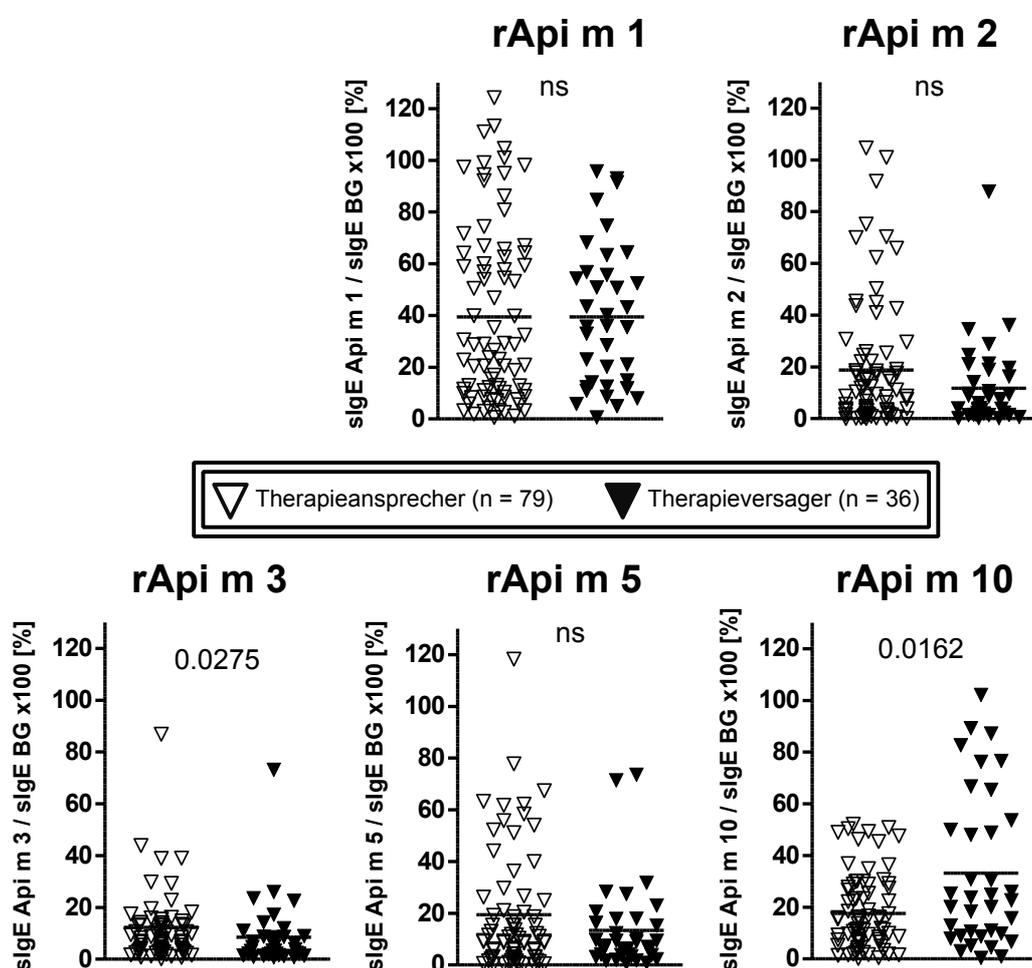


Abbildung 5: Prozentualer Anteil des sIgE gegen individuelle Einzelallergene im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt im Gruppenvergleich der Therapieansprecher (n = 79) und Therapieversager (n = 36) vor Beginn der SIT. Der durchgezogene Strich gibt das arithmetische Mittel an.

5.1.4.2 Ratio vor der Stichprovokation

In der Gruppe der Therapieansprecher zeigten 3 der 74 Seren, welche nach einer mindestens 6 Monate durchgeführten SIT verfügbar waren, ein sIgE gegen BG < 0,35 kU_A/l, es hatte eine Serokonversion in einen „negativen“ Bereich unter durchgeführter SIT stattgefunden. Diese 3 Seren fanden keine Beachtung bei der Ermittlung der Ratio vor der Stichprovokation, so dass in der Gruppe der Therapieansprecher entsprechend eine Fallzahl von 71 vorlag. Bei den Therapieversagern zeigten sich alle gemessenen BG-IgE-Werte nach der

durchgeführten SIT positiv, die Fallzahl blieb entsprechend bei den 35 verfügbaren Seren. Die Berechnung des sIgE-Anteils des individuellen Einzelallergens im Verhältnis zum sIgE gegen BG zeigte bei rApi m 1, rApi m 2 und rApi m 3 wiederum einen ausgeglichenen Vergleich der Therapieansprecher und Therapieversager. Einzig beim rApi m 10 stellte sich erneut eine höhere Ratio am Gesamtextrakt heraus, welche bei den Therapieansprechern bei 18,1 % und bei den Therapieversagern wiederum erhöht bei 30,1 % lag (Abbildung 6).

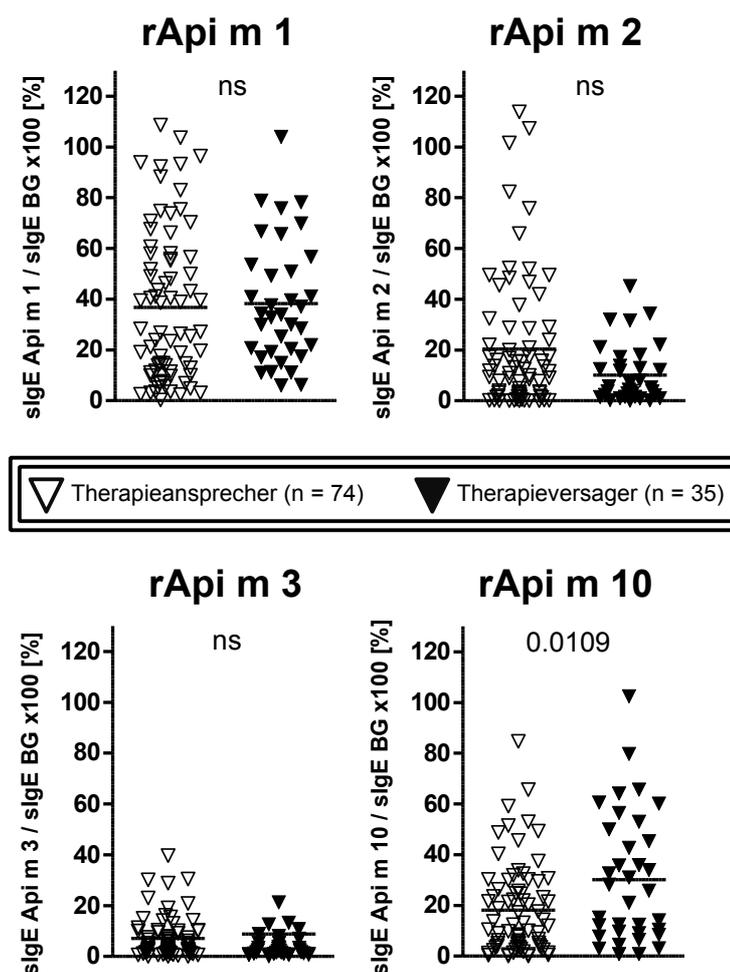


Abbildung 6: Prozentualer Anteil des sIgE gegen individuelle Einzelallergene im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt im Gruppenvergleich der Therapieansprecher (n = 71) und Therapieversager (n = 35) vor der Stichprovokation nach mindestens 6 Monaten SIT. Der durchgezogene Strich gibt das arithmetische Mittel an.

5.1.5 Ratio des sIgE gegen Einzelallergene im Verhältnis zum Gesamt-IgE

Die Großzahl der Seren ließen die Berechnung der Ratio des sIgE gegen die individuellen Einzelallergene im Verhältnis zum Gesamt-IgE vor Beginn der SIT zu (Therapieansprecher n = 74, Therapieversager n = 33), von wenigen konnten die

Gesamt-IgE-Werte nicht eruiert und entsprechend die Seren für die Ratioberechnung nicht berücksichtigt werden. Die Gegenüberstellung des sIgE gegen die jeweiligen Einzelallergene im Verhältnis zum Gesamt-IgE zeigte erneut, dass ein moderater, aber signifikanter Unterschied bei größerem Anteil des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum Gesamt-IgE in der Gruppe der Therapieversager vorlag. Der Anteil betrug in der Gruppe der Therapieansprecher 2,7 %, in der Gruppe der Therapieversager war er mit 5,4 % doppelt so hoch. Bei den übrigen Einzelallergenen konnte kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden (Abbildung 7).

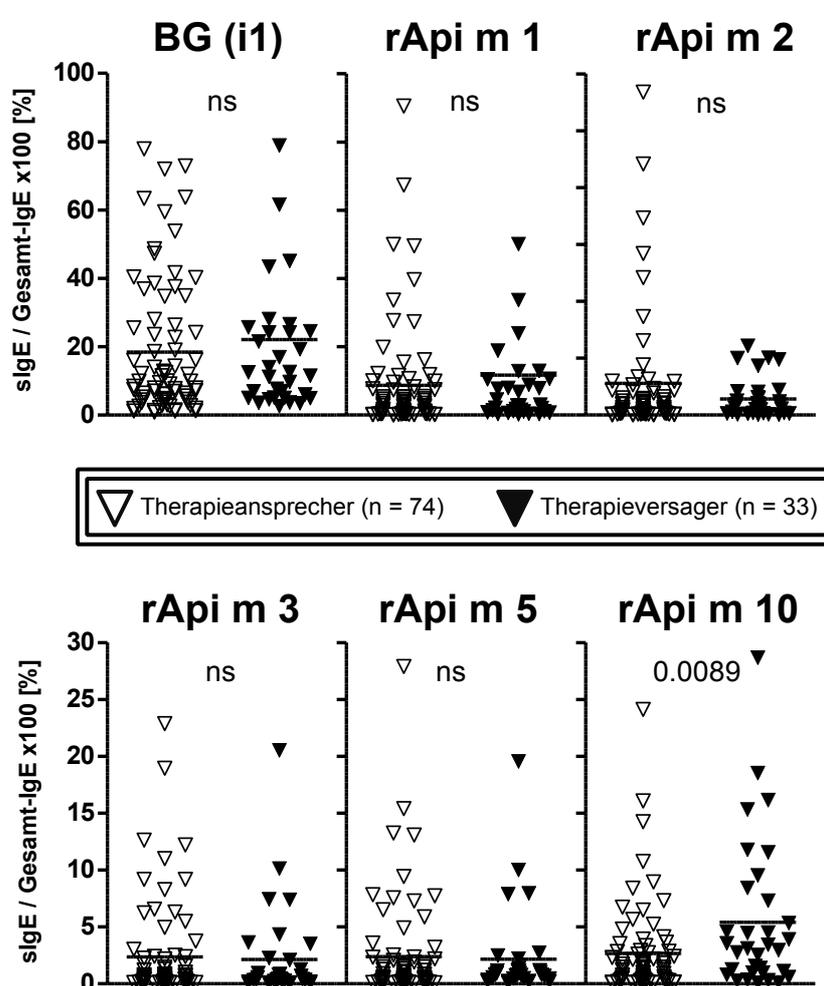


Abbildung 7: Prozentualer Anteil des sIgE gegen individuelle Einzelallergene im Verhältnis zum Gesamt-IgE im Gruppenvergleich der Therapieansprecher (n = 74) und Therapieversager (n = 33) vor Beginn der SIT. Der durchgezogene Strich gibt das arithmetische Mittel an.

5.1.6 ROC-Kurven

Die Ratio des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt hatte gezeigt, dass in der Gruppe der Therapieversager der prozentuale Anteil signifikant höher lag. Insbesondere ab einem prozentualen Anteil von 50 %, einem dominanten rApi m 10-Anteil entsprechend, hatte sich ein deutlicher Gruppenunterschied gezeigt: während 3/79 (3,8 %) der Therapieansprecher einen Anteil ≥ 50 % aufwiesen, zeigten 9/36 (25 %) der Therapieversager einen dominanten rApi m 10-Anteil. Aufgrund der signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich der Therapieansprecher und Therapieversager bezüglich der rApi m 10-Auswertungen wurden ROC-Kurven angefertigt, um die Sensitivität und Spezifität der Testergebnisse darstellen zu können.

5.1.6.1 sIgE gegen rApi m 10

Bei der Analyse der ROC-Kurve des sIgE gegen rApi m 10 zeigte sich eine AUC von 0,687 mit einem P-Wert von 0,001. Die beste Diskriminierung zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern, d.h. der höchste Youden-Index, lag bei einem sIgE gegen rApi m 10 von 1,82 kU_A/l mit einer Spezifität von 70,9 % (95 %-KI 56,0 % - 85,7 %) und einer Sensitivität von 69,4 % (95 %-KI 54,4 % - 84,5 %) vor. Die PLR betrug 2,39, die NLR wurde mit 0,43 berechnet. Der Cut-off der WHO von $\geq 0,35$ kU_A/l erbrachte eine Spezifität von 34,2% (95 %-KI 18,7 % - 49,7 %), eine Sensitivität von 83,3 % (95 %-KI 71,2 % - 95,5 %), eine PLR von 1,27 und eine NLR von 0,49. Ein sIgE gegen rApi m 10 in einer Höhe von 26,55 kU_A/l zeigte eine Spezifität von 95 % (95 %-KI 90,0 % - 100 %), eine Sensitivität von 8,3 % (95 %-KI 0 % - 17,4 %), eine PLR von 2,19 und eine NLR von 0,95 (Abbildung 8).

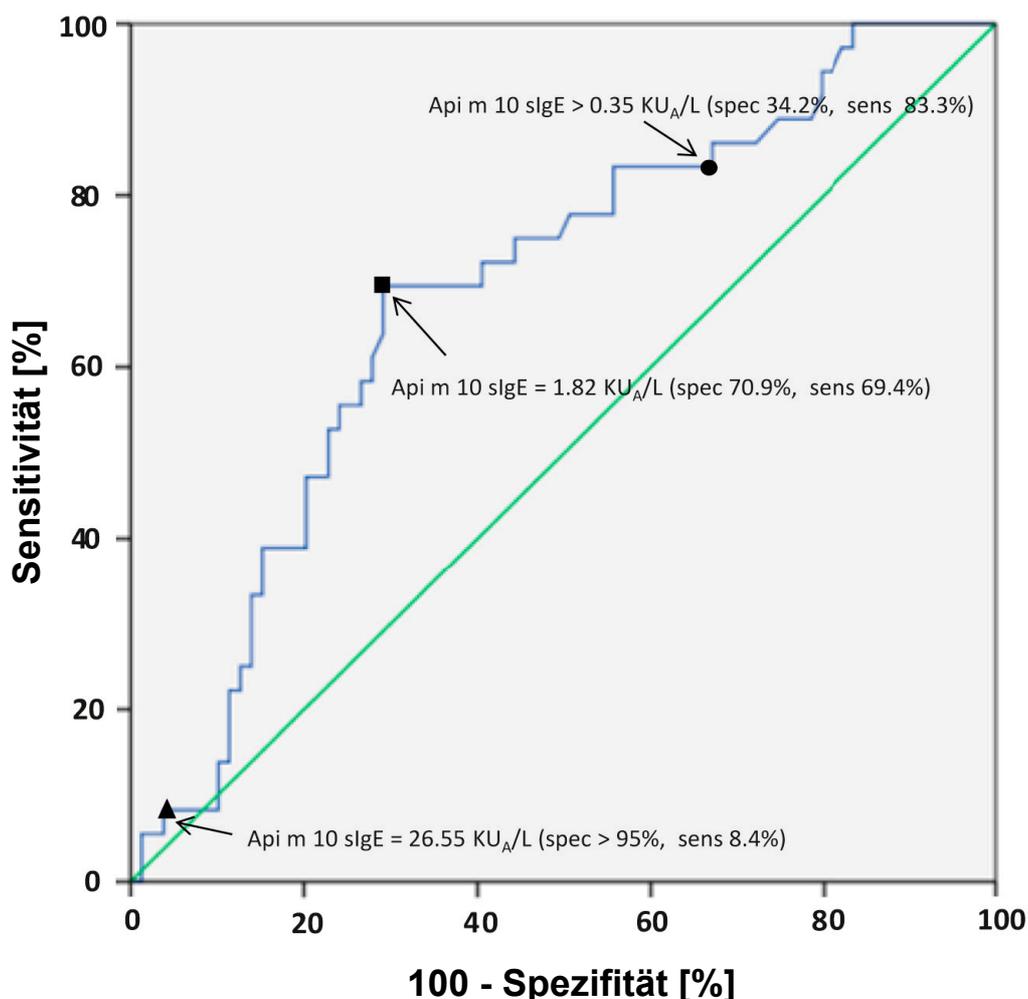


Abbildung 8: ROC-Analyse des slgE gegen rApi m 10. Angegeben sind die Quote der wahr positiven Testergebnisse (Sensitivität) mit Gegenüberstellung der Quote der falsch-positiven Testergebnisse (Spezifität) für verschiedene Cut-off-Punkte. Der schwarze Punkt gibt den WHO-Grenzwert des slgE von 0,35 KU_A/L wieder. Das schwarze Quadrat bezeichnet den Youden-Index, das schwarze Dreieck zeigt die rApi m 10-Höhe, bei der eine Spezifität von > 95 % erreicht ist. spec = Spezifität; sens = Sensitivität.

5.1.6.2 Ratio slgE gegen rApi m 10 / slgE gegen Bienengift-Gesamtextrakt

Bei der Analyse der ROC-Kurve des prozentualen Anteils des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt zeigte sich eine AUC von 0,667 mit einem P-Wert von 0,004. Die beste Diskriminierung zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern, d.h. der höchste Youden-Index, lag bei einer Ratio des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt von 47,7 % mit einer Spezifität von 93,7 % (95 %-KI 85,7 % - 100 %) und einer Sensitivität von 33,3 % (95 %-KI 17,9 % - 48,7 %) vor. Die PLR betrug 5,28, die NLR wurde mit 0,71 berechnet. Bei einem prozentualen Anteil ≥ 50 % des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt zeigte der Test eine Spezifität von 96,2 % (95 %-KI 90,0 % - 100 %) und eine Sensitivität

von 25,0 % (95 %-KI 10,9 % - 39,1 %) mit einer PLR von 6,58 und einer NLR von 0,78 (Abbildung 9).

