



Originalarbeit

Submitted: 4.8.2016
Accepted: 3.12.2016
Interessenkonflikt
Keiner.

DOI: 10.1111/ddg.13240
English online version on Wiley Online Library

Diagnostische Präzision der komponentenbasierten vs. der extraktbasierten In-vitro-Diagnostik von Insektengift-Allergien: Auswirkungen auf das klinische Management Diagnostic precision of component- resolved vs. extract-based in vitro diagnosis of hymenoptera venom allergy: effects on clinical management

Florian Seyfarth^{1, 2}, Diana Miguel¹, Sibylle Schliemann¹, Uta-Christina Hipler¹

(1) Klinik für Hautkrankheiten,
Universitätsklinikum Jena
(2) Praxis PD Dr. med. habil. K. Jung,
Uta Zell, Erfurt

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Bestimmung von spezifischen IgE-Antikörpern spielt eine zentrale Bedeutung bei der Diagnostik von Bienen- und Wespengiftallergien. In den letzten Jahren wurden die komponentenbasierte Diagnostik (CRD) eingeführt, die die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper gegen die Allergene Api m 1, Ves v 1, Ves v 5 und Pol d 5 sowie kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCDs) erlaubt. Hierdurch soll vor allem bei Probanden mit Doppelsensibilisierungen die klinische Relevanz der einzelnen Sensibilisierungen besser beurteilt werden können.

Probanden und Methodik: Die spezifischen IgE-Antikörper-Bestimmungen an 143 Probanden mit Bienen- und/oder Wespengiftallergie erfolgten mit den extraktbasierten ImmunoCAP®-Allergenen i1 und i3 sowie den ImmunoCAP®-Allergenkomponenten i208-211 und o214 (Api m 1, Ves v 1, Ves v 5, Pol d 5, CCD). Bei Doppelsensibilisierten wurde zusätzlich ein Inhibitionstest durchgeführt. An einem Teilkollektiv der Studienpopulation erfolgten sIgE-Bestimmungen gegen Api m 1, Api m 4, Pol d 5 und Ves v 5 mittels Allergiechip (ISAC®, n = 44).

Ergebnisse: Die Sensitivität von Ves v 5 bei isolierten Wespengiftallergikern betrug 78,5 %, gemeinsam mit Ves v 1 stieg diese auf 92,3 %. Die Sensitivität von Api m 1 bei isolierten Bienengiftallergikern betrug 25 %. Die komponentenbasierte Diagnostik und Inhibitionstests bei Doppelsensibilisierten lieferten divergente Ergebnisse. Die CRD mittels ISAC®-Allergiechip erbrachte deutliche Unterschiede vor allem im Hinblick auf die Diagnostik von Api m 1 und CCDs.

Schlussfolgerungen: Die CRD bereichert das diagnostische Spektrum, sofern sie nicht allein sondern zusätzlich zu den etablierten Verfahren eingesetzt wird. Sie sollte neben Ves v 5 stets die Bestimmung der IgE-Antikörper gegen Ves v 1 umfassen.

Summary

Background: The measurement of specific IgE (sIgE) antibodies plays a key role in the diagnosis of honeybee and wasp venom allergy. In recent years, component-resolved diagnosis (CRD) has been introduced, which allows for the measurement of sIgE

antibodies against Api m 1, Ves v 1, Ves v 5, and Pol d 5, as well as cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs). These tests are intended to help determine the clinical relevance of any given sensitization, especially in patients with dual sensitization.

Patients and methods: Specific IgE antibody levels were measured in 143 patients with bee and/or wasp venom allergy using the extract-based ImmunoCAP® allergens i1 and i3 as well as the ImmunoCAP® allergen components i208-211 and O214 (Api m 1, Ves v 1, Ves v 5, Pol d 5, CCDs). In patients with dual sensitization, inhibition testing was also performed. In a subgroup of the study population, sIgE to Api m 1, Api m 4, Pol d 5, and Ves v 5 were determined using the ISAC® allergy microarray (n = 44).

Results: The sensitivity of Ves v 5 in patients with isolated wasp venom allergy was 78.5 %; in combination with Ves v 1, that figure increased to 92.3 %. The sensitivity of Api m 1 in individuals with isolated bee venom allergy was 25 %. CRD and inhibition testing in individuals with dual sensitization showed divergent results. CRD using the ISAC® allergy microarray showed marked differences, especially with regard to Api m 1 and CCDs.

Conclusion: Component-resolved tests are a valuable addition to the diagnostic spectrum as long as they are used in combination with established procedures. Apart from Ves v 5, measuring IgE antibodies to Ves v 1 should always be included in the diagnostic workup.

Einleitung

Die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper (sIgE-AK) gegen Bienen- und Wespengift mit konventionellen extraktbasierten Testkits klärt nicht, ob eine Doppelsensibilisierung auf einer Sensibilisierung gegen Majorallergene beider Gifte beruht, oder ob Antikörper gegen kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCDs) Ursache dieser Doppelsensibilisierung sind. In diesem Fall ist eine Hyposensibilisierung gegen beide Insektengifte in der Regel nicht erforderlich. Die klassische Methode zur Beurteilung von Doppelsensibilisierungen ist der Inhibitionstest. Dieser erlaubt eine Unterscheidung zwischen

- ▶ Probanden mit einer Doppelsensibilisierung gegenüber beiden Insektengiften ohne Kreuzinhibition,
- ▶ Probanden mit Doppelsensibilisierung und partiell einseitiger bzw. wechselseitiger Kreuzinhibition sowie
- ▶ Probanden mit Doppelsensibilisierung und komplett einseitiger Kreuzinhibition.

Nur bei der letztgenannten Gruppe (Doppelsensibilisierung und komplett einseitige Kreuzinhibition) ist die Therapie mit einem Gift ausreichend, und zwar mit dem, welches sich nicht kreuzinhibieren lässt [1]. Die Durchführung von Inhibitionstests ist allerdings zeit- und materialintensiv und damit oftmals nicht praktikabel [2, 3].

Die Einführung der komponentenbasierten Diagnostik (CRD), welche die routinemäßige Bestimmung der sIgE-AK gegen Einzelallergene erlaubt, soll die Interpretation von Doppelsensibilisierungen und die daraus folgende Therapie-

entscheidung erleichtern. Inwieweit mittels CRD das Risiko schwerer systemischer Nebenwirkungen während einer spezifischen Immuntherapie mit Insektengiften abgeschätzt werden kann, wurde bislang systematisch nicht erfasst [4].

Im ImmunoCAP® 250-Testsystem sind für Wespengift die Majorallergene Antigen 5 (Ves v 5 [i209] bzw. Pol d 5 [i210]) und Phospholipase A1 (Ves v 1 [i211]), für Bienen-gift Phospholipase A2 (Api m 1 [i208]) verfügbar [5]. Aktuell sind auch Api m 10, Api m 2, Api m 3 und Api m 6 kommerziell erhältlich. Ebenso können die sIgE-AK gegen CCDs bestimmt werden, welche wahrscheinlich für klinisch nicht relevante Kreuzsensibilisierungen zwischen Bienen- und Wespengift verantwortlich sind [6]. Zahlreiche Allergene sind einer routinemäßigen Diagnostik allerdings nicht zugänglich (Api m 2–9, Api m 11–12, Ves v 2, Ves v 3, Ves v 6) [6, 7].

Die Firma Phadia vertreibt neben dem ImmunoCAP®-Testsystem den Allergie-Chip ISAC® (Immuno Solid-phase Allergen Chip), der die gleichzeitige Bestimmung der sIgE-AK gegen mehr als 100 Allergene unterschiedlicher Allergenquellen erlaubt, darunter Api m 1, Api m 4, Pol d 5 und Ves v 5 [8].

Ziel der vorliegenden Studie war es, innerhalb eines klinischen Kollektivs von 143 Insektengiftallergikern Sensibilisierungsmuster hinsichtlich der Einzelallergene von Bienen- und Wespengift zu identifizieren. Neben einer Beurteilung der Doppelsensibilisierungen durch Vergleich mit den Ergebnissen der Inhibitionstestung sollte geklärt werden, inwieweit die CRD Sensibilisierungen detektiert, welche mittels extraktbasierten Testkits übersehen wurden. Ferner war zu beantworten, ob auf die herkömmlichen extraktbasierten Testkits zugunsten der CRD verzichtet werden kann.

Material und Methodik

Studienpopulation (n = 143)

Im Mittel betrug das Alter der Probanden 50 Jahre (Median: 53 Jahre). 64 Probanden waren männlich, 79 weiblich. Die Bestimmung der sIgE-AK erfolgte an Seren von insgesamt 143 Probanden, die zwischen 04/2010 und 04/2012 in der Allergiesprechstunde der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums in Jena mit einer anaphylaktischen Reaktion „Müller 0°“ bis „Müller IV°“ [9] nach Insektenstichereignis vorstellig wurden. Mindestens einer der folgenden Tests musste zusätzlich als positiv gewertet worden sein, um als Insektengiftallergiker eingeordnet und in die Studienpopulation aufgenommen zu werden: Pricktest (max. Testkonzentration: 100 µg/ml), Intrakutantest, extraktbasierte sIgE-AK gegen Bienen- bzw. Wespengiftextrakt, zellulärer Antigenstimulationstest (CAST) mit Bienen- bzw. Wespengiftextrakt. Ein positives Ethikvotum für die Studie liegt vor (Ethik-Kommission des Universitätsklinikum Jena, Bearbeitungsnummer 2990-12/10).