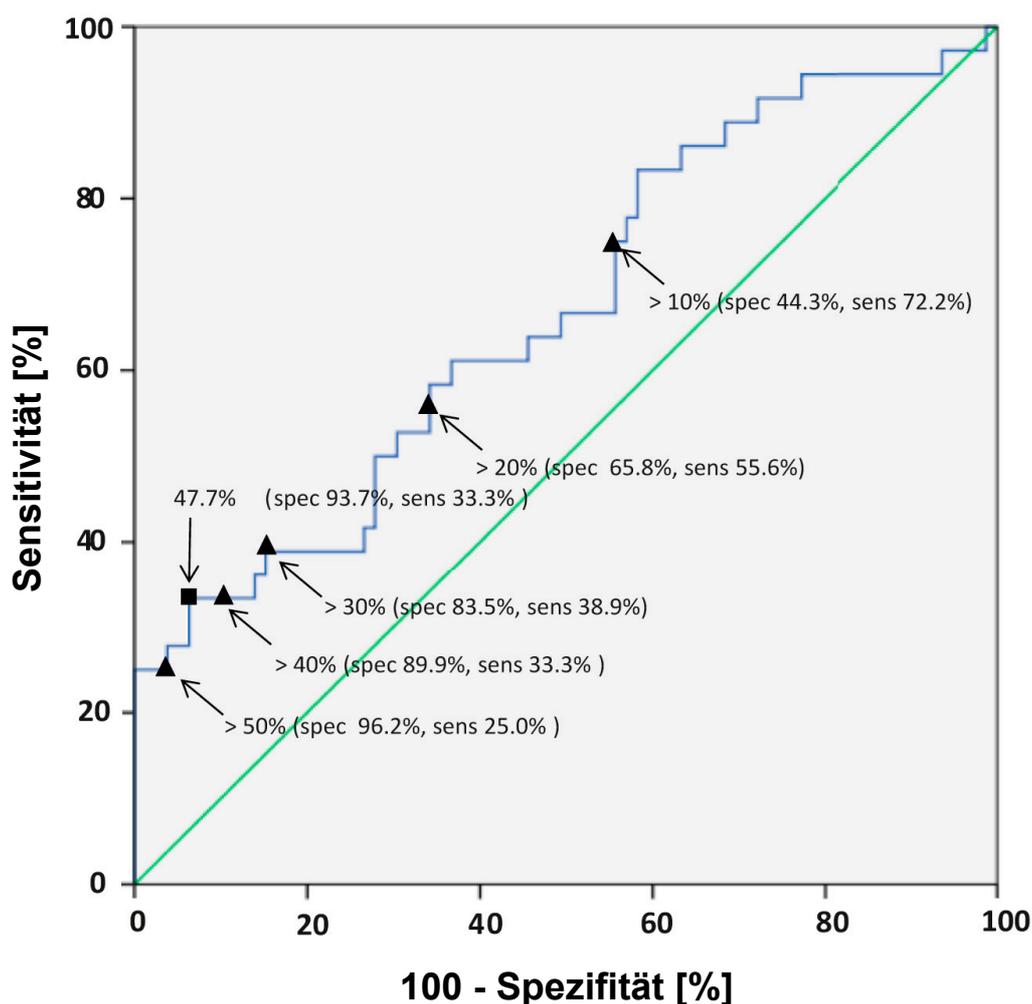


Abbildung 9: ROC-Analyse des prozentualen Anteils des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt. Das schwarze Quadrat bezeichnet den Youden-Index, die schwarzen Dreiecke zeigen die Spezifität (spec) und Sensitivität (sens) bei verschiedenen prozentualen Anteilen des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt an.

5.1.6.3 Ratio slgE gegen rApi m 10 / Gesamt-IgE

Bei der Analyse der ROC-Kurve des prozentualen Anteils des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum Gesamt-IgE zeigte sich eine AUC von 0,659 mit einem P-Wert von 0,009. Die beste Diskriminierung zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern, d.h. der höchste Youden-Index, lag bei einer Ratio des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum Gesamt-IgE von 2,9 % mit einer Spezifität von 77,3 % und einer Sensitivität von 54,5 % vor. (Abbildung 10).

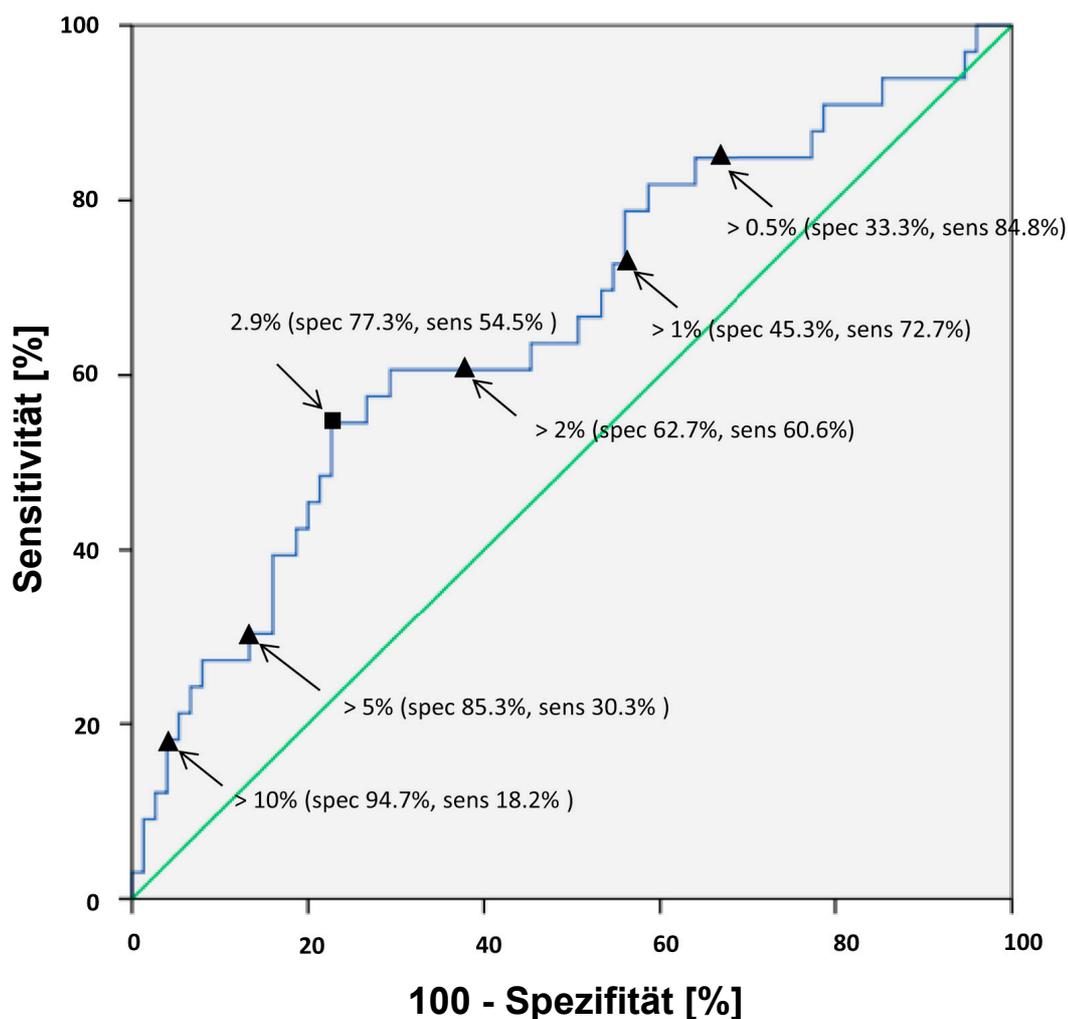


Abbildung 10: ROC-Analyse des prozentualen Anteils des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum Gesamt-IgE. Das schwarze Quadrat bezeichnet den Youden-Index, die schwarzen Dreiecke zeigen die Spezifität (spec) und Sensitivität (sens) bei verschiedenen prozentualen Anteilen des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum Gesamt-IgE an.

5.1.7 Odds Ratio für ein Therapieversagen

Die Ergebnisse der ROC-Kurven deuteten an, dass Patienten mit einem dominierenden rApi m 10-Anteil ein höheres Risiko für ein Versagen der BG-SIT aufweisen. Um diese Beziehung analysieren zu können, wurde mittels Erstellung von Kontingenztafeln die OR für ein Therapieversagen berechnet.

5.1.7.1 Kontingenztafeln vor Beginn der spezifischen Immuntherapie

Zur Analyse der Beziehung zwischen dem prozentualen Anteil der Einzelallergene im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt wurden Kontingenztafeln in festgelegter Abstufung von 10 %-Schritten des sIgE-Anteils angefertigt, um die OR für ein Therapieversagen berechnen zu können. Wie die graphische Verteilung

bereits vermuten ließ, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Therapieansprecher und Therapieversager bezüglich rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 und rApi m 5. Beim rApi m 10 zeigte sich erneut ein anderes, die vorhergehenden Ergebnisse bestätigendes Bild: Tatsächlich ließ sich bei steigendem Antikörperanteil gegen rApi m 10 im Verhältnis zum BG-Gesamtextrakt eine steigende OR für ein Therapieversagen verzeichnen (Abbildung 11). Erwähnenswert ist, dass lediglich in der Gruppe der Therapieversager Patienten mit einem Anteil $\geq 60\%$ ($n = 8$; 22,2 %) vertreten waren (Tabelle 5).

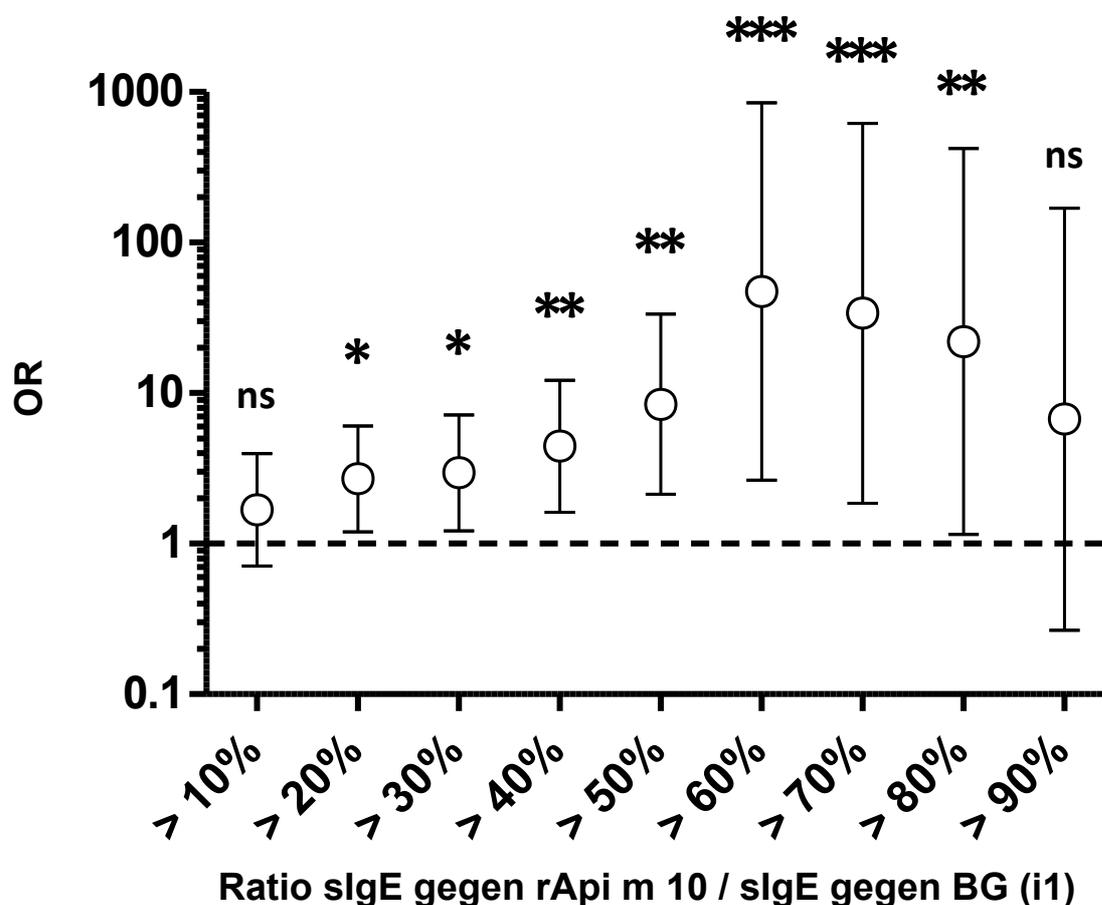


Abbildung 11: Berechnete OR für verschiedene prozentuale Anteile des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt bei BG-allergischen Patienten vor Beginn der SIT (Therapieansprecher $n = 79$, Therapieversager $n = 36$). Der Kreis gibt jeweils die OR wieder, die vertikalen Striche mit horizontaler Begrenzung das 95 %-Konfidenzintervall, die Sterne die Signifikanz bemessen am jeweiligen P-Wert.

Ratio: slgE rApi m 1 / slgE BG	TA⁵ (n)	TV⁶ (n)	OR	95 %-KI'	P-Wert
> 10 %	60/79	31/36	1,963	0,669 – 5,762	ns
> 20 %	48/79	25/36	1,468	0,633 – 3,403	ns
> 30 %	36/79	21/36	1,672	0,754 – 3,711	ns
> 40 %	31/79	17/36	1,385	0,625 – 3,069	ns
> 50 %	30/79	14/36	1,039	0,463 – 2,336	ns
> 60 %	22/79	8/36	0,740	0,293 – 1,871	ns
> 70 %	15/79	5/36	0,688	0,229 – 2,066	ns
> 80 %	13/79	4/36	0,635	0,192 – 2,102	ns
> 90 %	11/79	3/36	0,544	0,147 – 2,153	ns
Ratio: slgE rApi m 2 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	38/79	12/36	0,539	0,237 – 1,227	ns
> 20 %	21/79	7/36	0,667	0,254 – 1,750	ns
> 30 %	15/79	3/36	0,388	0,105 – 1,436	ns
> 40 %	14/79	1/36	0,133	0,017 – 1,052	0,0347
> 50 %	9/79	1/36	0,222	0,027 – 1,826	ns
> 60 %	8/79	1/36	0,254	0,030 – 2,109	ns
> 70 %	5/79	1/36	0,423	0,048 – 3,759	ns
> 80 %	3/79	1/36	0,724	0,073 – 7,211	ns
> 90 %	3/79	0/36	0,299	0,015 – 5,954	ns
Ratio: slgE rApi m 3 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	31/79	8/36	0,442	0,179 – 1,095	ns
> 20 %	8/79	4/36	1,109	0,311 – 3,954	ns
> 30 %	5/79	1/36	0,423	0,048 – 3,759	ns
> 40 %	3/79	1/36	0,724	0,073 – 7,211	ns
> 50 %	2/79	1/36	1,10	0,096 – 12,55	ns
> 60 %	2/79	1/36	1,10	0,096 – 12,55	ns
> 70 %	2/79	1/36	1,10	0,096 – 12,55	ns
> 80 %	2/79	0/36	0,425	0,019 – 9,080	ns
> 90 %	1/79	0/36	0,717	0,028 – 18,04	ns

⁵ Therapieansprecher

⁶ Therapieversager

Ratio: slgE rApi m 5 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	38/79	13/36	0,609	0,271 – 1,372	ns
> 20 %	21/79	7/36	0,667	0,254 – 1,750	ns
> 30 %	15/79	3/36	0,388	0,105 – 1,436	ns
> 40 %	13/79	2/36	0,299	0,064 – 1,401	ns
> 50 %	12/79	2/36	0,328	0,069 – 1,552	ns
> 60 %	7/79	2/36	0,605	0,119 – 3,069	ns
> 70 %	3/79	2/36	1,490	0,238 – 9,334	ns
> 80 %	2/79	0/36	0,425	0,019 – 9,080	ns
> 90 %	2/79	0/36	0,425	0,019 – 9,080	ns
Ratio: slgE rApi m 10 / slgE BG					
Ratio: slgE rApi m 10 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	48/79	26/36	1.679	0,712 – 3,960	ns
> 20 %	27/79	21/36	2.696	1,200 – 6,059	0.0242
> 30 %	14/79	14/36	2.955	1,220 – 7,157	0.0194
> 40 %	8/79	12/36	4.438	1,620 – 12,15	0.0064
> 50 %	3/79	9/36	8.444	2,127 – 33,53	0.0013
> 60 %	0/79	8/36	47.42	2,649 – 848,8	0.0001
> 70 %	0/79	6/36	33.89	1,851 – 620,3	0.0007
> 80 %	0/79	4/36	22.02	1,151 – 421,0	0.0085
> 90 %	0/79	1/36	6.718	0,267 – 169,1	ns

Tabelle 5: OR für ein Therapieversagen der SIT: Berechnung prozentualer Anteile des slgE gegen individuelle Einzelallergene (rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, rApi m 5 und rApi m 10) im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt vor der SIT und Darstellung der Anzahl der Seren innerhalb der jeweiligen Gruppe (Therapieansprecher n = 79, Therapieversager n = 36), welche die angegebenen Prozenzhürden überschreiten mit entsprechender Berechnung von OR, 95 %-KI und P-Wert.

5.1.7.2 Kontingenztafeln vor der Stichprovokation

Bei Betrachtung der schrittweise durchgeführten Ratioberechnungen konnte entsprechend der graphischen Verteilung kein signifikanter Gruppenunterschied bezüglich der Ratio von rApi m 1, rApi m 2 und rApi m 3 detektiert werden. Bei der Ratio des rApi m 10 vor der Stichprovokation zeigte sich aufs Neue eine Signifikanz im Vergleich der beiden Gruppen: wenn gleich nicht so ausgeprägt wie bei der Ratio vor Beginn der SIT waren für ansteigende prozentuale Anteile des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt steigende OR für ein Therapieversagen zu dokumentieren (Tabelle 6).

Ratio: slgE rApi m 1 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	57/71	33/35	4,053	0,866 – 18,96	ns
> 20 %	43/71	26/35	1,881	0,768 – 4,605	ns
> 30 %	34/71	20/35	1,451	0,642 – 3,280	ns
> 40 %	30/71	13/35	0,808	0,351 – 1,856	ns
> 50 %	22/71	10/35	0,891	0,366 – 2,168	ns
> 60 %	15/71	7/35	0,933	0,341 – 2,551	ns
> 70 %	12/71	4/35	0,634	0,189 – 2,133	ns
> 80 %	7/71	1/35	0,269	0,032 – 2,278	ns
> 90 %	5/71	1/35	0,388	0,044 – 3,459	ns
Ratio: slgE rApi m 2 / slgE BG					
Ratio: slgE rApi m 2 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	43/71	16/35	0,548	0,242 – 1,243	ns
> 20 %	25/71	6/35	0,381	0,139 – 1,040	ns
> 30 %	15/71	4/35	0,482	0,147 – 1,579	ns
> 40 %	13/71	1/35	0,131	0,016 – 1,048	0,0321
> 50 %	7/71	0/35	0,121	0,007 – 2,185	ns
> 60 %	5/71	0/35	0,170	0,009 – 3,171	ns
> 70 %	4/71	0/35	0,211	0,011 – 4,039	ns
> 80 %	4/71	0/35	0,211	0,011 – 4,039	ns
> 90 %	3/71	0/35	0,276	0,014 – 5,490	ns
Ratio: slgE rApi m 3 / slgE BG					
Ratio: slgE rApi m 3 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	28/71	8/35	0,455	0,181 – 1,144	ns
> 20 %	10/71	2/35	0,369	0,076 – 1,789	ns
> 30 %	3/71	1/35	0,667	0,067 – 6,655	ns
> 40 %	0/71	1/35	6,217	0,245 – 156,7	ns
> 50 %	0/71	1/35	6,217	0,245 – 156,7	ns
> 60 %	0/71	1/35	6,217	0,245 – 156,7	ns
> 70 %	0/71	1/35	6,217	0,245 – 156,7	ns
> 80 %	0/71	1/35	6,217	0,245 – 156,7	ns
> 90 %	0/71	1/35	6,217	0,245 – 156,7	ns

Ratio: slgE rApi m 10 / slgE BG	TA (n)	TV (n)	OR	95 %-KI	P-Wert
> 10 %	46/71	25/35	1,359	0,563 – 3,277	ns
> 20 %	33/71	19/35	1,367	0,607 – 3,081	ns
> 30 %	17/71	16/35	2,675	1,132 – 6,322	0,0275
> 40 %	9/71	11/35	3,157	1,162 – 8,577	0,0329
> 50 %	5/71	9/35	4,569	1,398 – 14,93	0,0129
> 60 %	2/71	6/35	7,138	1,359 – 37,48	0,0150
> 70 %	1/71	2/35	4,242	0,371 – 48,50	ns
> 80 %	1/71	1/35	2,059	0,125 – 33,95	ns
> 90 %	0/71	1/35	6,217	0,247 – 156,7	ns

Tabelle 6: OR für ein Therapieversagen der SIT: Berechnung prozentualer Anteile des slgE gegen individuelle Einzelallergene (rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 und rApi m 10) im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt vor der Stichprovokation und Darstellung der Anzahl der Seren innerhalb der jeweiligen Gruppe (Therapieansprecher n = 71, Therapieversager n = 35), welche die angegebenen Prozenzhürden überschreiten mit entsprechender Berechnung von OR, 95 %-KI und P-Wert.