Hauttestungen

Für den Pricktest wurde das extraktbasierte Testpräparat „ALK-prick SQ Insektengifte“ für Bienen- und Wespengift (ALK Abelló, Madrid, Spanien) verwendet. Der Pricktest erfolgte in aufsteigender Dosierung mit 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml. Im Falle eines negativen Pricktests wurde ein Intrakutantest mit den extraktbasierten lyophilisierten Hyposensibilisierungspräparaten „VENOMENHAL Wespe“ und „VENOMENHAL Biene“ (HAL Allergie, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt (aufsteigende Testkonzentrationen: 0,001 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,1 µg/ml und 1 µg/ml).

Bestimmung der sIgE-AK

Die sIgE-AK wurden mithilfe des Phadia ImmunoCAP® 250-Testsystems (Thermo-Fisher/Phadia AB, Uppsala, Schweden) quantifiziert. Die Messungen erfolgten direkt nach der Blutentnahme, welche frühestens sechs Wochen nach Stichereignis durchgeführt wurde. Ein Ergebnis größer als 0,35 kU/l wurde als positiv angesehen.

Zunächst wurde die Höhe der sIgE-AK gegen die kommerziellen Insektengiftextrakte i1 (Bienengift von *Apis mellifera*) und i3 (Wespengift von *Vespula* spp., nicht mit Ves v 5 gespiked) bestimmt. Anschließend erfolgte die komponentenbasierte Diagnostik mit den ImmunoCAP®-Allergenen Api m 1 (i208), Ves v 5 (i209), Pol d 5 (i210), Ves v 1 (i211) und CCD (Bromelain [o214]).

In einem weiteren Schritt wurden die Sensitivitäten von Ves v 5 und Api m 1 bestimmt. Als „tatsächlich Positive“

wurde die Anzahl der Probanden angegeben, die gemäß Anamnese, Hauttestungen, CAST bzw. extraktbasierter Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper eine isolierte Bienen- oder Wespengiftallergie zeigten.

Zellulärer Antigenstimulationstest (CAST)

Der CAST kam nur zur Anwendung, wenn weder die Hauttestungen noch die Bestimmung der sIgE-AK gegen ImmunoCAP® i1 und i3 einen positiven Befund lieferten (n = 3). Die Durchführung des CAST erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit den Insektengiftextrakten „BAG2-I1 Biene“ und „BAG2-I3 Wespe“ (CAST 2000, Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz). Das Ergebnis wurde dann als positiv gewertet, wenn der Insektengiftextrakt im Assay die Freisetzung von > 200 pg/ml Sulfidoleukotrienen bewirkte (nach Abzug der Negativkontrolle) [10, 11]. Zudem musste die Stimulationskontrolle (monoklonaler Anti-IgE-Antikörper) > 300 pg/ml Sulfidoleukotriene, die Negativkontrolle weniger als 200 pg/ml betragen.

ISAC®

Die -Messungen mit ISAC® (Phadia AB, Uppsala, Schweden; ehem. VBC Genomics, Wien, Österreich) erfolgten nur an einem Teilkollektiv der Studienpopulation. Untersucht wurden Seren, die zwischen Januar und November 2011 gewonnen wurden und bei denen das spezifische IgE gegen ImmunoCAP® Api m 1 und/ oder Ves v 5 mindestens 0,35 kU/l betrug (n = 44).

Der Allergiechip wurde mit 20 µl Serum für zwei Stunden inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit Pufferlösung abgespült, getrocknet und mit einem Fluoreszenz-markiertem Anti-Human-IgE-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abspülen der markierten Objektträger erfolgten die Fluoreszenzmessungen (Lux Scan – 10K/A, Capital Bio, Peking, China). Der ISAC® detektiert spezifische IgE-Antikörper gegen Api m 1, Api m 4, Ves v 5 und Pol d 5.

Inhibitionstests

Die Inhibitionstestung erfolgte zum Nachweis von Kreuzreaktivität zwischen Bienen- und Wespengift gemäß den Angaben von Straumann et al. [12]. Zur Untersuchung gelangten Seren, die zwischen August 2010 und April 2012 gewonnen wurden. Der Test konnte aus technischen Gründen nur durchgeführt werden, wenn die sIgE-AK gegen ImmunoCAP® i1 bzw. i3 eine CAP-Klasse von mindestens 2 aufwies. Dies war bei 38 Probanden der Fall.

Für den Inhibitionstest wurde das Serum mit unterschiedlichen Mengen der Insektengiftextrakte „Reless-Wespengift“

und „Reless-Bienengift“ (ALK Abelló, Madrid, Spanien) inkubiert und anschließend die Höhe der sIgE-AK bestimmt. Probanden, bei denen die homologe Inhibition weniger als 70 % betrug, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Eine Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift lag dann vor, wenn die homologe Inhibition jeweils mehr als 70 % und die Kreuzinhibition für Wespen- und Bienengift weniger als 30 % betrug.

Betrug die heterologe Inhibition mehr als 85 %, lag eine komplette Kreuzinhibition vor. Eine partielle Kreuzsensibilisierung lag dann vor, wenn die heterologe Inhibition größer 30 % und maximal 85 % betrug [12].

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels deskriptiver Statistik. Die Sensitivitäten von Ves v 5 und Api m 1 wurden wie folgt bestimmt: Als „tatsächlich Positive“ im Nenner (Goldstandard) wurde die Anzahl der Probanden angegeben, die gemäß Anamnese, Hauttestungen, CAST bzw. extraktbasierter Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper eine isolierte Bienen- oder Wespengiftallergie zeigten. Für die Berechnung der Spezifität der Allergenkomponenten wurden als negative Kontrollgruppe jeweils die Probanden gewählt, die eine Allergie gegen das andere Insekt zeigten.

Ergebnisse

Charakteristik der Studienpopulation

Im Mittel betrug das Alter der Probanden ($n = 143$) 50 Jahre (Median: 53 Jahre). 64 Probanden waren männlich, 79 weiblich.

Dreißundsechzig von 143 Probanden (44,1 %) zeigten erhöhte IgE-Antikörper allein gegen den konventionellen ImmunoCAP®-Wespengiftextrakt (i3), acht Probanden (5,6 %) waren allein gegen den ImmunoCAP®-Bienengiftextrakt (i1) sensibilisiert. Bei 65 Probanden (45,5 %) bestanden Sensibilisierungen sowohl gegen i1 als auch gegen i3. Sieben Probanden (4,9 %) waren weder gegen i1, noch gegen i3 sensibilisiert (Abbildung 1).

Einhundertsieben von 143 Probanden zeigten eine Sensibilisierung gegen Ves v 5, 82 eine Sensibilisierung gegen Pol d 5, 84 gegen Ves v 1, 18 gegen Api m 1 und 35 gegen CCD (Tabelle 1).

Häufigkeit von Sensibilisierungen gegen Api m 1 bei Probanden, die gegen den Bienengiftextrakt i1 monosensibilisiert waren

Nur vier von acht Probanden, die gegen i1 monosensibilisiert waren, zeigten gleichzeitig eine Sensibilisierung gegen Api m 1 (Abbildung 1). Die Probanden ohne Nachweis von sIgE-AK gegen Api m 1 waren durch niedrigere IgE-Antikörper gegen den Bienengiftextrakt i1 charakterisiert (Mittelwert: 0,86 kU/l, Median: 0,73 kU/l, Minimum: 0,38 kU/l, Maximum 1,61 kU/l). Nichtsdestotrotz hatten Probanden ohne sIgE-AK gegen Einzelallergene klinisch z. T. schwere Insektengiftallergien (Müller II°: $n = 1$, Müller III°: $n = 1$ [Imkerin], Müller 0°: $n = 2$). Auch konnten die Bienengiftallergien stets mittels Prick- bzw. Intrakutantest bestätigt werden.

Nur bei einem gegen den Bienengiftextrakt i1 monosensibilisierten Probanden fanden sich spezifische IgE-Antikörper gegen CCD in einer Höhe von 0,98 kU/l.

Zwei gegen i1 monosensibilisierte Probanden zeigten in den Hauttestungen zusätzlich positive Reaktionen auf

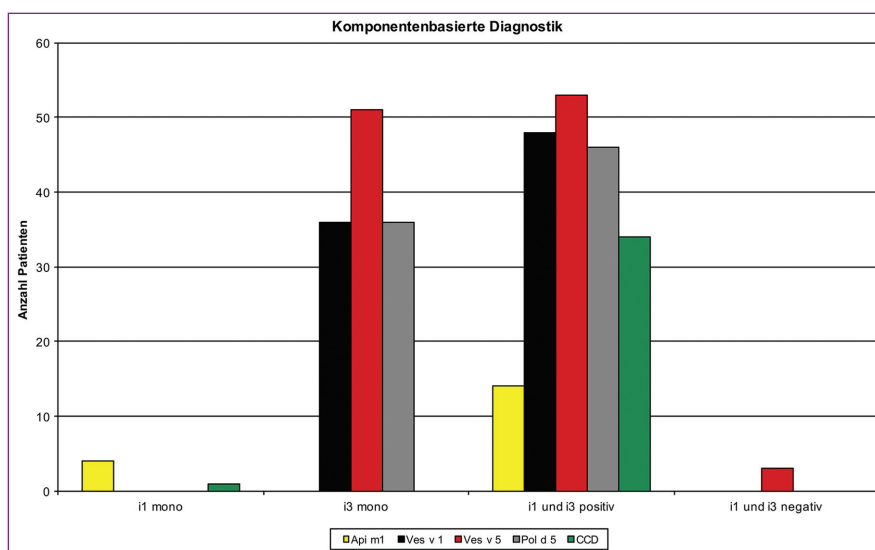


Abbildung 1 Sensibilisierungsmuster des Gesamtkollektivs. i1 – Bienengiftextrakt der Firma Phadia/ThermoFischer zur Bestimmung des spezifischen IgE. i3 – Wespengiftextrakt der Firma Phadia/ThermoFischer zur Bestimmung des spezifischen IgE.