5.1.8 slgG4-Induktion unter der spezifischen Immuntherapie

Zur Quantifizierung der slgG4-Induktion fand bei den Laborproben, welche zum einen vor der SIT und zum anderen nach einer mindestens 6 Monate dauernden SIT abgenommen worden waren, die Bestimmung des slgG4 gegen das BG-Gesamtextrakt, sowie gegen rApi m 1, rApi m 3 und rApi m 10 statt. Die Gegenüberstellung der Rohdaten vor und während der SIT zeigte eine starke Induktion des slgG4 gegen BG (Therapieansprecher: Geometrisches Mittel (GM) vor der SIT 1,19 kU_A/l – GM während der SIT 5,15 kU_A/l; Therapieversager: GM vor der SIT 3,81 kU_A/l – GM während der SIT 12,06 kU_A/l) und gegen rApi m 1 (Therapieansprecher: GM vor der SIT 1,11 kU_A/l – GM während der SIT 4,32 kU_A/l; Therapieversager: GM vor der SIT 4,25 kU_A/l – GM während der SIT 10,95 kU_A/l) in der Gruppe der Therapieansprecher ebenso wie in der Gruppe der Therapieversager, während in beiden Gruppen kaum eine Induktion gegen rApi m 3 (Therapieansprecher: GM vor der SIT 0,097 kU_A/l – GM während der SIT 0,092 kU_A/l; Therapieversager: GM vor der SIT 0,194 kU_A/l – GM während der SIT 0,225 kU_A/l) und gegen rApi m 10 (Therapieansprecher: GM vor der SIT 0,025 kU_A/l – GM während der SIT 0,041 kU_A/l; Therapieversager: GM vor der SIT 0,046 kU_A/l – GM während der SIT 0,085 kU_A/l) beobachtet werden konnte (Abbildung 12).

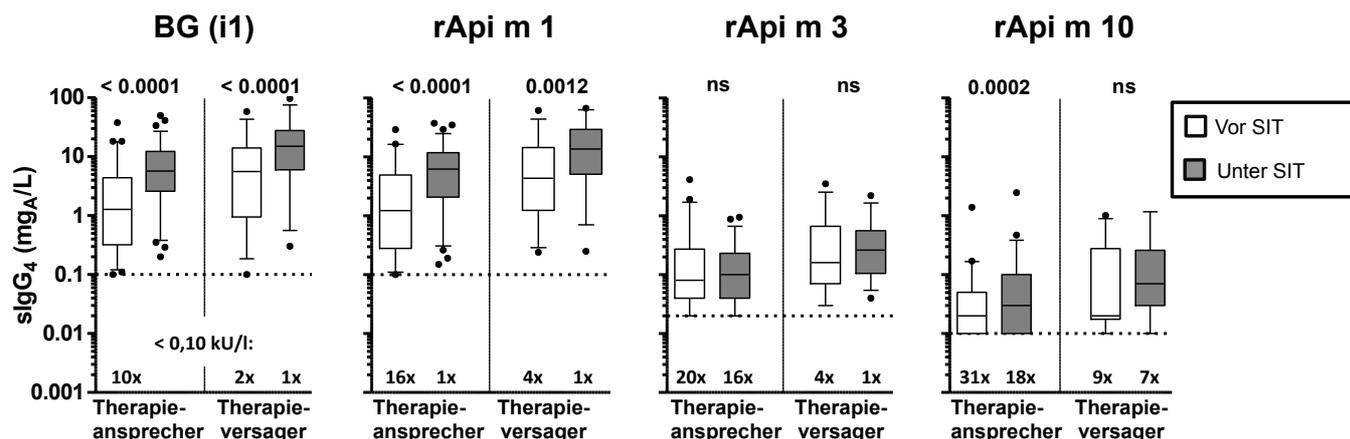


Abbildung 12: Induktion des sIgG4 gegen verschiedene Einzelallergene (BG, rApi m 1, rApi m 3 und rApi m10) bei BG-allergischen Patienten. Dargestellt sind jeweils die Werte vor der SIT und unter der SIT nach mindestens 6 Monaten Therapiedauer im Gruppenvergleich der Therapieansprecher (n = 79) und Therapieversager (n = 36). Die Box repräsentiert die 25. und die 50. Perzentile, innerhalb der Box ist das geometrische Mittel bezeichnet, die vertikalen Linien geben die 5. und 95. Perzentile wieder, die Punkte zeigen die Ausreißer an. Die Anzahl der Seren mit sIgG4-Werten unter dem LOD wurden jeweils gesammelt unter der gestrichelten Linie bezeichnet (LOD i1 und rApi m 1: 0,10 mg_A/l; LOD rApi m 3: 0,02 mg_A/l; LOD rApi m 10: 0,01 mg_A/l).

Entsprechend zeigte die Berechnung der Ratio der sIgG4-Werte vor / während der SIT eine starke Induktion gegen BG (Therapieansprecher: GM 5,1 / Therapieversager: GM 3,2) und gegen rApi m 1 (Therapieansprecher: GM 6,2 / Therapieversager: GM 4,0), hingegen nahezu keine sIgG4-Induktion gegen rApi m 3 (Therapieansprecher: GM 1,01 / Therapieversager: GM 1,21) und gegen rApi m 10 (Therapieansprecher: GM 1,71 / Therapieversager: GM 1,72) (Abbildung 13).

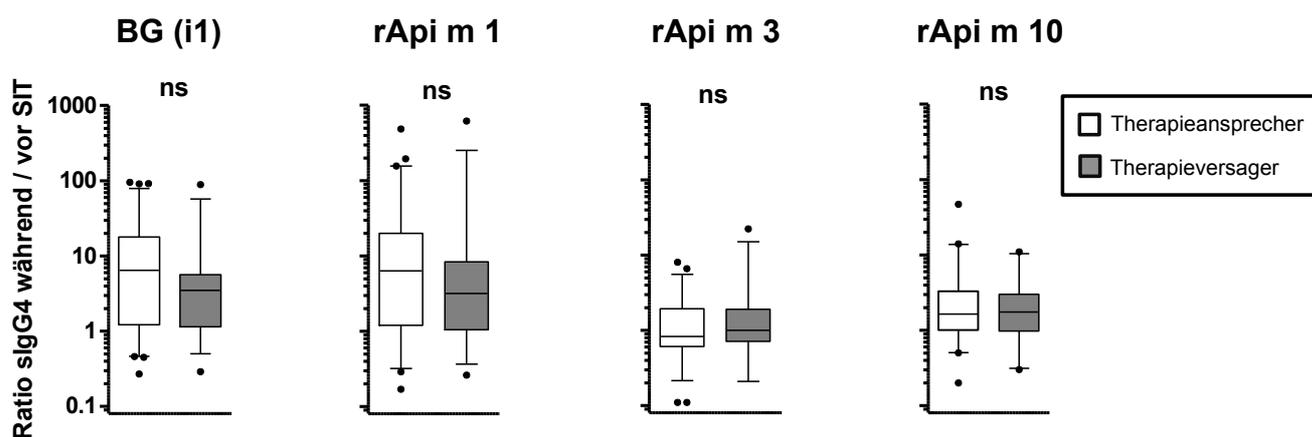


Abbildung 13: Ratio der sIgG4-Werte während / sIgG4-Werte vor der SIT bei BG, rApi m 1, rApi m 3 und rApi m 10 im Gruppenvergleich der Therapieansprecher (n = 79) und der Therapieversager (n = 36). Die Box repräsentiert die 25. und die 50. Perzentile, innerhalb der Box ist das geometrische Mittel bezeichnet, die vertikalen Linien geben die 5. und 95. Perzentile wieder, die Punkte zeigen die Ausreißer an.

5.1.9 Analyse Bienengift-Gesamtextrakt und SIT-Therapeutika

Im Folgenden wird die Analyse des Vorkommens von Api m 1, Api m 3 und Api m 10 im BG-Gesamtextrakt und in verschiedenen für die SIT verwendeten Therapeutika untersucht, welche von unseren Kollaborationspartnern in Aarhus, Dänemark, unter der Leitung von Herr Professor Edzard Spillner durchgeführt und graphisch aufgearbeitet wurde.

Der initiale Beleg für das Fehlen oder die Unterrepräsentanz von Api m 10 und Api m 3 in den SIT-Therapeutika wurde mittels rekombinant hergestellter IgE-Antikörper durchgeführt, die durch kombinatorische Technologien isoliert wurden. Um eine verlässlichere Grundlage für die Analyse des Vorkommens der Einzelallergene im BG-Gesamtextrakt und in verschiedenen SIT-Therapeutika zu erhalten, wurden spezifische, polyklonale Antiseren (Anti-Api m 1, Anti-Api m 3 und Anti-Api m 10) mit gegen Api m 1, Api m 3 und Api m 10 immunisierten Kaninchen generiert. Die Spezifität und Immunreaktivität der polyklonalen Seren gegen Api m 1, Api m 3 und Api m 10 wurden durch ELISA mit Verwendung rekombinanter BG-Allergene geprüft (Abbildung 15). Die Verwendung dieser polyklonalen Seren bei den zwei verschiedenen BG-Gesamtexttrakten zeigte mittels Immunoblot-Analyse, dass bei beiden Seren die korrespondierenden Proteine in der erwarteten Größe und in vergleichbarer Intensität detektierbar waren. Für Api m 3 und Api m 10 wurden Banden bei 55 und 50 kDa detektiert (Abbildung 14, A und B). Für Api m 1 wurden 3 Banden bei 15 - 20 kDa detektiert, welche die hauptsächlichen Glycoformen repräsentieren (Abbildung 14, C). Des Weiteren wurden folgende 5 verschiedene BG-SIT-Therapeutika bei identischen Konzentrationen von 1 mg/ml analysiert:

- Venomil, Allergy Therapeutics, Worthing, UK (I)
- Venomenhal, HAL Allergy, Leiden, Holland (II)
- Aquagen, ALK-Abelló, Hamburg, Deutschland (III)
- Pharmalgen, ALK-Abelló, Hamburg, Deutschland (IV)
- Alyostal Venin, Stallergenes, Antony, Frankreich (V).

Es wurden jeweils 3 verschiedene Chargen bei den BG-SIT-Therapeutika I, III, IV und V und 2 verschiedene Chargen bei BG-SIT-Therapeutikum II kontrolliert, um eine repräsentative Datenlage darstellen zu können.

Alle BG-SIT-Therapeutika wiesen eine deutliche Reaktivität gegen die Antiseren auf, welche Api m 1 und Api m 3 enthielten (Abbildung 14, B und C). Diese war vergleichbar mit der Reaktivität der BG-Gesamtextrakte. Bezüglich des Api m 10

zeigte sich jedoch ein anderes Bild: Während die BG-Gesamtextrakte eine deutliche Reaktivität gegen Api m 10 aufwiesen, zeigten nur 2 der 5 BG-SIT-Therapeutika eine mit den BG-Gesamtextrakten vergleichbare Reaktivität gegen Api m 10, dies gemessen bei einer BG-Gesamtextrakt-Konzentration von 0,3 mg/ml. Diese Ergebnisse bestätigen das Nichtvorhandensein bzw. die signifikante Unterrepräsentanz von Api m 10 in bestimmten therapeutischen BG-SIT-Präparaten.

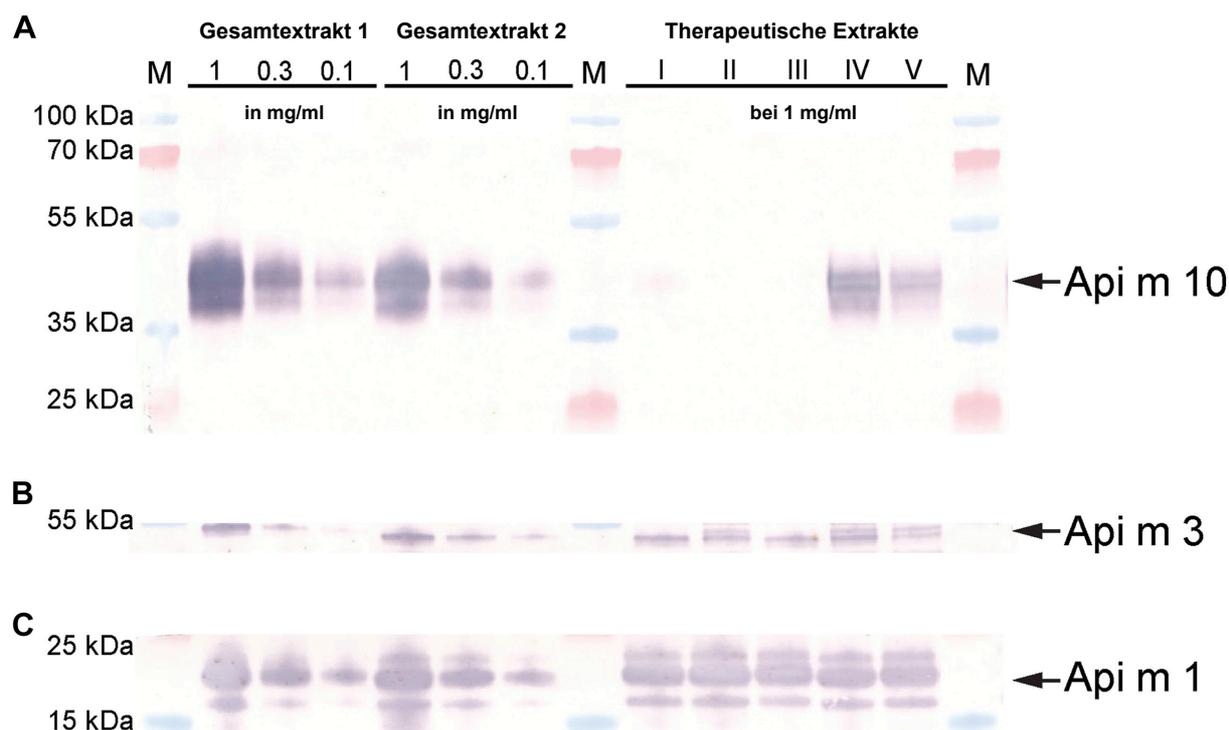


Abbildung 14: Vorkommen von Api m 10 (A), Api m 3 (B) und Api m 1 (C) in 2 verschiedenen BG-Gesamtextrakten und bei folgenden 5 verschiedenen therapeutischen SIT-Präparaten: I: Venomil, Allergy Therapeutics, Worthing, UK; II: Venomenhal, HAL Allergy, Leiden, Holland; III: Aquagen, ALK-Abelló, Hamburg, Deutschland; IV: Pharmedgen, ALK-Abelló; V: Alyostal Venin, Stallergenes, Antony, Frankreich.

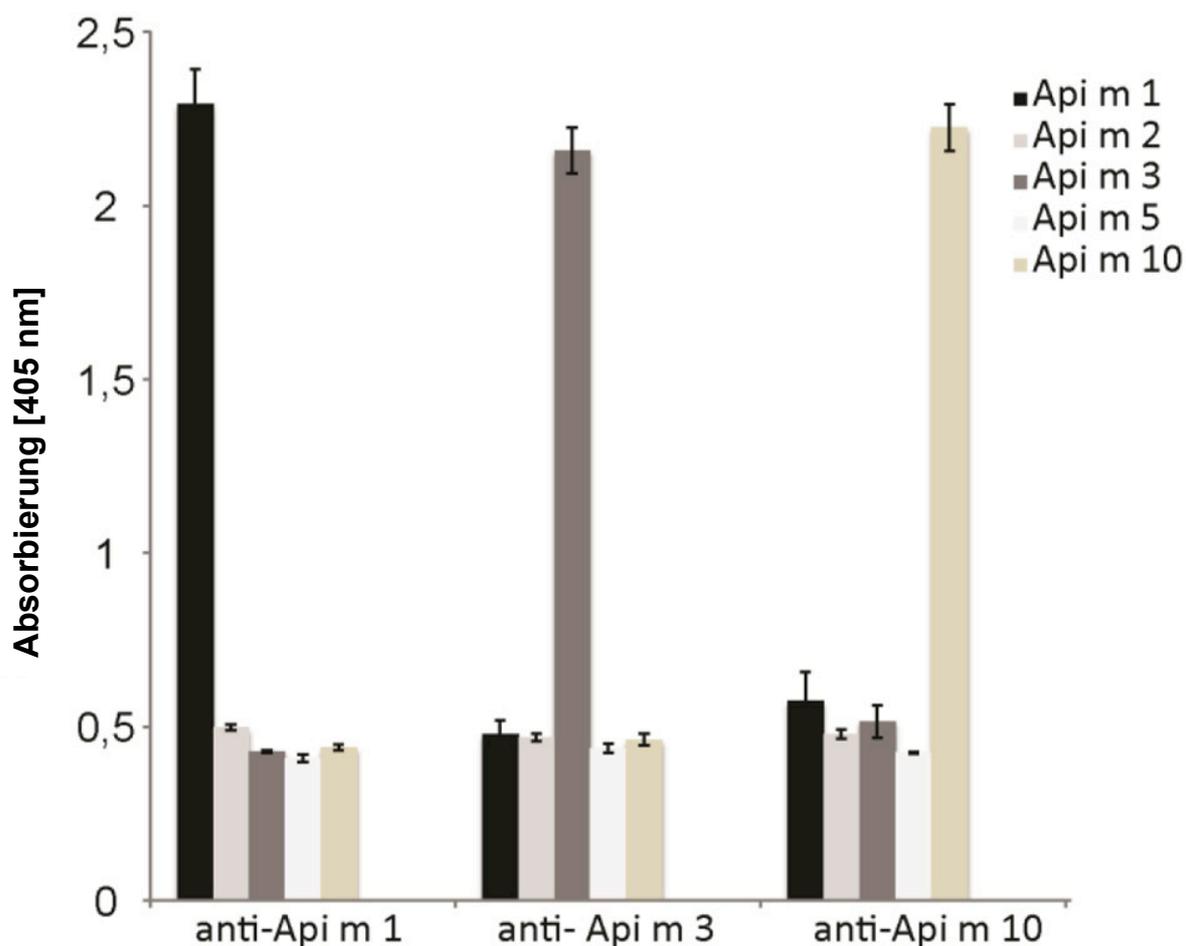


Abbildung 15: Spezifität und Immunreaktivität der polyklonalen Antiseren gegen Api m 1, Api m 3 und Api m 10.