Tabelle 1 Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegen Api m 1, Ves v 5 und CCD im Gesamtkollektiv (n = 143).

	n	Mittelwert IgE (kU/l)	Median IgE (kU/l)	Maximum IgE (kU/l)	Minimum IgE (kU/l)
Api m 1	18	6,09	1,96	75,20	0,38
Ves v 1	84	14,10	2,88	100	0,40
Ves v 5	107	13,33	4,52	100	0,39
Pol d 5	82	8,49	2,46	100	0,41
CCD	35	2,34	1,49	19,00	0,37

Wespengift. Diese wurden in die Berechnung der Sensitivität (s. u.) nicht mit einbezogen.

Sensitivität von Api m 1 bei isolierten Bienengiftallergikern

Das Kollektiv umfasste insgesamt acht Probanden. Sechs Probanden waren gegen i1 monosensibilisiert und zeigten einen positiven Hauttest allein gegen Bienengift. Bei einem Probanden stützte sich die Diagnose nur auf Anamnese und Pricktest, bei einem weiteren auf Anamnese und Intrakutantest. Nur zwei der acht Probanden zeigten erhöhte IgE-Antikörperspiegel gegen Api m 1 (Sensitivität = 25 %). Sensibilisierungen gegen Wespengiftallergene fanden sich in der Gruppe der isolierten Bienengiftallergiker nicht (Spezifität von Ves v 1, Ves v 5 und Pol 5 jeweils 100 %).

Häufigkeit von Sensibilisierungen gegen Ves v 5 bei Probanden, die gegen den Wespengiftextrakt i3 monosensibilisiert waren

Einundfünfzig von 63 Probanden, die gegen i3 monosensibilisiert waren, zeigten gleichzeitig eine Sensibilisierung gegen Ves v 5 (Abbildung 1). Jeweils 36 Probanden waren gegen Ves v 1 oder Pol d 5 sensibilisiert. Nur drei Probanden zeigten keine Sensibilisierung gegen ein Wespengiftallergen. Diese Probanden waren durch niedrige sIgE-AK gegen i3 charakterisiert (Mittelwert sIgE: 0,87 kU/l, Median: 0,61 kU/l, Minimum: 0,46 kU/l, Maximum: 1,55 kU/l). Nichtsdestotrotz hatten diese Probanden klinisch zum Teil schwere Insektengiftallergien (Müller IV°, Müller II°, Müller 0°: jeweils n = 1). CCD-Sensibilisierungen fanden sich nicht.

Drei gegen i3 monosensibilisierte Probanden zeigten in den Hauttestungen zusätzlich positive Reaktionen auf Bienengift. Diese wurden in die Berechnung der Sensitivität (s. u.) nicht mit einbezogen.

Sensitivität von Ves v 1, Ves v 5 und Pol d 5 bei isolierten Wespengiftallergikern

Das Kollektiv umfasst insgesamt 65 Probanden. 60 Probanden waren gegen i3 monosensibilisiert und zeigten einen po-

sitiven Hauttest allein gegen Wespengift. Bei zwei Probanden stützte sich die Diagnose nur auf Anamnese und CAST, bei zwei weiteren auf Anamnese und Intrakutantest und bei einem Probanden auf Anamnese und Pricktest.

Einundfünfzig der 65 Probanden zeigten erhöhte IgE-Antikörperspiegel gegen Ves v 5 (Sensitivität: 78,5 %). Nach Bestimmung der sIgE-AK gegen Ves v 1 stieg die Sensitivität der komponentenbasierten Diagnostik auf 92,3 %. Die zusätzliche Bestimmung von Pol d 5 bewirkte keinen Anstieg der Sensitivität der CRD. Die Sensitivität von Ves v 1 allein betrug 52,3 % und von Pol d 5 55,4 %.

Sensibilisierungen gegen Api m 1 fanden sich in der Gruppe der isolierten Wespengiftallergiker nicht (Spezifität von Api m 1 100 %).

Komponentenbasierte Diagnostik bei Probanden ohne Sensibilisierung gegen die Extrakte i1 und i3

Insgesamt zeigten sich bei sieben Probanden weder eine Sensibilisierung gegen i1 noch gegen i3. Innerhalb dieser Gruppe zeigten sich weder Sensibilisierungen gegen Api m 1 noch gegen Ves v 1, Pol d 5 und CCD (Abbildung 1).

Es ließen sich jedoch drei Individuen nachweisen, die eine Sensibilisierung gegen Ves v 5 aufwiesen. Die entsprechenden Probanden zeigten zum Teil schwerwiegende allergische Reaktionen auf Wespengift (Müller IV, Müller III und Müller II; jeweils n = 1).

Die restlichen vier Individuen zeigten auch keine Sensibilisierung gegen Ves v 5, obwohl bei den Probanden Müller-II-Reaktionen vorlagen und zumindest in den Hauttests Sensibilisierungen gegen Insektengifte nachgewiesen werden konnten.

Komponentenbasierte Diagnostik bei Probanden mit Co-Sensibilisierung gegen die Extrakte i1 und i3

Insgesamt lagen bei 65 von 143 Probanden gleichzeitig Sensibilisierungen gegen i1 und i3 vor. Vierzehn dieser 65 Probanden waren gegen Api m 1 sensibilisiert, 48 gegen Ves v 1, 53 gegen Ves v 5, 46 gegen Pol d 5 und 34 gegen

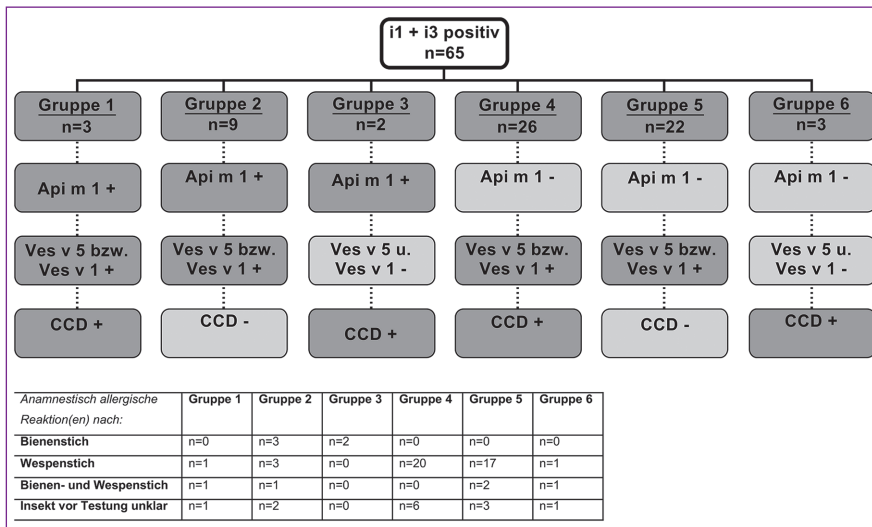


Abbildung 2 Sensibilisierungsmuster der gegen Bienen (i1)- und Wespengiftextrakt (i3) kosensibilisierten Probanden.

CCD-Antikörper (Abbildung 1). Alle 65 Probanden wurden mit Hilfe der komponentenbasierten Diagnostik in verschiedene Untergruppen aufgeteilt (Abbildung 2):

- ▶ Zwölf Probanden zeigten eine Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengiftallergene. Drei hiervon zeigten auch CCD-Sensibilisierungen (Abbildung 2, Gruppe 1 und 2).
- ▶ Zwei Probanden zeigten eine gleichzeitige Sensibilisierung gegen Api m 1 und CCD, ohne gegen Wespengiftallergene sensibilisiert zu sein (Abbildung 2, Gruppe 3).
- ▶ Die größte Gruppe mit 26 Probanden zeigte eine gleichzeitige Sensibilisierung gegen Ves v 1/v 5 und CCD ohne Api m 1 (Abbildung 2, Gruppe 4).
- ▶ 22 von 65 Probanden, die zweitgrößte Gruppe, zeigten nur Sensibilisierungen gegen Wespengiftallergene (Abbildung 2, Gruppe 5).
- ▶ Drei Probanden waren nur gegen CCDs sensibilisiert (Abbildung 2, Gruppe 6).

Vergleich von Inhibitionstest und CRD

Bei 29 von 38 gegen i1 und i3 doppelsensibilisierten Probanden konnte ein Inhibitionstest durchgeführt werden. Neun Probanden mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, da hier die homologe Inhibition gegen eines der beiden Gifte weniger als 70 % betrug.

Nur zwei Probanden zeigten eine komplett einseitige Kreuzinhibition (Abbildung 3). Bei 14 Individuen betrug die heterologe Inhibition durch Wespengift zwischen 25 % und 70 %, während die heterologe Inhibition durch Bienengift wiederum weniger als 25 % betrug. Hier bestand nur eine partielle einseitige Kreuzinhibition. Fünf Individuen zeigten eine wechselseitige Kreuzinhibition durch Bienen- und Wespengift (Mindestbetrag der jeweiligen Kreuzinhibition

30 %). Bei acht Probanden bestand eine echte Doppelsensibilisierung ohne Kreuzreaktivität.