5.1.10 rApi m 10-spezifische sIgE- und sIgG4-Antwort der SIT-Therapeutika

Aufgrund der unterschiedlichen Api m 10-Konzentrationen der verschiedenen BG-SIT-Therapeutika untersuchten wir in einem nächsten Schritt die rApi m 10-spezifische sIgE-Reaktivität und sIgG4-Induktion im Rahmen der BG-SIT mit verschiedenen SIT-Therapeutika. Wir wollten prüfen, ob ein Unterschied der rApi m 10-spezifischen sIgE-Reaktivität und sIgG4-Induktion bei Patienten abhängig vom Gehalt der BG-SIT-Therapeutika an Api m 10 vorliegt. Es erfolgte eine Aufteilung in 2 Gruppen: Patienten, welchen ein SIT-Therapeutikum mit niedrigem oder nicht nachweisbarem Api m 10-Gehalt appliziert wurde (Gruppe I, n = 59) und Patienten, welchen ein SIT-Therapeutikum mit suffizient nachweisbarem Api m 10-Gehalt appliziert wurde (Gruppe II, n = 50).

5.1.10.1 Vergleich der rApi m 10-spezifischen sIgE-Reaktivität

Im Rahmen der SIT wurde in beiden Gruppen eine zwar moderate, aber signifikante Reduktion des sIgE gegen rApi m 10 gemessen (Abbildung 16). Im Vergleich der beiden Gruppen bezüglich der Ratio der sIgE-Werte während zur vor der SIT zeigte sich eine geringgradig stärkere, signifikante Reduktion des rApi m 10-spezifischen sIgE in der Gruppe der Patienten, welche mit einem nachweislich Api m 10-enthaltenden BG-SIT-Therapeutikum behandelt wurden (Gruppe II) (Abbildung 17).

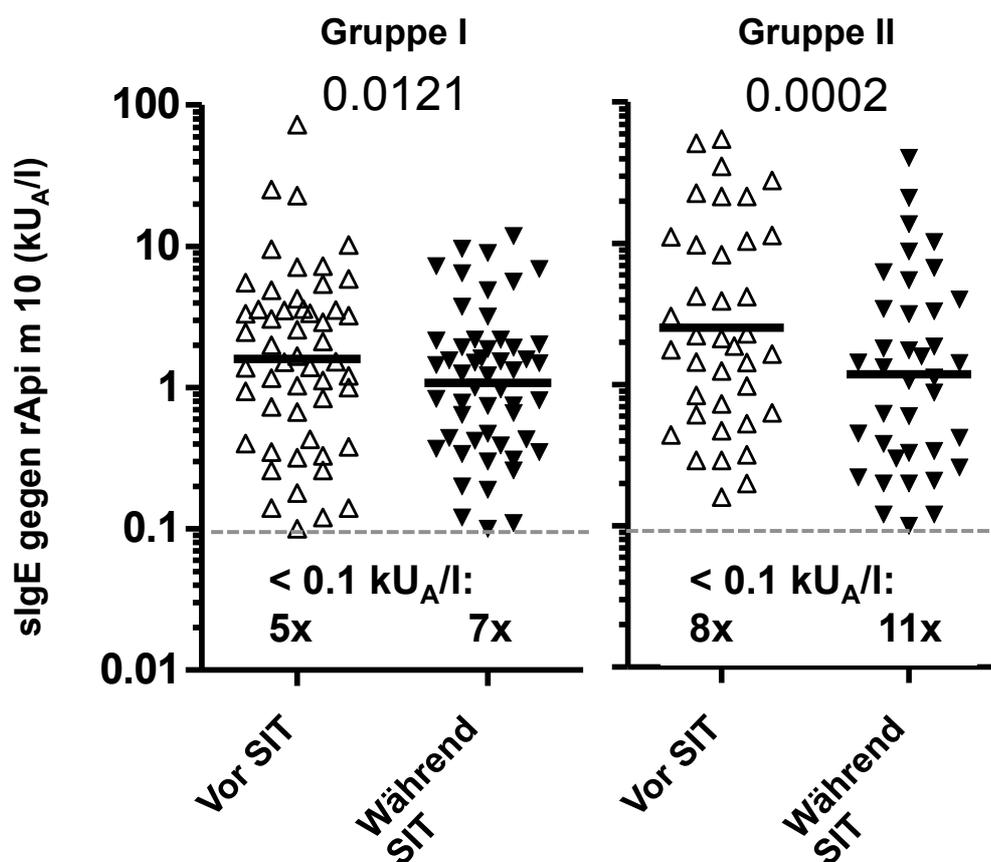


Abbildung 16: rApi m 10-spezifische IgE-Werte vor und während der SIT bei BG-allergischen Patienten, welche mit SIT-Therapeutika mit niedrigem oder nicht nachweisbarem Api m 10-Gehalt (Gruppe I) oder SIT-Therapeutika mit suffizient nachweisbarem Api m 10-Gehalt (Gruppe II) behandelt wurden. Der durchgezogene Strich zeigt das geometrische Mittel an. Die Anzahl der Seren mit sIgE-Werten $< 0,10 \text{ kU}_A/\text{l}$ (LOD) wurden jeweils gesammelt unter der gepunkteten Linie von $0,10 \text{ kU}_A/\text{l}$ bezeichnet.

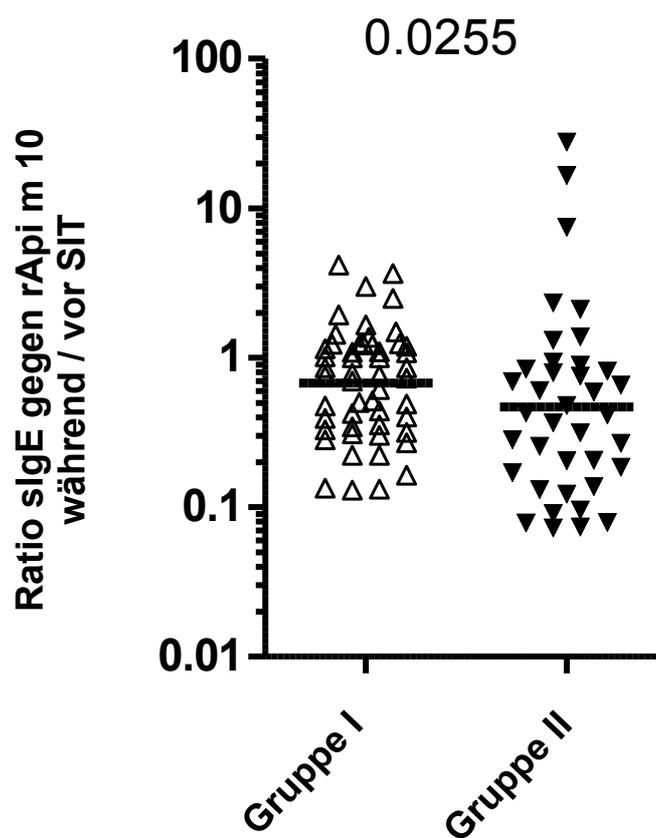


Abbildung 17: Ratio der rApi m 10-spezifischen sIgE-Reaktivität während / vor der SIT bei BG-allergischen Patienten, welche mit SIT-Therapeutika mit niedrigerem Api m 10-Gehalt (Gruppe I) oder SIT-Therapeutika mit suffizient nachweisbarem Api m 10-Gehalt (Gruppe II) behandelt wurden. Der durchgezogene Strich zeigt das geometrische Mittel an. Seren mit sIgE-Werten > 0,10 kU_A/l (LOD) vor und während der SIT wurden für die Berechnung der Ratio berücksichtigt.

5.1.10.2 Vergleich der rApi m 10-spezifischen sIgG4-Induktion

Nachdem sich bei der sIgE-Reaktivität nur ein diskreter Unterschied im Gruppenvergleich gezeigt hatte, wurde beim Vergleich der rApi m 10-spezifischen sIgG4-Induktion ein deutlicherer Unterschied der beiden Gruppen ersichtlich: Eine signifikante sIgG4-Induktion trat nur in der Gruppe der Patienten ein, welche mit einem SIT-Therapeutikum mit nachweislich suffizientem Api m 10-Gehalt behandelt wurden (Gruppe II) (Abbildung 18). Dies spiegelte sich auch im Vergleich der beiden Gruppen bezüglich der Ratio der sIgG4-Werte während zu vor der SIT wieder. Die Gruppe der Patienten mit Behandlung mit einem SIT-Therapeutikum mit Api m 10-Gehalt zeigte eine signifikant höhere Induktion (Abbildung 19).

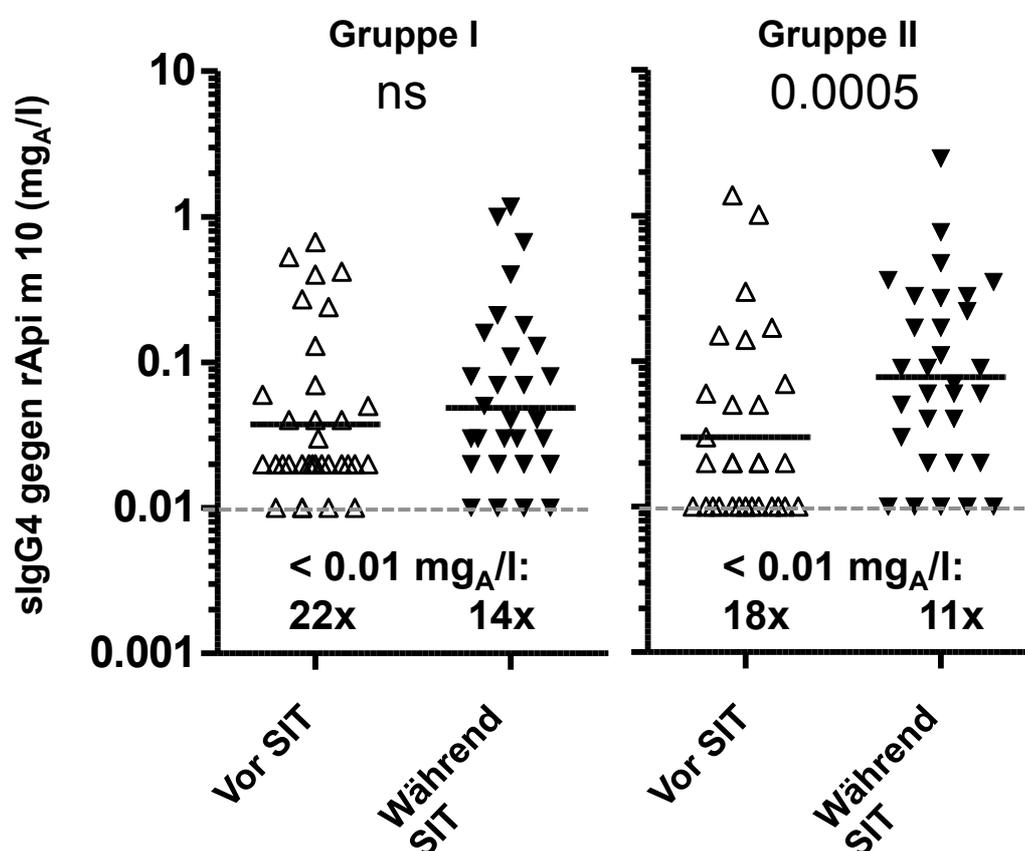


Abbildung 18: rApi m 10-spezifische IgG4-Werte vor und während der SIT bei BG-allergischen Patienten, welche mit SIT-Therapeutika mit niedrigem oder nicht nachweisbarem Api m 10-Gehalt (Gruppe I) oder SIT-Therapeutika mit suffizient nachweisbarem Api m 10-Gehalt (Gruppe II) behandelt wurden. Der durchgezogene Strich zeigt das geometrische Mittel an. Die Anzahl der Seren mit sIgG4-Werten < 0,01 mg_A/l (LOD) wurden jeweils gesammelt unter der gepunkteten Linie von 0,01 mg_A/l bezeichnet.

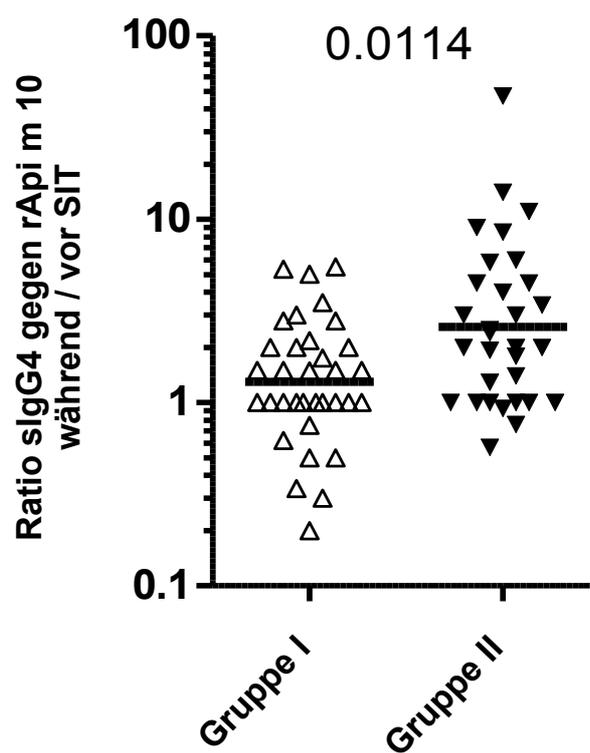


Abbildung 19: Ratio der rApi m 10-spezifischen IgG4-Induktion während / vor der SIT bei BG-allergischen Patienten, welche mit SIT-Therapeutika mit niedrigem oder nicht nachweisbarem Api m 10-Gehalt (Gruppe I) oder SIT-Therapeutika mit suffizient nachweisbarem Api m 10-Gehalt (Gruppe II) behandelt wurden. Der durchgezogene Strich zeigt das geometrische Mittel an. Seren mit sIgG4-Werten $> 0,01 \text{ mg}_A/\text{l}$ (LOD) vor und während der SIT wurden für die Berechnung der Ratio berücksichtigt.

5.2 Kollektiv bienengift- und wespengiftsensibilisierter Patienten

Die aktuelle Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Bienengiftallergie empfiehlt zur Abklärung einer Bienengiftallergie die labordiagnostische Bestimmung von IgE gegen das BG-Gesamtextrakt und gegen rApi m 1. Diese Bestimmung des IgE gegen rApi m 1 hinterlässt jedoch mit einer Sensitivität von 58 - 80 % eine deutliche diagnostische Lücke. Diese Lücke ist bei Patienten, die das allergieauslösende Insekt nicht identifizierten, besonders schwerwiegend. Besteht bei ihnen eine Doppelpositivität gegen die Gesamtextrakte BG und WG, so ist die Wahl der suffizienten Therapie nicht sicher differenzierbar. Es besteht das Risiko, dass bei ihnen lediglich eine primäre Sensibilisierung gegen WG diagnostiziert wird. Eine notwendige BG-SIT würde nicht eingeleitet werden. In anderen Fällen erfolgt bei zweifelhafter Befundkonstellation eine Doppel-SIT mit BG und WG, obwohl lediglich eine WG-SIT notwendig wäre. Dies stellt eine unnötige Belastung für den Organismus dar und ist zudem aus ökonomischer Sicht nicht sinnvoll. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Frage, ob die Sensitivität der BG-Diagnostik durch Bestimmung von weiteren Einzelallergenen verbessert werden kann. Können infolgedessen Patienten einer BG-SIT zugeführt werden, die sie ohne Bestimmung der zusätzlichen Einzelallergene nicht erhalten hätten? Außerdem wird behandelt, ob die zusätzliche Bestimmung weiterer Einzelallergene eine Differenzierung zwischen einer genuinen und einer auf Kreuzreaktivität beruhenden Doppelsensibilisierung gegen BG und WG erlaubt?

Unter den 755 Patienten, welche zur Abklärung einer Hymenopterenengiftallergie in der Universitätsklinik Freiburg vorstellig wurden, zeigten 45,2 % (n = 341) ein IgE gegen BG und WG $\geq 0,35$ kU_A/l, d.h. wiesen gemäß der Befundstellung anhand der Gesamtextrakte der beiden Gifte eine Doppelsensibilisierung auf. Diese 341 Seren wurden in dieser Arbeit genutzt, um die Hypothese zu überprüfen, ob durch Detektion der IgE-Reaktivitäten gegen verschiedene Einzelallergene bzw. deren Kombinationen die Differenzierung zwischen einer tatsächlich genuinen Doppelsensibilisierung gegen BG und WG und einer Monosensibilisierung gegen eines der Insektenentitäten mit zusätzlicher Kreuzreaktivität gegenüber Bestandteilen der anderen Entität möglich ist und inwiefern entsprechend die zusätzlichen Einzelallergene ein Benefit für die Diagnostik der Hymenopterenengiftallergie darstellen können.

Unter diesen 341 doppelsensibilisierten Patienten konnten 37 % (126/341) das mutmaßlich für die allergische Reaktion verantwortliche Insekt nicht identifizieren. 24,3 % (83/341) gaben an, beim Ereignis von einer Biene gestochen worden zu sein, 38,7 % (132/341) erklärten die Wespe als allergieauslösendes Insekt.

Anhand dieser durchgeführten oder fehlenden Identifikation des Stechinsektes erfolgte eine Einteilung in Gruppen, welche in den anschließenden Abschnitten getrennt behandelt werden.

5.2.1 Stechinsekt Biene

Die Gruppe der Patienten, welche eine Doppelsensibilisierung gegen WG und BG aufzeigten und als allergieauslösendes Insekt eine Biene angegeben hatten, bestand aus 83 Patienten. In dieser Gruppe zeigten 66,3 % (55/83) der Seren eine positive sIgE-Reaktivität ($\geq 0,35$ kU_A/l) gegen rApi m 1, entsprechend konnte bei diesen 55 Seren eine genuine Sensibilisierung gegen BG nachgewiesen werden. 33,7 % der Seren (28/83) zeigten negative sIgE-Werte ($< 0,35$ kU_A/l) gegen rApi m 1. Von diesen 28 negativen Seren zeigten 8 Seren (28,6 %) positive sIgE-Werte gegen rApi m 3, 4 Seren (14,3 %) gegen nApi m 4 und 12 Seren (42,9 %) gegen rApi m 10 (Abbildung 20).

Die Kombination von rApi m 3 und rApi m 10 konnte entsprechend eine genuine BG-Sensibilisierung auf Grundlage von CCD-freien Einzelallergenen in 46,4 % (13/28) der Api m 1-negativen Seren nachweisen.

Durch Bestimmung von nApi m 4 konnten 2 weitere rApi m 1-negative Seren positiv getestet werden, welche durch die Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 nicht positiv detektiert worden waren. Durch Kombination von rApi m 1, rApi m 3, nApi m 4 und rApi m 10 wurde bei 84,3 % eine BG-Sensibilisierung nachgewiesen.

Es fand bei den rApi m 1-negativen Seren eine zusätzliche Bestimmung des sIgE gegen rApi m 2 und rApi m 5, welche potentiell kreuzreagible Allergene darstellen, statt. Es zeigte sich eine sIgE-Reaktivität $\geq 0,35$ kU_A/l gegen rApi m 2 in 35,7 % (10/28), gegen rApi m 5 in 46,4 % (13/28) der rApi m 1-negativen Fälle.

In kombinierter Gesamtheit aller gemessener Einzelallergene (rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, nApi m 4, rApi m 5 und rApi m 10) konnte eine BG-Sensibilisierung in 92,7 % (77/83) der Gruppe detektiert werden, die Ergebnisse dieser Studie bestätigten damit die bereits erhobene Datenlage (Köhler et al., 2014).