Für den Vergleich mit den Ergebnissen der CRD wurde die sIgE-AK gegen Api m 1, Pol d 5, Ves v 5 und Ves v 1 bestimmt. Sieben der 29 Probanden zeigten Sensibilisierungen gegen Einzelallergene von Biene und Wespe, wobei zwei hiervon auch gegen CCDs sensibilisiert waren.

Dreizehn weitere Probanden zeigten isoliert Sensibilisierungen gegen Bienen- oder Wespengiftallergene, waren aber gleichzeitig gegen CCDs sensibilisiert. Zwei Probanden waren nur gegen CCDs sensibilisiert, sieben nur gegen Wespengiftallergene (Abbildung 3).

Alle Probanden, die gegen Pol d 5 sensibilisiert waren, zeigten gleichzeitig eine Sensibilisierung gegen Ves v 5. Bei den Probanden, die gemäß Inhibitionstestung eine komplett einseitige Kreuzinhibition zeigten (n = 2), bestanden erwartungsgemäß Sensibilisierungen gegen nur ein Gift (Patient 1: IgEVes v5 = 0,96 kU/l; Patient 2: IgEVes v5 = 12,4 kU/l). Bei beiden Probanden ließ sich jedoch auch eine schwache Sensibilisierung gegen CCDs nachweisen, die spezifischen IgE-Antikörper betrugen jeweils ca. 0,70 kU/l.

Vergleich ImmunoCAP® und ISAC® bei der CRD von Insektengiftallergien

Insgesamt 37 Probanden zeigten erhöhte sIgE-AK gegen ImmunoCAP® Ves v 5 (Abbildung 4). Sechsenddreißig Sensibilisierungen konnten ebenso mittels ISAC® detektiert werden (97,3 %), eine Sensibilisierung wurde mittels ISAC® übersehen® (2,7 %). Zudem wurde durch den Allergiechip eine zusätzliche Sensibilisierung gegen Ves v 5 detektiert.

Zehn Probanden zeigten erhöhte sIgE-AK gegen ImmunoCAP® Api m 1. Sieben Sensibilisierungen konnten

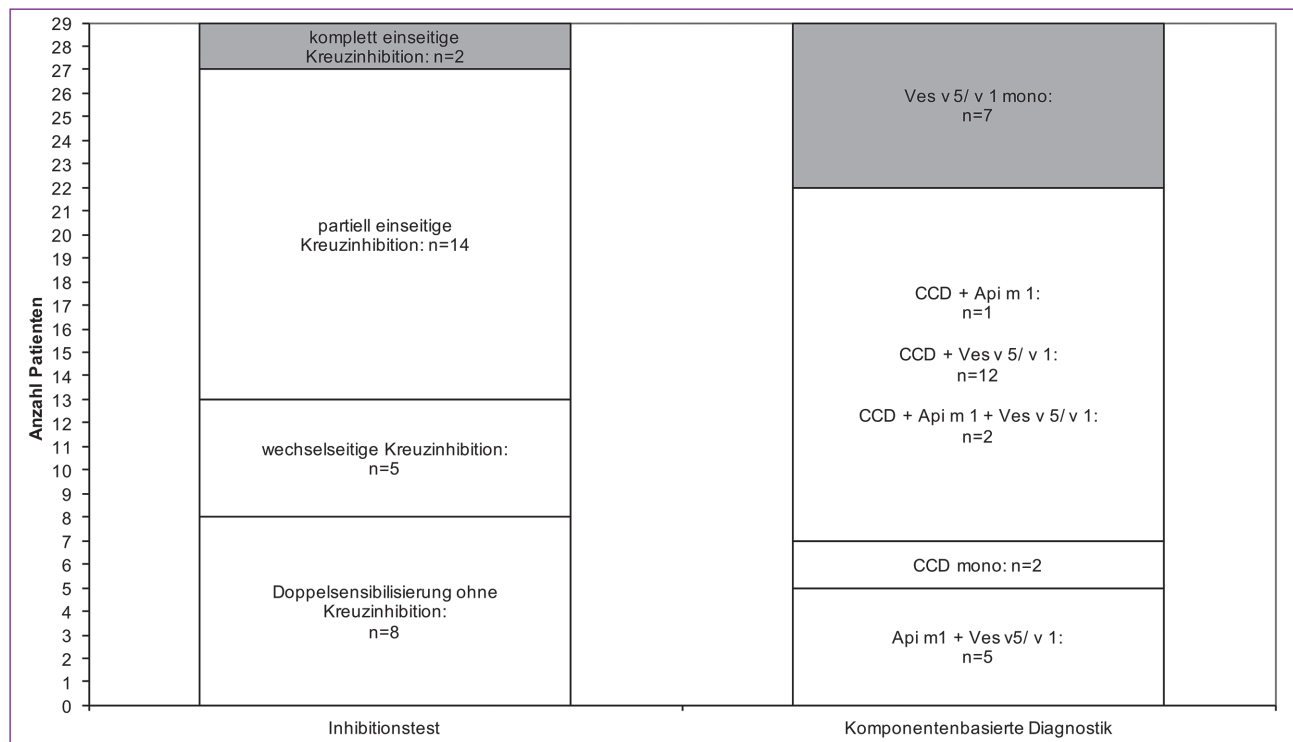


Abbildung 3 Vergleich von Inhibitionstest und komponentenbasierter Diagnostik. Die grau unterlegten Probanden bedürfen – bei unkritischer Betrachtungsweise – nur der Hyposensibilisierung mit einem Gift.