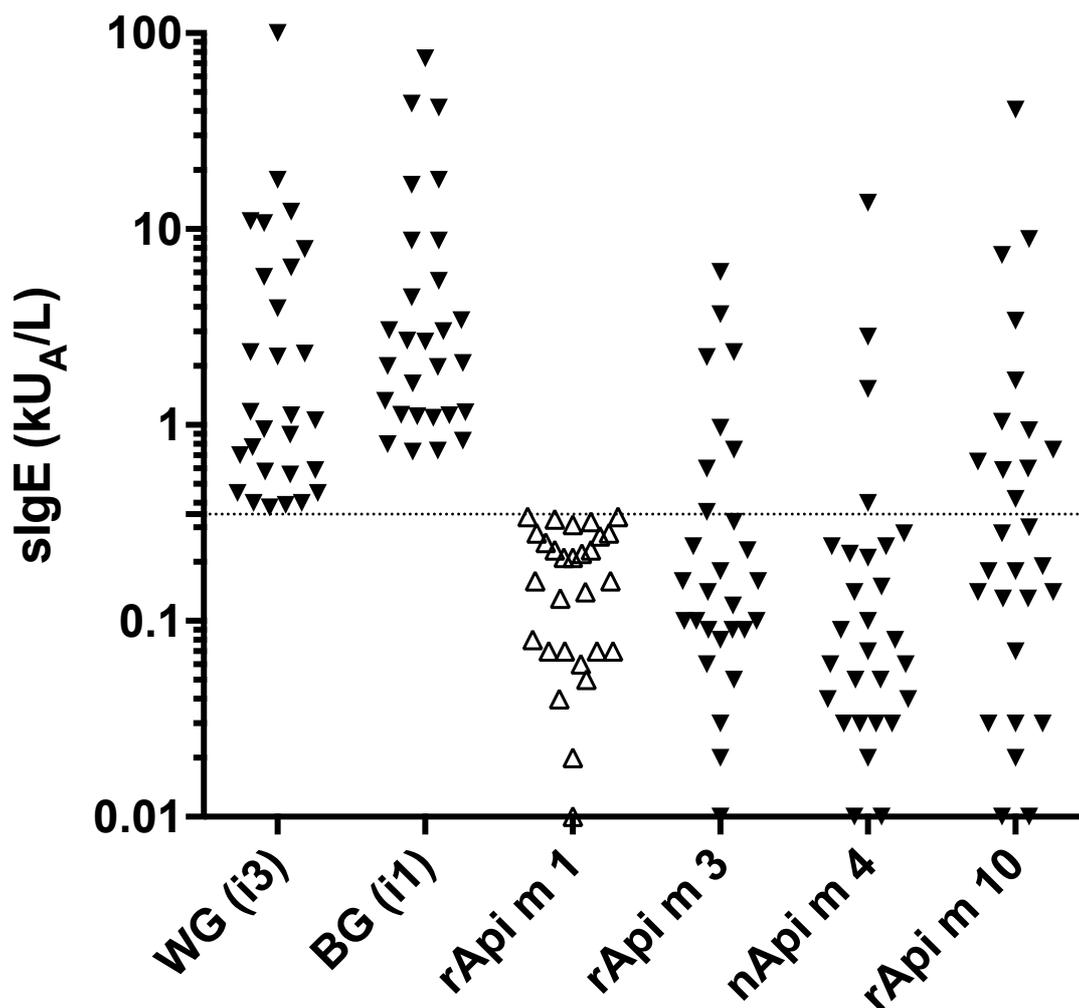


Abbildung 20: sIgE-Werte gegen rApi m 3, nApi m 4 und rApi m 10 bei 83 Patienten mit Hymenopterenallergie mit Identifikation einer Biene als allergieauslösendes Stechinsekt und Doppelpositivität gegen WG und BG und negativen sIgE-Werte ($< 0,35$ kU_A/l) gegen rApi m 1.

5.2.2 Nicht-identifiziertes Stechinsekt

Von den 341 Patienten, welche eine Doppelsensibilisierung gegen WG und BG aufzeigten, hatten 126 das mutmaßliche Stechinsekt nicht identifiziert. Dies entspricht einem Anteil von 37 %, welcher sich mit der von Baker et al. beschriebenen Identifikationsrate < 50 % deckt. In dieser Gruppe zeigten 54 % der Seren (68/126) eine positive sIgE-Reaktivität ($\geq 0,35$ kU_A/l) gegen rApi m 1, entsprechend konnte in diesen Fällen eine genuine Sensibilisierung gegen BG nachgewiesen werden. 46 % der Seren (58/126) zeigten negative sIgE-Werte ($< 0,35$ kU_A/l) gegen rApi m 1. Von diesen 58 negativen Seren zeigten 15 Seren (25,8 %) positive sIgE-Werte gegen rApi m 3, 3 Seren (5,2 %) gegen nApi m 4 und 27 Seren (46,6 %) gegen rApi m 10 (Abbildung 21).

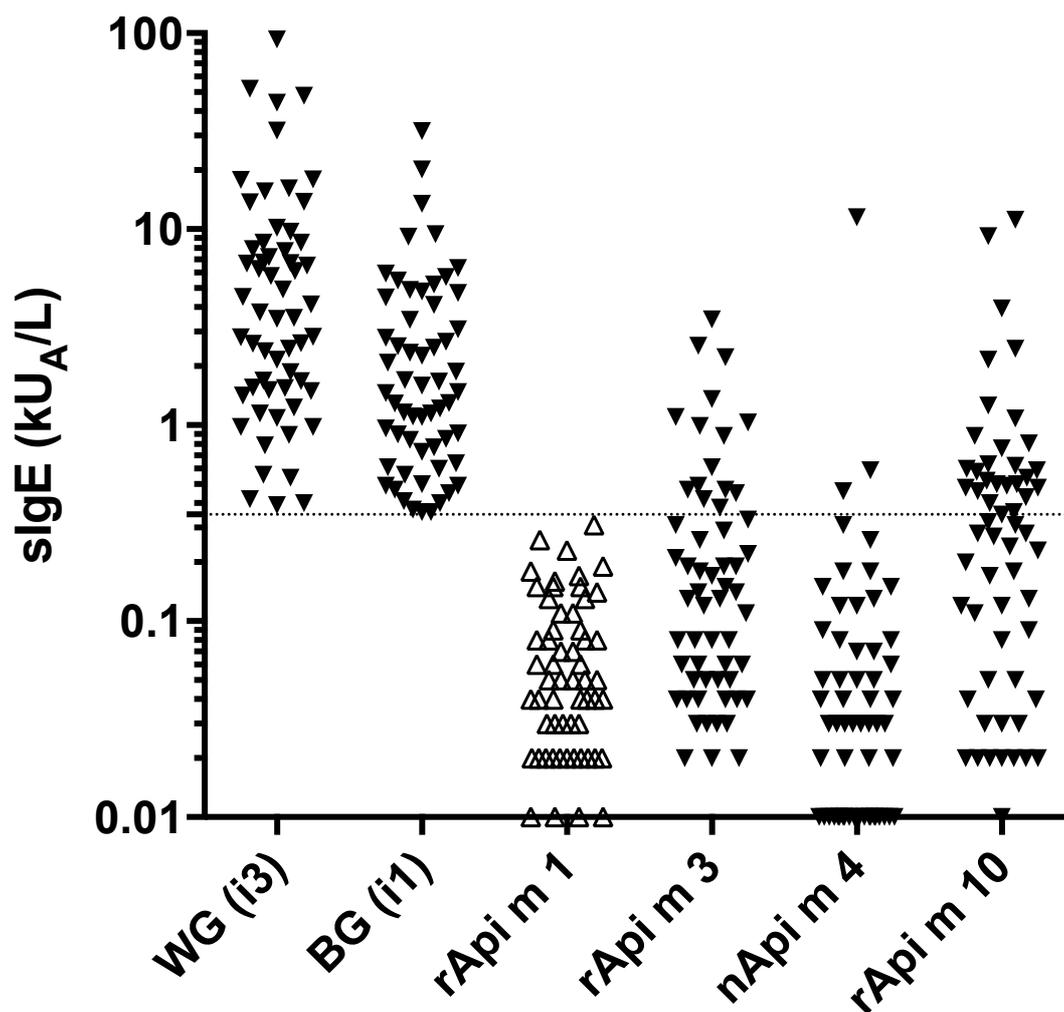


Abbildung 21: sIgE-Werte gegen rApi m 3, nApi m 4 und rApi m 10 bei 126 Patienten mit Hymenopterenallergie mit unbekanntem Stechinsekt und Doppelpositivität gegen WG und BG und negativen sIgE-Werten ($< 0,35$ kUA/l) gegen rApi m 1.

Die Kombination von rApi m 3 und rApi m 10 konnte entsprechend eine genuine BG-Sensibilisierung auf Grundlage von CCD-freien Einzelallergenen in 65,4 % (31/58) der Api m 1-negativen Seren detektieren. Durch Bestimmung von nApi m 4 konnte kein weiteres rApi m 1-negatives Serum positiv getestet werden.

In dieser Gruppe wurde bei den Api m 1-negativen Seren ebenfalls das sIgE gegen rApi m 2 und rApi m 5 bestimmt. Es zeigte sich eine sIgE-Reaktivität $\geq 0,35$ kUA/l gegen rApi m 2 in 29,3 % (17/58), gegen rApi m 5 in 34,5 % (20/58) der rApi m 1-negativen Fälle.

Die Kombination aller Einzelallergene (rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3, nApi m 4, rApi m 5 und rApi m 10) erbrachte in dieser Gruppe eine BG-Sensibilisierung in 87,6 % (110/126).

Diese Gruppe war aufgrund der fehlenden Identifikation des allergieauslösenden Stechinsektes von größtem Interesse bezüglich einer möglichst lückenlosen Detektion der Sensibilisierung im Rahmen der labordiagnostischen Bestimmung der Einzelallergene, dies insbesondere, um eine adäquate und damit protektive SIT durchführen bzw. eine unnötige Therapie vermeiden zu können. Während rApi m 1, rApi m 3, nApi m 4 und rApi m 10 spezifische Marker für eine BG-Sensibilisierung repräsentieren und damit bei Positivität eine genuine BG-Sensibilisierung anzeigen, sind rApi m 2 und rApi m 5 aufgrund ihrer potentiellen Kreuzreagibilität aufgrund der Proteinhomologien zu Ves v 2 und Ves v 3, ihrer korrespondierenden Allergene im WG, unspezifisch. Aus diesem Grunde wurden nur die spezifischen Marker für die Untersuchung des zusätzlichen Nutzens weiterer Einzelallergene neben rApi m 1 berücksichtigt.

Während die ausschließliche Verwendung von rApi m 1 eine Sensibilisierung in 54 % aufzeigen konnte, erlaubte die Kombination aus rApi m 1, rApi m 3 und rApi m 10 die sensibelste und effektivste Detektion einer genuine BG-Sensibilisierung in 78,6 % der Patienten in der Gruppe mit unbekanntem Stechinsekt (Abbildung 22).

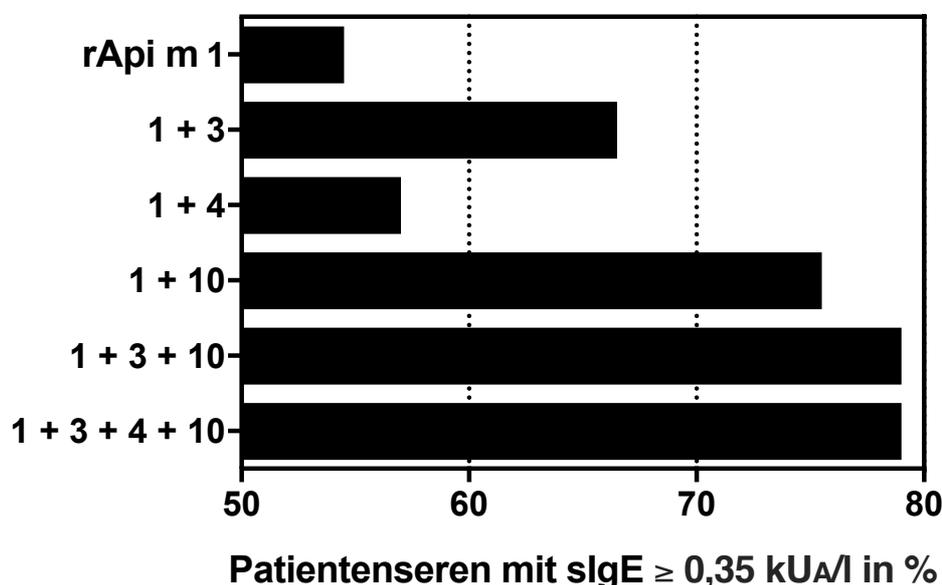


Abbildung 22: Prozentsatz der Patientenseren mit BG-Sensibilisierung anhand labordiagnostischer Bestimmung von rApi m 1 und weiterer Einzelallergene in Kombination bei Patienten mit Doppelsensibilisierung gegen BG und WG mit unbekanntem Stechinsekt (n = 126).

5.2.3 Mehrwert zusätzlicher Einzelallergene für die Diagnostik

Abschließend wurden die diagnostischen Ergebnisse, welche aus der Bestimmung der aktuell zur Diagnostik verwendeten Einzelallergene (rApi m 1, rVes v5 und rVes v 1) resultieren, mit den diagnostischen Befundstellungen verglichen, wenn eine zusätzliche Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 erfolgt.

Dieses Ergebnis war wiederum in der Gruppe der Patienten, welche das Stechinsekt nicht identifizieren konnten, von besonderem Interesse, weil hier eine möglichst lückenlose, sichere Befundstellung von größter Bedeutung ist. Im Rahmen der Bestimmung der aktuell zur Diagnostik verwendeten Einzelallergene wurde eine Doppelsensibilisierung gegen BG und WG (rApi m 1 und rVes v 5 und / oder rVes v 1 $\geq 0,35$ kU_A/l) in 43,7 %, eine Monosensibilisierung gegen rApi m 1 in 10,3 % und eine Monosensibilisierung gegen rVes v 5 und / oder rVes v 1 in 43,7 % der Fälle diagnostiziert. 3 Patienten (2,4 %) zeigten negative Ergebnisse gegen alle getesteten Einzelallergene. Unter zusätzlichem Einsatz von rApi m 3 und rApi m 10 ergab sich ein ausschlaggebende Änderung des diagnostischen Bildes: Die Befundstellung einer Doppelsensibilisierung gegen BG und WG erhöhte sich von 43,7 % (55/126) auf 65,9 % (83/126) der Patienten mit nicht-identifiziertem Stechinsekt. Die Anzahl der Patienten mit einer Monosensibilisierung gegen BG-Einzelallergene nahm um 3 Patienten von 10,3 % (13/126) auf 12,7 % (16/126) zu. Demgegenüber sank die Zahl der gegen WG-monosensibilisierten Patienten von 43,7 % (55/126) auf 21,4 % (27/126), außerdem ergaben sich aufgrund der zusätzlichen Verwendung von rApi m 3 und rApi m 10 keine doppelnegativen Bestimmungen mehr (Abbildung 23).

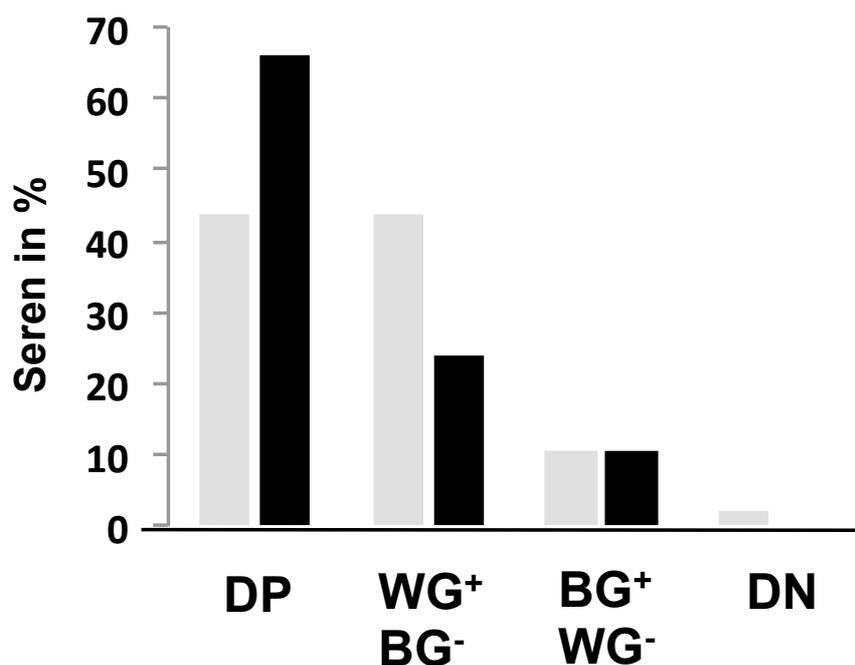


Abbildung 23: Vergleich der Befundstellung mit Hilfe der aktuell verwendeten Routinediagnostik (rApi m 1, rVes v 5 und rVes v 1) (graue Balken) mit der Befundstellung mittels zusätzlicher Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 (schwarze Balken) bei Patienten mit Doppelsensibilisierung gegen WG und BG mit unbekanntem Stechinsekt (n = 126). DP steht für eine Doppelsensibilisierung gegen WG und BG, WG⁺ / BG⁻ für eine Monosensibilisierung gegen WG, BG⁺ / WG⁻ für eine Monosensibilisierung gegen BG, DN für ein doppelnegatives Ergebnis.

Die Gegenüberstellung der kommerziell verfügbaren diagnostischen Tests mit der zusätzlichen Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 wurde ebenfalls in der Gruppe der Patienten durchgeführt, in welcher eine Biene als Stechinsekt identifiziert worden war. Auch in dieser Gruppe stieg der Anteil der gegen BG und WG doppelsensibilisierten Patienten von 43,4 % (36/83) auf 54,2 % (45/83), des Weiteren nahm die Zahl der BG-monosensibilisierten Patienten um 4 Fälle von 22,8 % (19/83) auf 27,7 % (23/83) zu. Entsprechend sank die Zahl der Monosensibilisierungen gegen WG von 26,5 % (22/83) auf 15,7 % (13/83), anstelle von bei 6 wurde mit Hilfe der Bestimmung der zusätzlichen BG-Einzelallergene nur noch bei 2 Seren IgE-Werten gegen alle Einzelallergene $\leq 0,35$ kU_A/l gemessen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei der Patientengruppe ersichtlich, in welcher eine Wespe als Stechinsekt identifiziert worden war (n = 110). Durch zusätzlichen Einsatz von rApi m 3 und rApi m 10 erhöhte sich die Befundstellung einer Doppelsensibilisierung gegen BG und WG von 27,3 % (30/110) auf 46,4 % (51/110). Die Anzahl der Patienten mit einer Monosensibilisierung gegen BG-Einzelallergene wuchs von 0 auf 1 Patienten. Hingegen sank die Zahl der gegen WG

monosensibilisierten Patienten von 70,9 % (78/110) auf 51,8 % (57/110), die Zahl der doppeltnegativen Seren verringerte sich von 2 auf 1.

6 Diskussion

Die Durchführung dieser Studie basierte auf folgendem Fundament: Bienenstiche verursachen bei allergischen Patienten lebensbedrohliche Reaktionen bis hin zum Kreislaufversagen. Eine suffiziente Diagnostik und Therapie sind notwendig, um Patienten vor einer erneuten anaphylaktischen Reaktion schützen zu können. Die ausschließliche kurative Therapie besteht in der Durchführung einer spezifischen Immuntherapie (SIT) gegen das allergieauslösende Gift, so z.B. Bienengift (BG) oder Wespengift (WG). Das Risiko des Therapieversagens ist jedoch bei der BG-SIT (11 - 23 %) gegenüber dem der WG-SIT (0 - 9 %) deutlich erhöht. Vorarbeiten zeigen eine OR von > 5 bezüglich des Therapieversagens der BG-SIT gegenüber der WG-SIT. Des Weiteren ist die Diagnostik der BG-Allergie der WG-Allergie-Diagnostik deutlich unterlegen (Sensitivität 58 – 80 % vs. > 95 %). Das Ziel dieser Studie war, die Rolle der im BG-Gesamtextrakt enthaltenen Einzelallergene bezüglich Diagnose und Therapie der BG-Allergie zu untersuchen, um Verbesserungen für die molekulare Allergiediagnostik und den Therapieerfolg der BG-SIT erarbeiten zu können.

Die Ergebnisse der vorgelegten Studie zeigen, dass Patienten mit einer dominanten rApi m 10-Sensibilisierung ein erhöhtes Risiko für ein Therapieversagen der BG-SIT haben. Weiter wird in dieser Studie gezeigt, dass die zusätzliche Testung von rApi m 3 und rApi m 10 die Detektion einer BG-Sensibilisierung deutlich verbessert und infolgedessen Patienten von einer BG-SIT profitieren können, die sie ansonsten nicht erhalten hätten.

In der nun folgenden Diskussion wird behandelt, inwiefern eine Dominanz des slgE gegen rApi m 10 den Erfolg der BG-SIT beeinflusst. Des Weiteren wird dargestellt, inwiefern rApi m 3 und rApi m 10 aufgrund der in dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse von Mehrwert für die Diagnostik der BG-Allergie sind.

6.1 Therapieansprecher und Therapieversager

Das erhöhte Therapieversagen der BG-SIT wurde in Vorarbeiten mit der Komplexität des BG-Gesamtextraktes mit seinen vielschichtigen molekularen Bestandteilen und dem Vorliegen einer Vielzahl von unterschiedlichen, individuellen Sensibilisierungsprofilen in Verbindung gebracht (Köhler et al., 2014, Ruëff et al., 2014, Ruëff et al., 2013, Adolph et al., 1986). Es wurden zusätzliche Risikofaktoren wie erhöhte basale Serumtryptasekonzentrationen, das Vorliegen einer Mastozytose, das Ereignis einer systemisch-allergischen Reaktion während der SIT-Aufdosierung oder bei der Verabreichung der Erhaltungsdosierung, sowie die Einnahme von ACE-Inhibitoren zum Zeitpunkt der Stichprovokation identifiziert (Ruëff et al., 2014, Gonzalez de Olano et al., 2011, Gonzalez de Olano et al., 2008).

Diese bekannten Risikofaktoren wurden in der vorgelegten Studie bei jedem Patienten durch Aktenstudium erfasst und ein Gruppenvergleich angestellt, um mögliche Confounder-Effekte zu erkennen. Der Gruppenvergleich der Therapieansprecher und Therapieversager ergab vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf Alter und Geschlechtsverteilung, der Einnahme einer antihypertensiven Therapie zum Zeitpunkt der Stichprovokation, insbesondere von ACE-Inhibitoren, des prozentualen Anteils der Durchführung einer Doppel-SIT, sowie der Behandlungsdauer vor der Stichprovokation. Einschlusskriterien der Studie bestanden lediglich in einer mindestens 6 Monate durchgeführten BG-SIT mit einer Erhaltungsdosierung von 100 µg BG. Mit dem Ziel einer möglichst repräsentativen Kollektiv-Verteilung wurden keine Ausschlusskriterien formuliert. Infolgedessen zeigten sich folgende Gruppenunterschiede:

In der Gruppe der Therapieversager war ein vermehrter Anteil an höhergradigen Stichreaktionen zu dokumentieren (Grad III und IV nach Ring und Messmer: Therapieversager 33,2 % vs. Therapieansprecher 21,6 %). Dieser Umstand kann jedoch nicht als Confounder betrachtet werden, weil eine bereits durchgeführte Analyse eines großen Kollektives den Grad der Stichreaktion nicht als Risikofaktor für ein späteres Therapieversagen verifizieren konnte (Ruëff et al., 2014).

Ein weiterer Unterschied konnte in der Anzahl der Patienten mit erhöhter Serumtryptase und / oder dem Vorliegen einer Mastozytose beobachtet werden. Beide Faktoren gelten als bedeutsame Risikofaktoren für ein Therapieversagen, wären entsprechend häufiger innerhalb der Gruppe der Therapieversager zu erwarten, waren aber tatsächlich in der Gruppe der Therapieansprecher prozentual

häufiger. Aufgrund des kleineren Anteils in der Therapieversager-Gruppe ist auch dieser Verteilungsunterschied nicht als Confounder zu bewerten, sondern vielmehr als Zufall aufgrund der beschränkten Fallzahl, welcher die aktuelle Studie nicht beeinflusst.

Das Ziel der Studie lag in der Prüfung der Hypothese, ob die von Blank et al. beschriebene Unterrepräsentanz von Api m 3 und Api m 10 in therapeutischen BG-Präparaten von Bedeutung für ein Therapieversagen der BG-SIT ist (Blank et al., 2011).

Zunächst einmal zeigte das Gesamtkollektiv ein breites Sensibilisierungsspektrum und bestätigte die bereits erhobene Datenlage (Köhler et al., 2014). Neben Api m 1 konnte sich Api m 10 erneut als Majorallergen sicher (Sensibilisierung bei 72,2 % der Patienten), Api m 3 grenzwertig behaupten (Sensibilisierung bei 49,6 % der Patienten).

Im Gruppenvergleich der Sensibilisierungsprofile zeigte sich ein diskret höherer Sensibilisierungsgrad gegen BG-Gesamtextrakt in der Gruppe der Therapieversager. sIgE gegen rApi m 1, rApi m 2, rApi m 3 und rApi m 5 waren in beiden Gruppen statistisch gleichverteilt. In beiden Gruppen war ein breites Sensibilisierungs-Verteilungsmuster bei allen Allergenen ersichtlich. Auffällig war jedoch ein signifikant höheres sIgE-Niveau gegen rApi m 10 bei den Therapieversagern. Die beste Differenzierung zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern wurde bei einem sIgE gegen rApi m 10 in Höhe von 1,82 kU_A/l mit einer Spezifität von 71 % und einer Sensitivität von 70 % berechnet. Um eine Spezifität von 95 % zu erreichen wurde ein sIgE-Level gegen rApi m 10 in Höhe von 26,55 kU_A/l notwendig. Dies beinhaltete ein Sensitivitätsverlust auf 8,3 %.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Bewertung der ROC-Kurve des sIgE gegen rApi m 10 als ausschließlicher Parameter zwar signifikant ist (AUC 0,687 mit P-Wert 0,001), jedoch weit davon entfernt ist, einen Risikofaktor für ein Therapieversagen der BG-SIT für Patienten mit einer BG-Allergie repräsentieren zu können.

Aufgrund der bezüglich der Quantität sehr individuellen IgE-Immunantwort jedes Menschen zogen wir die Bedeutung der Höhe der Ratio des sIgE gegen das

jeweilige Einzelallergen im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt bzw. im Verhältnis zum Gesamt-IgE in Betracht. Die dahinter stehende Rationale war, dass beispielsweise ein Patient mit lediglich geringgradig erhöhtem sIgE gegen ein Einzelallergen, z.B. rApi m 10, bei gleichzeitig relativ kleinem sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt bzw. relativ kleinem Gesamt-IgE, eine verhältnismäßig hohe Reaktivität gegen bzw. hohen Anteil an sIgE gegen rApi m 10 aufweist und damit, gemäß der Hypothese eines erhöhten Risikos des Therapieversagens bei rApi m 10-Dominanz, aufgrund einer beschriebenen Unterrepräsentanz von Api m 10 im therapeutischen Extrakt (Blank et al., 2011) nicht oder nur ungenügend von der BG-SIT profitieren kann.

In der Tat war der sIgE-Anteil des rApi m 10 am Gesamtextrakt in der Gruppe der Therapieversager signifikant höher als in der Gruppe der Therapieansprecher. Besonders deutlich wurde der Unterschied ab einem BG-sIgE-Anteil gegen rApi m 10 von > 50 %: lediglich 3/79 (3,8 %) der Therapieansprecher-Seren erreichten die 50 %-Marke, der höchste rApi m 10-Anteil lag bei den Therapieansprechern bei 52 %. Demgegenüber lagen 25 % der Therapieversager über der 50 %-Marke (9/36 Seren). Diese Beobachtung konnte durch Anwendung der ROC-Kurve bestätigt werden: Bei einer Dominanz des sIgE gegen rApi m 10, d.h. wenn > 50 % des sIgE gegen rApi m 10 gerichtet waren, zeigte der Test eine nun verbesserte Spezifität von 96,2 % bei einer Sensitivität von 25 %. Dies dokumentierte sich in entsprechenden Ergebnissen bei der Berechnung der Kontingenztafeln: Bei steigendem BG-sIgE-Anteil gegen rApi m 10 stieg die OR für ein Therapieversagen deutlich an. Bei einer rApi m 10-Ratio > 50 % bestand eine OR von 8,44 (95 %-KI 2,127 - 33,53; p-Wert 0,0013) für das Eintreten eines Therapieversagens. Für rApi m 3 und die übrigen Einzelallergene konnte kein Gruppenunterschied festgehalten werden.

Die Bestimmung des Einzelallergen-Anteils am Gesamt-IgE bestätigte den rApi m 10-spezifischen Gruppenunterschied erneut. Wiederum war in der Gruppe der Therapieversager eine signifikant höhere rApi m 10-Ratio ersichtlich, wenn auch nicht so ausgeprägt wie in der zuvor angestellten BG-sIgE-Ratio. Die übrigen Einzelallergene wiesen erneut keine Gruppenunterschiede auf. Ein möglicher Erklärungsansatz für das weniger deutliche Resultat könnte in der kleineren Gruppengröße (n = 107 gegenüber n = 115) liegen. Hinzu kommt, dass bei einer

Vielzahl der Patienten die Gesamt-IgE-Bestimmung nicht mit den übrigen sIgE-Bestimmungen und in verschiedenen Laboratorien vorgenommen wurde.

Beim Vergleich der beiden Gruppen zum Zeitpunkt vor der Stichprovokation ergab sich das gleiche Gesamtbild mit etwas schwächerem Signal. Erneut zeigten sich bei den Therapieversagern moderat, aber signifikant erhöhte sIgE-Absolutwert-Niveaus gegen rApi m 10 und wiederum war auch die BG-sIgE-Ratio beim rApi m 10 in der Therapieversager-Gruppe signifikant erhöht. Eine mögliche Erklärung für die Signalabschwächung bestünde in der immunologischen Interaktion, welche durch die BG-SIT bedingt ist.

Zusammenfassend zeigte sich die beste Testauswertung bei der Analyse des prozentualen BG-sIgE-Anteils gegen rApi m 10 vor Beginn der SIT. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine dominante (> 50 %) Sensibilisierung gegen rApi m 10 einen relevanten Risikofaktor für ein Therapieversagen der BG-SIT bei Patienten mit BG-Allergie darstellt.

In diesem Kontext wurde nochmals das Vorkommen von Api m 1, Api m 3 und Api m 10 in verschiedenen BG-SIT-Therapeutika untersucht. Dafür wurden polyklonale Kaninchen-Antiseren verwendet, um die Ergebnisse der Vorarbeit zu prüfen, welche rekombinante menschliche IgE-Antikörper einsetzte (Blank et al., 2011). Es wurden nun polyklonale Antiseren verwendet, weil monoklonale Antikörper mit hoher Spezifität für ein einziges Epitop möglicherweise anfälliger für eine Beeinflussung durch Verlust ihrer Epitopstruktur durch Proteinentfaltung oder Proteinfragmentierung sind oder infolge des Vorliegens einer Isoformvariation konsekutiv eine niedrigere Sensitivität aufweisen könnten.

In allen therapeutischen BG-SIT-Präparaten konnte das Vorkommen von Api m 1 und Api m 3 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war Api m 10 in 3 der 5 BG-SIT-Therapeutika unterrepräsentiert. Diese Beobachtung bestätigte das Ergebnis der Vorarbeit. In den BG-Gesamtextrakten konnte der Nachweis des Vorliegens von Api m 10 erbracht werden. Bemerkenswert ist, dass fehlende zusätzliche Banden von Api m 10 das Vorliegen mutmaßlicher Isoformen von Api m 10 mit signifikant abweichender Molekülmasse unwahrscheinlich machen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das Fehlen von Api m 10 in therapeutischen BG-Präparaten nicht

hauptsächlich durch Proteinfragmentierung resultiert. Gegenwärtig wird spekuliert, dass die Aufbereitung / Aufreinigung des unverarbeiteten Bienengiftes während des Verarbeitungsprozesses zum Verlust der Api m 10-Immunreaktivität führt. In diesem Zusammenhang ist von großem Interesse, dass Api m 10 in den nicht-prozessierten BG-SIT-Therapeutika (z.B. Pharmalgen, ALK-Abelló) detektierbar war, nicht aber in denjenigen therapeutischen BG-SIT-Präparaten, die prozessiert / aufgereinigt wurden, um niedermolekulare Substanzen zu reduzieren (so z.B. Aquagen, ALK-Abelló). Dieser zusätzliche Prozessierungsschritt wurde eingeführt, um vasoaktive Mediatoren und kleine bioaktive Peptide zu extrahieren, welche mit unerwünschten, lokalen Nebenwirkungen der SIT in Verbindung gebracht wurden (Bilo et al., 2012, Bilo et al., 2009). Aufgrund des infolge der Molekülmasse unwahrscheinlichen direkten Verlustes von Api m 10 müssen andere indirekte Mechanismen während des Verarbeitungsprozesses für den schlussendlichen Mangel verantwortlich sein. Es empfiehlt sich eine Prüfung durch die Herstellerfirmen des jeweiligen Präparates.

Bei der Analyse der sIgG4-Werte erwarteten wir eine robuste Induktion und damit Erhöhung des sIgG4-Niveaus gegen die geprüften Allergene unter der BG-SIT aufgrund der immunologischen Auseinandersetzung des Organismus mit den im therapeutischen Extrakt enthaltenen Einzelallergenen, sofern diese enthalten sind.

Diese robuste Induktion zeigte sich tatsächlich beim BG-Gesamtextrakt und bei rApi m 1, jedoch kaum oder gar nicht bei rApi m 3 und rApi m 10. Die fehlende Induktion stützt im Rahmen der Ergebnisse der vorliegenden Studie die in 3 der 5 BG-SIT-Therapeutika bestätigte Unterrepräsentanz von Api m 10. Infolge der quantitativen Einzelallergenzusammensetzung des therapeutischen Extraktes mit Mangel an Api m 10 findet konsekutiv keine suffiziente immunologische Interaktion des Organismus statt. Bezüglich der fehlenden sIgG4-Induktion gegen rApi m 3 könnte als Erklärungsansatz dienen, dass Api m 3 einen geringen Anteil am Trockengewicht des Gesamtextraktes einnimmt und folglich keine suffiziente Induktion objektivierbar ist: Während Api m 1 ein reichlich vorhandenes Einzelallergen mit bis zu 12 % Anteil am BG-Trockengewicht ist, sind Api m 3 und Api m 10 mit 1 – 2 % und < 1 % in sehr viel kleineren Mengen bzw. sehr spärlich vertreten.

Für rApi m 3 ist die aufgestellte Hypothese entsprechend lediglich auf die slgG4-Ergebnisse bezogen haltbar. Die vorliegenden slgE-Ergebnisse erlauben keine Korrelation zur Hypothese, welche damit für rApi m 3 bezüglich eines Therapieversagens verworfen werden muss. Eine mögliche Erklärung hierfür läge in einer, entgegen von Blank et al. berichteten, tatsächlichen Verfügbarkeit im therapeutischen Extrakt, gegebenenfalls in sehr geringer Quantität, welche sich zwar nicht in einer slgG4-Induktion widerspiegelt, jedoch im Rahmen einer regelmäßig durchgeführten SIT ausreichend und zielführend ist.

Die slgG4-Induktion erlaubte zwar keine Differenzierung zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern infolge ähnlicher Verteilungen und nicht signifikanter Ratio-Berechnungen. Nach Einteilung der Patientenserien gemäß Vorhandensein oder Fehlen von Api m 10 im BG-SIT-Präparat konnte jedoch interessanterweise eine zwar niedrige, aber dennoch signifikante slgG4-Induktion gegen rApi m 10 nur bei denjenigen Patientenserien beobachtet werden, die mit BG-SIT-Präparaten behandelt wurden, welche detektierbare Mengen an Api m 10 enthielten.

Eine Limitierung der Studie liegt einerseits im retrospektiven Design, andererseits konnte trotz Kollaboration von insgesamt 6 klinischen Zentren nur eine begrenzte Anzahl von 115 Seren akquiriert werden. Die eingeschränkte Anzahl an Seren, insbesondere an Therapieversager-Seren ($n = 36$), liegt in der Rarität der zur Verfügung stehenden Seren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bzw. vor Beginn der SIT, welche zumeist Jahre zurückliegt, insbesondere von Patienten, welche bis zu einer durchgeführten Stichprovokation begleitet wurden, begründet. Es wäre entsprechend wünschenswert, eine prospektive Studie durchzuführen, welche gestärkt durch eine hohe Fallzahl die gesammelten Parameter erneut untersucht.

Die ROC-Kurven und die positiven Likelihood-Ratios sind sicherlich weniger eindrucksvoll als diejenigen von anderen Risikofaktoren, so z.B. von Ara h 2 im Rahmen der Erdnuss-Allergie-Abklärung. Dies könnte durch den Fakt bedingt sein, dass Risikomarker wie Ara h 2 diagnostisch zur Detektion von slgE-Sensibilisierungen verwendet werden, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer schweren anaphylaktischen Reaktion assoziiert sind. Im Gegensatz

dazu wurde in dieser Studie im Rahmen molekularer Diagnostik mittels Einsatz von Einzelallergenen untersucht, ob bestimmte Sensibilisierungsprofile mit dem Therapieansprechen der BG-SIT assoziiert sind. Die Studie wurde von der Frage geleitet, ob bestimmte Sensibilisierungsprofile differenzierbar sind, welche mit einem Therapieversagen in Verbindung stehen. In diesem Kontext besteht die Hürde möglicherweise noch höher, um signifikante und klinisch umsetzbare Unterschiede zu detektieren. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass multiple Variablen das Ergebnis der therapeutischen Methode beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Studie konnten jedoch trotz der zu Grunde liegenden Limitierungen die Hypothese bestätigen, dass Patienten, die eine dominante rApi m 10-Sensibilisierung aufweisen, ein erhöhtes Risiko für einen unzureichenden Schutz infolge der BG-SIT bzw. für das Eintreten eines Therapieversagens haben. Zusätzlich konnte aufgezeigt werden, dass einige der zur BG-SIT verwendeten Therapeutika einen Mangel an Api m 10 aufweisen. In diesem Zusammenhang konnte dargestellt werden, dass die slgG4-Induktion von der Verfügbarkeit von Api m 10 im BG-SIT-Therapeutikum abhängig ist. Die beobachteten Unterschiede der beiden Gruppen bezüglich der verschiedenen rApi m 10-Messungen und rApi m 10-Berechnungen waren relativ klein, behaupteten sich jedoch durchgehend konsistent: beginnend bei den rApi m 10-slgE-Absolutwerten, über die Ratioberechnungen des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt, bis hin zur Ratio des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum Gesamt-IgE.

Die beste Datenlage wurde durch die Analyse des prozentualen Anteils des slgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum slgE gegen das BG-Gesamtextrakt vor der SIT erzielt. Diese Daten legen nahe, dass eine dominante (> 50 %) rApi m 10-Sensibilisierung einen relevanten Risikofaktor für ein Therapieversagen der BG-SIT bei der BG-Allergie darstellt. Die Bestimmung von rApi m 10 erlaubte eine signifikante Risikostratifikation auf labordiagnostischer Ebene und sollte aufgrund dessen für die routinemäßige BG-Allergiediagnostik eingesetzt werden. Des Weiteren sollten Patienten mit einer nachgewiesenen dominanten rApi m 10-Sensibilisierung eine BG-SIT mit einem therapeutischen Präparat erhalten, welches eine suffiziente Menge an Api m 10 aufweist. Eine nach dem individuellen Sensibilisierungsprofil gerichtete BG-SIT könnte sich folglich als potenter Schutz

erweisen. Zur Evaluation der Validität dieses spezifischen Therapieweges sind weitere Studien notwendig, welche den Benefit einer Behandlung mittels Api m 10-enthaltenden Präparaten bei Patienten mit einer dominanten rApi m 10-Sensibilisierung prüfen.

6.2 Kollektiv bienengift- und wespengiftsensibilisierter Patienten

Während die zur WG-Allergie-Diagnostik verwendeten Markerallergene rVes v 1 und rVes v 5 eine Sensitivität von > 95 % aufweisen, liegt die Sensitivität bei der BG-Diagnostik mittels des bis vor kurzem einzig verfügbaren Einzelallergens rApi m 1 mit 58 – 80 % (Hofmann et al., 2011, Müller et al., 2012, Korosec et al., 2011, Köhler et al., 2014) deutlich tiefer und hinterlässt folglich eine große Lücke in der BG-Allergie-Diagnostik. Doppelpositive sIgE-Testungen gegen BG und WG zeigen nicht immer eine genuine Doppelsensibilisierung an, sondern sind in bis zu der Hälfte der Fälle durch Kreuzreaktivitäten bedingt (Egner et al., 1998, Hoffman et al., 1980). Diese können auf Proteinhomologien der Gifte beider Insektengiftentitäten (u.a. die Hyaluronidasen Api m 2 und Ves v 2, die Dipeptidylpeptidasen Api m 5 und Ves v 3, sowie die Vitellogenine Api m 12 und Ves v 6) und auf Kreuzreaktivitäten infolge CCDs auf Kohlenhydratebene beruhen. Durch den Einsatz von CCD-freien, rekombinant hergestellten Markerallergenen, welche insektenspezifisch BG oder WG vertreten, kann entsprechend zwischen einer BG- und WG-Allergie differenziert, bzw. eine genuine Doppelsensibilisierung klar zugeordnet werden

Die niedrige Sensitivität von rApi m 1 und die in vielen Fällen nicht mögliche Differenzierung zwischen einer BG- und einer WG-Allergie, bzw. die fehlende Möglichkeit der Verifizierung einer genuinen Doppelsensibilisierung, führte uns dazu, die Diagnostik mit rekombinant hergestellten, CCD-freien Einzelallergenen zu ergänzen, um ihren Mehrwert für die Diagnosestellung zu prüfen.

Zu diesem Zweck untersuchten wir ein Kollektiv von 755 Patienten mit eindeutiger Anamnese einer Hymenopterenengiftallergie, welche in der Universitätsklinik Freiburg zur Diagnosestellung und Einleitung einer Therapie vorstellig wurden. Von besonderem Interesse war die Untersuchung derjenigen Patienten, welche im Rahmen der herkömmlichen Diagnostik als doppelt-positiv gegen BG und WG eingestuft worden waren, ganz besonders dann, wenn das allergieauslösende

Stechinsekt nicht identifiziert wurde. Dieses Interesse gründete auf der damit einhergehenden diagnostischen und folglich weitreichenden therapeutischen Unsicherheit.

In der Gruppe der Patienten, bei welchen das Stechinsekt nicht identifiziert wurde und das IgE gegen rApi m 1 $< 0,35$ kU_A/l lag, wurde mit Hilfe der Bestimmung der spezie-spezifischen Allergene rApi m 3 und rApi m 10 in 65,4 % (31/58) eine Sensibilisierung gegen BG nachgewiesen. Dies indizierte bei diesen Patienten eine BG-SIT, welche sie ohne die zusätzliche Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 nicht erhalten hätten. In Kombination von rApi m 1, rApi m 3 und rApi m 10 konnte eine Sensibilisierung in 78,6 % gezeigt werden, dies gegenüber von 54,0 % im Rahmen der alleinigen Bestimmung von rApi m 1. Durch die Bestimmung von nApi m 4 konnte keine zusätzliche Sensibilisierung nachgewiesen werden. Durch Addition von rApi m 2 und rApi m 5 wurde die Sensibilisierungsrate auf 87,6 % erhöht.

In der Gruppe der Patienten, welche als Stechinsekt eine Biene angaben, konnten mit Hilfe von rApi m 3 und rApi m 10 13/28 (46,4 %) rApi m 1-negative Seren $\geq 0,35$ kU_A/l gemessen werden. Bei diesen 13 Patienten ist entsprechend eine BG-SIT indiziert, ohne die Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 hätte die labordiagnostisch gesicherte Indikationsstellung nicht erfolgen können. Die Ergänzung von rApi m 3 und rApi m 10 bewirkte eine Steigerung der Sensitivität gegenüber der alleinigen Bestimmung von rApi m 1 von 66,3 % auf 81,9 %. Mittels der Testung der IgE-Reaktivität gegen nApi m 4 konnten 2 weitere Seren positiv gemessen werden, welche gegenüber rApi m 3 und rApi m 10 normwertig waren. Durch Zusatz von nApi m 4 konnte die BG-Sensibilisierung in dieser Gruppe auf 84,3 % erhöht werden. Die ergänzende Bestimmung von rApi m 2 und rApi m 5 erbrachte den Nachweis einer IgE-Sensibilisierung in 92,7 %.

Die zusätzliche Bestimmung von rApi m 2 und rApi m 5 erbrachte entsprechend eine deutliche Steigerung der Sensitivität. Aufgrund ihrer Proteinhomologie zu rVes v 2 und rVes v 3 und der konsekutiv potentiellen Kreuzreaktivität ist ihre diagnostische Aussagekraft jedoch eingeschränkt, insbesondere bei Patienten, welche das Stechinsekt nicht sicher identifizierten. Die Bestimmung erbrachte eine verbesserte Sensitivität, zur Differenzierung zwischen einer BG- und einer WG-Allergie sind

jedoch nur bedingt Aussagen möglich. Diese Aussagekraft könnte jedoch gestärkt werden, wenn die proteinhomologen rVes v 2 und rVes v 3 zur Testung zur Verfügung stünden. Möglicherweise wird bei Verfügbarkeit auf Forschungsebene die Prüfung des individuellen Immunprofils die Verifizierung des primären und damit allergieauslösenden Allergens in Zukunft erlauben. Gegebenenfalls wäre dies anhand eines quantitativen sIgE-Vergleichs umsetzbar.

Aufgrund der zusätzlichen Bestimmung von rApi m 4 und zu bedeutenderem Anteil von rApi m 3 und rApi m 10 änderte sich das Sensibilisierungs-Befundbild im Vergleich zur Diagnostik mittels der aktuell standardisiert verwendeten Einzelallergene (rApi m 1, rVes v 5 und rVes v 1) deutlich. Es zeigte sich ein ausgeprägter Anstieg der genuinen BG- und WG-doppelpositiven Befunde (Gruppe Stechinsekt unbekannt: 43,7 % → 65,9 %; Gruppe Stechinsekt Biene: 43,4 % → 54,2 %; Gruppe Stechinsekt Wespe: 27,3 % → 46,4 %). Darüber hinaus war die BG-Diagnostik durch die Detektion von, im Rahmen der ausschließlichen Bestimmung von rApi m 1 unerkannten, BG-Monosensibilisierungen verbessert (Gruppe Stechinsekt unbekannt: 10,3 % → 12,7 %; Gruppe Stechinsekt Biene: 22,8 % → 27,7 %; Gruppe Stechinsekt Wespe: 0 % → 0,9 %). Korrelierend senkte sich die Anzahl der im Rahmen der herkömmlichen Diagnostik befundeten Monosensibilisierungen gegen WG (Gruppe Stechinsekt unbekannt: 43,7 % → 21,4 %; Gruppe Stechinsekt Biene: 26,5 % → 15,7 %; Gruppe Stechinsekt Wespe: 70,9 % → 51,8 %). Außerdem wurde die Zahl der gegen BG und WG doppelnegativen Fälle mit Hilfe der zusätzlichen Einzelallergene verringert (Gruppe Stechinsekt unbekannt: 3 → 0; Gruppe Stechinsekt Biene: 6 → 2; Gruppe Stechinsekt Wespe: 2 → 1).

Von besonderer Bedeutung war die Prüfung des Mehrwertes der erweiterten Einzelallergenbestimmung in der Gruppe der Patienten, welche das allergieauslösende Stechinsekt nicht identifizieren konnten. In dieser Gruppe war die labordiagnostische Detektion der individuellen Sensibilisierung besonders wichtig, um sie einer adäquaten SIT zuführen zu können. Die zusätzliche Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 ermöglichte die Identifikation von 31 Patienten mit Sensibilisierung gegen BG, welche durch die Bestimmung von rApi m 1 nicht erkannt worden wären. Entsprechend konnte durch den Einsatz von rApi m 3 und rApi m 10 als diagnostische Marker die Indikation für eine BG-SIT für weitere 31 Patienten

gestellt werden. Anstelle von 54,0 % bestand die medizinische Indikation für die BG-SIT für 78,6 % der Patienten dieses Kollektivs.

Die durch rApi m 3 und rApi m 10 verbesserte und damit einhergehende an Sicherheit deutlich gesteigerte Diagnosestellung und direkt davon abhängige individuell-gezielte, protektive SIT empfiehlt die labordiagnostische Ergänzung des unter dessen kommerziell verfügbaren rApi m 10. Sobald rApi m 3 zum kommerziellen Einsatz zur Verfügung steht, ist die Erweiterung des labor-diagnostischen Repertoires um rApi m 3, insbesondere bei Patienten, welche das allergieauslösende Insekt nicht sicher identifizieren konnten, eine effektive Verstärkung der BG-Allergiediagnostik.

Offen bleibt die Frage, wie mit denjenigen Patienten in der Gruppe mit nicht-identifiziertem Stechinsekt verfahren werden soll, bei denen eine doppelt-negative Befundstellung vorliegt. Die Bestimmung der Einzelallergene rApi m 1, rApi m 3 und rApi m 10 erreichte in Kombination eine Sensitivität von 81,9 % (Ergebnis dieser Studie, Gruppe Stechinsekt Biene). Dies bedeutet, dass knapp ein Fünftel der Patienten nicht erkannt wird, entsprechend weiter eine erhebliche diagnostische Lücke vorliegt. Weiter muss auf einer individuellen Ebene entschieden werden, ob Patienten mit unbekanntem Stechinsekt, welche eine Doppelpositivität gegen die Gesamtextrakte BG und WG aufweisen, jedoch auf Einzelallergen-Basis nur gegen rVes v1 und / oder rVes v5 positiv und gegen die BG-Einzelallergene rApi m 1, rApi m 3 und rApi m 10 negativ sind, ausschließlich eine WG-SIT oder zusätzlich eine BG-SIT erhalten sollten.

7 Zusammenfassung

Systemisch-allergische Reaktionen gegen Hymenopterenstiche mit u.a. Bienengift (BG) oder Wespengift (WG) treten bei 0,3 - 3,5 % der erwachsenen Bevölkerung auf. Ausschließlich die spezifische Immuntherapie (SIT) schützt allergische Patienten vor systemischen, lebensbedrohlichen Reaktionen auf Folgestiche. Die Effektivität der SIT hängt von einer Reihe von Variablen ab, u.a. der Therapiedauer und der Erhaltungsdosierung der SIT. Insbesondere zeigt sich ein Therapieversagen häufiger bei der BG- als bei der WG-SIT (11 - 23 % vs. 0 - 9 %). Eine vorhergehende Studie, welche das Ergebnis von > 1600 Stichprovokationen untersuchte, zeigte ein Risiko (OR) von > 5 für ein Therapieversagen der BG-SIT im Vergleich zur WG-SIT. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie zeigen, dass Patienten mit einer dominanten rApi m 10-Sensibilisierung ein erhöhtes Risiko für ein Therapieversagen haben. Bei steigendem sIgE-Anteil gegen rApi m 10 erhöhte sich die OR für ein Therapieversagen deutlich. Bei einem rApi m 10-Anteil im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt von > 50 % lag eine OR von > 8 vor. Die Untersuchung von BG-SIT-Therapeutika zeigte, dass diese z.T. einen deutlichen Api m 10-Mangel aufweisen. Korrelierend konnte nur bei Seren eine signifikante sIgG4-Induktion gegen rApi m 10 gemessen werden, welche mit BG-SIT-Therapeutika behandelt wurden, die einen suffizienten Api m 10-Gehalt hatten. Es besteht zudem eine deutliche diagnostische Unterlegenheit der BG-Allergie gegenüber der WG-Allergie (Sensitivität 58 – 80 % vs. > 95 %). Zur BG-Allergiediagnostik ist neben dem BG-Gesamtextrakt ausschließlich rApi m 1 als Einzelallergen verfügbar. In dieser Studie wird gezeigt, dass die zusätzliche Testung von rApi m 3 und rApi m 10 die Detektion einer BG-Sensibilisierung bei 46 - 65 % der gegen rApi m 1 negativen Seren ermöglicht. Dies ist besonders bei Patienten mit einer BG- und WG-Doppelsensibilisierung von großer Bedeutung, die das Stechinsekt nicht identifizierten. Folglich können Patienten der BG-SIT zugeführt werden, welche ansonsten nicht erkannt worden wären.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass BG-allergische Patienten mit dominanter Sensibilisierung gegen rApi m 10 ein erhöhtes Risiko für ein Therapieversagen haben und mit einem Api m 10-enthaltenden SIT-Therapeutikum behandelt werden sollten. Die Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 verbessert die diagnostische Präzision der BG-Allergie signifikant und ermöglicht ansonsten unerkannten Patienten von einer BG-SIT profitieren zu können.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

- AALBERSE, R. C., AKKERDAAS, J. & VAN REE, R. 2001. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*, 56, 478-90.
- ADOLPH, J., DEHNERT, I., FISCHER, J. F. & WENZ, W. 1986. [Results of hyposensitization with bee and wasp venom]. *Z Erkr Atmungsorgane*, 166, 119-24.
- ARMBRUSTER, D. A. & PRY, T. 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*, 29 Suppl 1, S49-52.
- BAKER, T. W., FORESTER, J. P., JOHNSON, M. L., SIKORA, J. M., STOLFI, A. & STAHL, M. C. 2016. Stinging insect identification: Are the allergy specialists any better than their patients? *Ann Allergy Asthma Immunol*, 116, 431-4.
- BILO, B. M., RUËFF, F., MOSBECH, H., BONIFAZI, F., OUDE-ELBERINK, J. N. & HYPERSENSITIVITY, E. I. G. O. I. V. 2005. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 60, 1339-49.
- BILO, M. B., CINTI, B., BRIANZONI, M. F., BRASCHI, M. C., BONIFAZI, M. & ANTONICELLI, L. 2012. Honeybee venom immunotherapy: a comparative study using purified and nonpurified aqueous extracts in patients with normal Basal serum tryptase concentrations. *J Allergy (Cairo)*, 2012, 869243.
- BILO, M. B., SEVERINO, M., CILIA, M., PIO, A., CASINO, G., FERRARINI, E., CAMPODONICO, P. & MILANI, M. 2009. The VISYT trial: Venom Immunotherapy Safety and Tolerability with purified vs nonpurified extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 103, 57-61.
- BLANK, S., SEISMANN, H., MICHEL, Y., MCINTYRE, M., CIFUENTES, L., BRAREN, I., GRUNWALD, T., DARSOW, U., RING, J., BREDEHORST, R., OLLERT, M. & SPILLNER, E. 2011. Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy*, 66, 1322-9.
- EGNER, W., WARD, C., BROWN, D. L. & EWAN, P. W. 1998. The frequency and clinical significance of specific IgE to both wasp (*Vespula*) and honey-bee (*Apis*) venoms in the same patient. *Clin Exp Allergy*, 28, 26-34.
- GOLDBERG, A. & CONFINO-COHEN, R. 1997. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 100, 182-4.
- GOLDEN, D. B., KELLY, D., HAMILTON, R. G. & CRAIG, T. J. 2009. Venom immunotherapy reduces large local reactions to insect stings. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 1371-5.

- GOLDEN, D. B., MARSH, D. G., KAGEY-SOBOTKA, A., FREIDHOFF, L., SZKLO, M., VALENTINE, M. D. & LICHTENSTEIN, L. M. 1989. Epidemiology of insect venom sensitivity. *JAMA*, 262, 240-4.
- GONZALEZ DE OLANO, D., ALVAREZ-TWOSE, I., ESTEBAN-LOPEZ, M. I., SANCHEZ-MUNOZ, L., DE DURANA, M. D., VEGA, A., GARCIA-MONTERO, A., GONZALEZ-MANCEBO, E., BELVER, T., HERRERO-GIL, M. D., FERNANDEZ-RIVAS, M., ORFAO, A., DE LA HOZ, B., CASTELLS, M. C. & ESCRIBANO, L. 2008. Safety and effectiveness of immunotherapy in patients with indolent systemic mastocytosis presenting with Hymenoptera venom anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 519-26.
- GONZALEZ DE OLANO, D., ALVAREZ-TWOSE, I., VEGA, A., ORFAO, A. & ESCRIBANO, L. 2011. Venom immunotherapy in patients with mastocytosis and hymenoptera venom anaphylaxis. *Immunotherapy*, 3, 637-51.
- HEPPT, W. & BACHERT, C. 2011. *Praktische Allergologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2011. 13-23.
- HOFFMAN, D. R., DOVE, D. E. & JACOBSON, R. S. 1988. Allergens in Hymenoptera venom. XX. Isolation of four allergens from imported fire ant (*Solenopsis invicta*) venom. *J Allergy Clin Immunol*, 82, 818-27.
- HOFFMAN, D. R. & JACOBSON, R. S. 1984. Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting? *Ann Allergy*, 52, 276-8.
- HOFFMAN, D. R., MILLER, J. S. & SUTTON, J. L. 1980. Hymenoptera venom allergy: a geographic study. *Ann Allergy*, 45, 276-9.
- HOFMANN, S. C., PFENDER, N., WECKESSER, S., HUSS-MARP, J. & JAKOB, T. 2011. Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 265-7.
- HOMPES, S., KIRSCHBAUM, J., SCHERER, K., TREUDLER, R., PRZYBILLA, B., HENZGEN, M. & WORM, M. 2008. Erste Daten der Pilotphase des Anaphylaxie-Registers im deutschsprachigen Raum. *Allergo J*, 17, 550-5.
- JAPPE, U., RAULF-HEIMSOTH, M., HOFFMANN, M., BUROW, G., HUBSCHMULLER, C. & ENK, A. 2006. In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy*, 61, 1220-9.
- KÖHLER, J., BLANK, S., MULLER, S., BANTLEON, F., FRICK, M., HUSS-MARP, J., LIDHOLM, J., SPILLNER, E. & JAKOB, T. 2014. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 1383-9, 1389 e1-6.
- KOROSEC, P., VALENTA, R., MITTERMANN, I., CELESNIK, N., ERZEN, R., ZIDARN, M. & KOSNIK, M. 2011. Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 128, 671-3.

- KOSCHEL, D. S., SCHMIES, M., WEBER, C. N., HOFFKEN, G. & BALCK, F. 2014. Tolerated sting challenge in patients on Hymenoptera venom immunotherapy improves health-related quality of life. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 24, 226-30.
- MAUSS, V. 2008. [Bionomics and defensive behaviour of bees and diplopterous wasps (Hymenoptera, Apidae, Vespidae) causing venom allergies in Germany]. *Hautarzt*, 59, 184, 186-93.
- MOSBECH, H. 1983. Death caused by wasp and bee stings in Denmark 1960-1980. *Allergy*, 38, 195-200.
- MÜLLER, U., SCHMID-GRENDELMEIER, P., HAUSMANN, O. & HELBLING, A. 2012. IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy*, 67, 1069-73.
- MÜLLER, U. R. 1988. Insektenstichallergie: Klinik, Diagnostik und Therapie. 1. Aufl. Fischer, Stuttgart, New York.
- OLLERT, M. & BLANK, S. 2015. Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep*, 15, 26.
- PRZYBILLA, B., RING, J. & RUËFF, F. 2007. Anaphylaxie - Klinisches Bild und Diagnose. *Hautarzt*, 58, 1025-31.
- PRZYBILLA, B., RUËFF, F., WALKER, A., RÄWER, H., ABERER, W., BAUER, C. P., BERDEL, D., BIEDERMANN, T., BROCKOW, K., FORSTER, J., FUCHS, T., HAMELMANN, E., JAKOB, T., JARISCH, R. & MERK, H. F. 2011. Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. *Allergo J*, 20, 318-39.
- PUCCI, S., D'ALO, S., DE PASQUALE, T., ILLUMINATI, I., MAKRI, E. & INCORVAIA, C. 2015. Risk of anaphylaxis in patients with large local reactions to hymenoptera stings: a retrospective and prospective study. *Clin Mol Allergy*, 13, 21.
- RIEGER-ZIEGLER, V., RIEGER, E., KRANKE, B. & ABERER, W. 1999. Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first weeks after a sting. *Int Arch Allergy Immunol*, 120, 166-8.
- RING, J., BEYER, K., BIEDERMANN, T., BIRCHER, A., DUDA, D., FISCHER, J., FRIEDRICH, F., FUCHS, T., GIELER, U., JAKOB, T., KLIMEK, L., LANGE, L., MERK, H. F., NIGGEMANN, B., PFAAR, O., PRZYBILLA, B., RUËFF, F., RIETSCHEL, E., SCHNADT, S., SEIFERT, R., SITTER, H., VARGA, E.-M., WORM, M. & BROCKOW, K. 2014. Leitlinie zu Akuttherapie und Management der Anaphylaxie. *Allergo J Int*, 23, 96-112.
- RING, J. & MESSMER, K. 1977. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet*, 1, 466-9.

- RUEFF, F., PRZYBILLA, B., BILO, M. B., MULLER, U., SCHEIPL, F., SEITZ, M. J., ABERER, W., BODZENTA-LUKASZYK, A., BONIFAZI, F., CAMPI, P., DARSOW, U., HAEBERLI, G., HAWRANEK, T., KUCHENHOFF, H., LANG, R., QUERCIA, O., REIDER, N., SCHMID-GRENDELMEIER, P., SEVERINO, M., STURM, G. J., TREUDLER, R. & WUTHRICH, B. 2013. Clinical effectiveness of hymenoptera venom immunotherapy: a prospective observational multicenter study of the European academy of allergology and clinical immunology interest group on insect venom hypersensitivity. *PLoS One*, 8, e63233.
- RUËFF, F., PRZYBILLA, B., FUCHS, T., GALL, H., RAKOSKI, J., STOLZ, W. & VIELUF, D. 2000. Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie. *Allergo J*, 9, 458-72.
- RUËFF, F., PRZYBILLA, B., MULLER, U. & MOSBECH, H. 1996. 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*, 51, 216-25.
- RUËFF, F., VOS, B., OUDE ELBERINK, J., BENDER, A., CHATELAIN, R., DUGAS-BREIT, S., HORNY, H. P., KUCHENHOFF, H., LINHARDT, A., MASTNIK, S., SOTLAR, K., STRETZ, E., VOLLRATH, R., PRZYBILLA, B. & FLAIG, M. 2014. Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 44, 736-46.
- RUËFF, F., WENDEROTH, A. & PRZYBILLA, B. 2001. Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol*, 108, 1027-32.
- SALOGA, J., KLIMEK, L., BUHL, R., MANN, W. & KNOP, J. 2006. Allergologie-Handbuch. Grundlagen und klinische Praxis. 1. Aufl. Schattauer GmbH, Stuttgart.
- SCHÄFER, T. 2009. Epidemiologie der Insektengiftallergie. *Allergo J*, 18, 353-8.
- SPILLNER, E., BLANK, S. & JAKOB, T. 2014. Hymenoptera allergens: from venom to "venome". *Front Immunol*, 5, 77.
- TAN, J. W. & CAMPBELL, D. E. 2013. Insect allergy in children. *J Paediatr Child Health*, 49, E381-7.
- VAN VAERENBERGH, M., DEBYSER, G., DEVREESE, B. & DE GRAAF, D. C. 2014. Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *J Proteomics*, 99, 169-78.
- ZHANG, Z. Q. 2013. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013). *Zootaxa*, 3703, 1-82.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anaphylaxiegrade	11
Tabelle 2: Differenzierungsmöglichkeit zwischen Bienen und Wespen	16
Tabelle 3: Aktuell bekannte Einzelallergene im BG und WG	19
Tabelle 4: Demographische und klinische Daten der Therapieansprecher und Therapieversager	30
Tabelle 5: OR für ein Therapieversagen der SIT aufgrund Berechnung labor-diagnostischer Daten vor der SIT	45
Tabelle 6: OR für ein Therapieversagen der SIT aufgrund Berechnung labor-diagnostischer Daten vor der Stichprovokation	47

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der sIgE-Reaktivitäten gegen Einzelallergene beim Gesamtkollektiv vor Beginn der SIT	31
Abbildung 2: sIgE-Reaktivitäten gegen Einzelallergene vor Beginn der SIT im Gruppenvergleich	33
Abbildung 3: sIgE-Reaktivitäten gegen Einzelallergene vor der Stichprovokation im Gruppenvergleich	34
Abbildung 4: Prozentuale Darstellung des sIgE gegen das Einzelallergen im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt	35
Abbildung 5: Prozentualer Anteil des sIgE gegen individuelle Einzelallergene im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt im Gruppenvergleich vor Beginn der SIT	36
Abbildung 6: Prozentualer Anteil des sIgE gegen individuelle Einzelallergene im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt im Gruppenvergleich vor der Stichprovokation	37
Abbildung 7: Prozentualer Anteil des sIgE gegen individuelle Einzelallergene im Verhältnis zum Gesamt-IgE im Gruppenvergleich vor Beginn der SIT.....	38
Abbildung 8: ROC-Analyse des sIgE gegen rApi m 10.....	40
Abbildung 9: ROC-Analyse des prozentualen Anteils des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt	41
Abbildung 10: ROC-Analyse des prozentualen Anteils des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum Gesamt-IgE	42

Abbildung 11: OR für verschiedene prozentuale Anteile des sIgE gegen rApi m 10 im Verhältnis zum sIgE gegen das BG-Gesamtextrakt vor Beginn der SIT	43
Abbildung 12: Induktion des sIgG4 gegen verschiedene Einzelallergene bei BG-allergischen Patienten	48
Abbildung 13: Ratio der sIgG4-Werte während / sIgG4-Werte vor der SIT im Gruppenvergleich	48
Abbildung 14: Vorkommen von Api m 10, Api m 3 und Api m 1 in BG-Gesamtextrakten und verschiedenen therapeutischen SIT-Präparaten.....	50
Abbildung 15: Spezifität und Immunreaktivität der polyklonalen Antiseren gegen Api m 1, Api m 3 und Api m 10	51
Abbildung 16: rApi m 10-spezifische sIgE-Werte vor und während der SIT bei BG-allergischen Patienten abhängig vom verwendeten SIT-Therapeutikum	52
Abbildung 17: Ratio der rApi m 10-spezifischen sIgE-Reaktivität während / vor der SIT bei BG-allergischen Patienten abhängig vom verwendeten SIT-Therapeutikum.....	53
Abbildung 18: rApi m 10-spezifische sIgG4-Werte vor und während der SIT bei BG-allergischen Patienten abhängig vom verwendeten SIT-Therapeutikum	54
Abbildung 19: Ratio der rApi m 10-spezifischen sIgG4-Induktion während / vor der SIT bei BG-allergischen Patienten abhängig vom verwendeten SIT-Therapeutikum.....	55
Abbildung 20: sIgE-Werte gegen Einzelallergene bei Patienten mit Hymenopterenengiftallergie mit Stechinsekt Biene und Doppelpositivität gegen WG und BG und negativen sIgE-Werte ($< 0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$) gegen rApi m 1	58
Abbildung 21: sIgE-Werte gegen Einzelallergene bei Patienten mit BG-Allergie mit unbekanntem Stechinsekt und Doppelpositivität gegen WG und BG und negativen sIgE-Werten ($< 0,35 \text{ kU}_A/\text{l}$) gegen rApi m 1	59
Abbildung 22: Prozentsatz der Patientenseren mit BG-Sensibilisierung anhand labordiagnostischer Bestimmung von rApi m 1 und weiterer Einzelallergene in Kombination bei Patienten mit Doppelsensibilisierung gegen WG und BG mit unbekanntem Stechinsekt	60
Abbildung 23: Vergleich der Befundstellung mit Hilfe der aktuell verwendeten Routinediagnostik und mit zusätzlicher Bestimmung von rApi m 3 und rApi m 10 bei Patienten mit Doppelsensibilisierung gegen WG und BG mit unbekanntem Stechinsekt	62

9 Anhang

Die Seite 83 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

9.2 Publikationen, Kongressbeiträge, Preise und Auszeichnungen

9.2.1 Publikationen

FRICK, M.*, FISCHER, J.*, HELBLING, A., RUEFF, F., WIECZOREK, D., OLLERT, M., PFUTZNER, W., MULLER, S., HUSS-MARP, J., DORN, B., BIEDERMANN, T., LIDHOLM, J., RUECKER, G., BANTLEON, F., MIEHE, M., SPILLNER, E. & JAKOB, T. 2016. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1663-1671 e9. *geteilte Erstautorenschaft

FRICK, M.*, MULLER, S.*, BANTLEON, F., HUSS-MARP, J., LIDHOLM, J., SPILLNER, E. & JAKOB, T. 2015. rApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom. *Allergy*, 70(12):1665-8. *geteilte Erstautorenschaft

KOHLER, J., BLANK, S., MULLER, S., BANTLEON, F., **FRICK, M.**, HUSS-MARP, J., LIDHOLM, J., SPILLNER, E. & JAKOB, T. 2014. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 1383-9, 1389 e1-6.

9.2.2 Kongressbeiträge

9.2.2.1 Abstracts mit Vortrag

Frick, M., Bantleon, F., Müller, S., Blank, S., Huss-Marp, J., Ruëff, F., Helbling, A., Spillner, E. und Jakob, T. (2014). Analysis of IgE and IgG4 profiles to a panel of CCD-free bee venom allergens in bee venom allergic patients treated with venom immunotherapy. 26. *Deutscher Allergie Workshop 2014, Frühjahrestagung der DGAKI, Mainz*

Frick, M., Bantleon, F., Müller, S., Blank, S., Huss-Marp, J., Ruëff, F., Helbling, A., Spillner, E. und Jakob, T. (2014). Analyse der IgE- und IgG4-Reaktivität eines breiten Spektrums von CCD-freien Bienengiftallergenen bei Bienengiftallergikern unter spezifischer Immuntherapie. 4. *Allergieggespräch Südwest 2014, Universitäts-Klinikum Heidelberg*

Frick, M., Bantleon, F., Rafei-Shamsabadi, D., Müller, S., Blank, S., Huss-Marp, J., Ruëff, F., Helbling, A., Spillner, E. und Jakob, T. Induction of sIgE and sIgG4 to a broad panel of CCD-free bee venom allergens in bee venom allergic patients under venom immunotherapy (2014). *10. Arbeitsgespräch der Arbeitsgruppe Insektengiftallergie der DGAKI 2014, Fulda*

Frick, M., Bantleon, F., Rafei-Shamsabadi, D., Müller, S., Blank, S., Huss-Marp, J., Ruëff, F., Helbling, A., Spillner, E. und Jakob, T. Induction of sIgE and sIgG4 to a broad panel of CCD-free bee venom allergens in bee venom allergic patients under venom immunotherapy (2014). *European Academy of Allergy and Clinical Immunology - EAACI Congress 2014, Copenhagen*

Frick, M., Rafei-Shamsabadi, D., Bantleon, F., Müller, S., Blank, S., Huss-Marp, J., Ruëff, F., Helbling, A., Spillner, E. und Jakob, T. (2014). Induction of sIgE and sIgG4 to a broad panel of CCD-free bee venom allergens in bee venom allergic patients under venom immunotherapy. *9. Deutscher Allergiekongress der DGAKI 2014, Wiesbaden*

Frick, M., Bantleon, F., Fischer, J., Helbling, A., Ruëff, F., Wiczorek, D., Pfützner, W., Ollert, M., Biedermann, T., Huss-Marp, J., Müller, S., Lidholm, J., Spillner, E. und Jakob, T. (2015). Increased risk of immunotherapy treatment failure in bee venom allergic patients with predominant sensitization to Api m 10. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology - EAACI Congress 2015, Barcelona*

Frick, M., Bantleon, F., Fischer, J., Helbling, A., Ruëff, F., Wiczorek, D., Pfützner, W., Ollert, M., Biedermann, T., Huss-Marp, J., Müller, S., Lidholm, J., Spillner, E. und Jakob, T. (2015). Increased risk of immunotherapy treatment failure in bee venom allergic patients with predominant sensitization to Api m 10. *10. Deutscher Allergiekongress der DGAKI 2015, Köln*

9.2.2.2 Abstracts mit Posterpräsentation

Frick, M., Bantleon, F., Rafei-Shamsabadi, D., Müller, S., Blank, S., Huss-Marp, J., Ruëff, F., Helbling, A., Spillner, E. und Jakob, T. Induction of sIgE and sIgG4 to a broad panel of CCD-free bee venom allergens in bee venom allergic patients under venom immunotherapy (2014). *European Academy of Allergy and Clinical Immunology - EAACI Congress 2014, Copenhagen*

Frick, M., Bantleon, F., Fischer, J., Helbling, A., Ruëff, F., Wiczorek, D., Pfützner, W., Ollert, M., Biedermann, T., Huss-Marp, J., Müller, S., Lidholm, J., Spillner, E. und Jakob, T. (2015). Increased risk of immunotherapy treatment failure in bee venom allergic patients with predominant sensitization to Api m 10. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology - EAACI Congress 2015, Barcelona*

Frick, M., Bantleon, F., Fischer, J., Helbling, A., Ruëff, F., Wiczorek, D., Pfützner, W., Ollert, M., Biedermann, T., Huss-Marp, J., Müller, S., Lidholm, J., Spillner, E. und Jakob, T. (2015). Increased risk of immunotherapy treatment failure in bee venom allergic patients with predominant sensitization to Api m 10. *10. Deutscher Allergiekongress der DGAKI 2015, Köln*

9.3 Preise und Auszeichnungen

Förderpreis Spezifische Immuntherapie der DGAKI für die Originalarbeit: **Frick, M.** et al. Predominant Api m 10 sensitization as risk factor for treatment failure in honey bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2016. Verliehen am 11. *Deutschen Allergiekongress der DGAKI 2016, Berlin*

DGAKI Junior Members Posterpreis für das Poster: **Frick, M.** et al. (2015). Increased risk of immunotherapy treatment failure in bee venom allergic patients with predominant sensitization to Api m 10. *10. Deutscher Allergiekongress der DGAKI 2015, Köln*

Abstract-Preis für den Vortrag: **Frick, M.** et al. (2015). Increased risk of immunotherapy treatment failure in bee venom allergic patients with predominant sensitization to Api m 10. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology - EAACI Congress 2015, Barcelona*

2. Posterpreis der DGAKI für das Poster: **Frick, M.** et al. (2014). Induction of sIgE and sIgG4 to a broad panel of CCD-free bee venom allergens in bee venom allergic patients under venom immunotherapy. 9. *Deutscher Allergiekongress der DGAKI 2014, Wiesbaden*

9.4 Eidesstaatliche Versicherung

Zum Antrag auf Zulassung zur Promotion

Zum Dr. med.

Marcel René Frick

Gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 3 der Promotionsordnung der Universität Freiburg für die Medizinische Fakultät

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Nutzen und Grenzen der molekularen Diagnostik bei Hymenopteren Giftallergie

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
3. Die Ordnung der Albert-Ludwigs-Universität zur Sicherung der Redlichkeit in der Wissenschaft habe ich zur Kenntnis genommen und akzeptiert
4. Die Dissertation oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
5. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
6. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

9.5 Danksagung

Allen voran möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Thilo Jakob für die Vergabe und die ausgezeichnete Leitung dieser Studie bedanken. Die Studie konnte dank seiner hervorragenden Expertise durchgeführt werden, ich durfte durch diese Erfahrung wissenschaftlich und menschlich wachsen.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Johannes Huss-Marp für die wunderbare Betreuung während der gesamten sechs Jahre.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Robert Zeiser für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei den Mitarbeitern der Allergieabteilung der Universitätsklinik Freiburg für die wundervolle Aufnahme und so wertvolle Hilfsbereitschaft. Ich danke Frau Dr. Sabine Müller für ihre großartige Unterstützung innerhalb der Klinik und an den Kongressen.

Ein weiteres besonders großes Dankeschön möchte ich an Frau Britta Dorn, Frau Andrea Komann und Frau Heike Neumann für die Einführung in die Laborarbeit und die wunderbare Zusammenarbeit im Labor richten.

Ein außerordentlicher Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen der Kollaborationszentren: Herr Dr. Jörg Fischer, Universitätsklinik Tübingen, Herr Professor Arthur Helbling, Universitätsspital Bern, Frau Professorin Franziska Ruëff, Universitätsklinik München, Frau Dr. Dorothea Wieczorek, Medizinische Hochschule Hannover, Herr Professor Wolfgang Pfützner, Universitätsklinik Marburg, Herr Professor Markus Ollert, Luxembourg Institute of Health, Herr Professor Tilo Biedermann, Universitätsklinik München, Herr Ph.D. Jonas Lidholm, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden und Herr Professor Edzard Spillner, Department of Engineering, Aarhus University, Dänemark.

Die Seite 89 enthält des Weiteren persönliche Daten. Sie ist deshalb gekürzt und nicht in vollem Umfang Bestandteil der Online-Veröffentlichung.