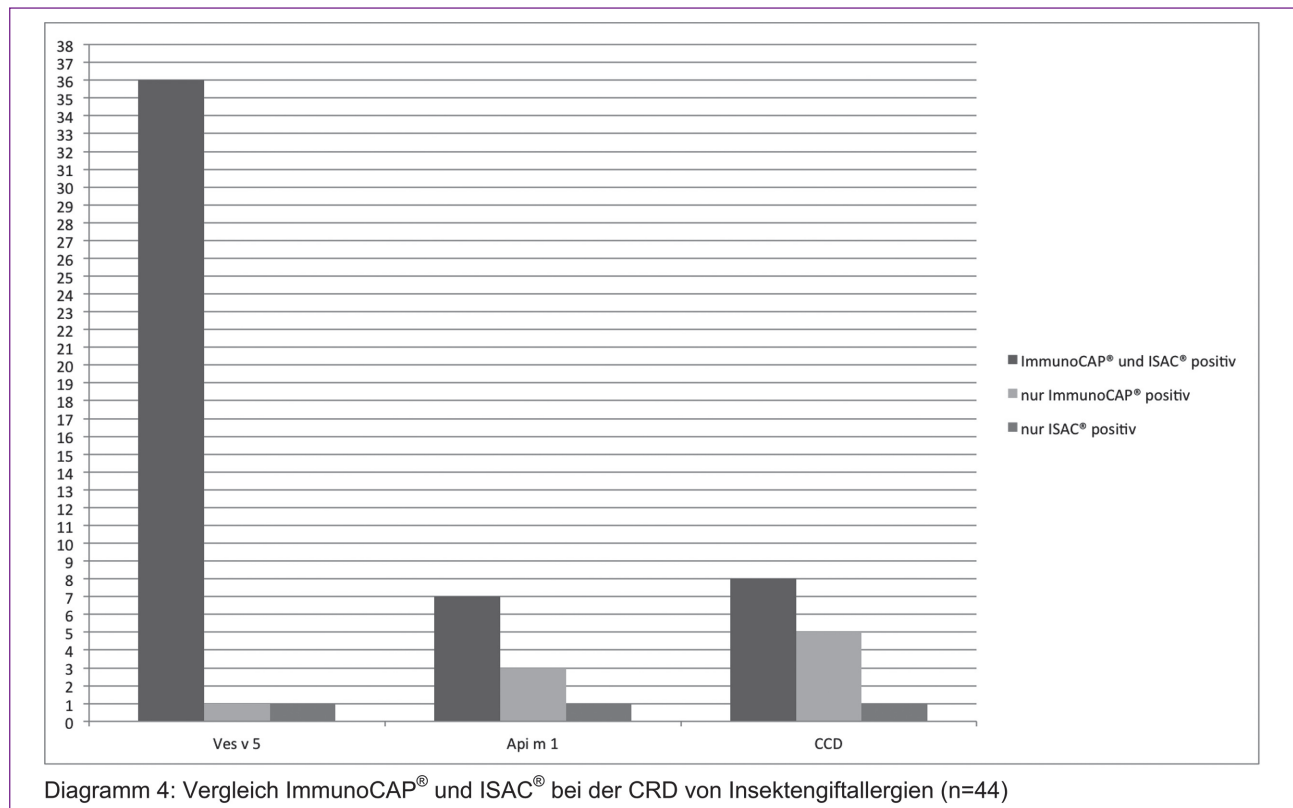


Diagramm 4: Vergleich ImmunoCAP® und ISAC® bei der CRD von Insektengiftallergien (n=44)

Abbildung 4 Vergleich ImmunoCAP® und ISAC® bei der CRD von Insektengiftallergien (n = 44).

ebenso mittels ISAC® detektiert werden (70 %), drei Sensibilisierungen wurde mittels ISAC® übersehen (30 %). Zudem wurde durch den Allergiechip eine zusätzliche Sensibilisierung gegen Api m 1 detektiert.

Dreizehn Probanden zeigten erhöhte sIgE-AK gegen ImmunoCAP® CCD. Acht Sensibilisierungen konnten ebenso mittels ISAC® detektiert werden (61,5 %), fünf Sensibilisierung wurde mittels ISAC übersehen® (38,5 %). Zudem wurde durch den Allergiechip eine zusätzliche Sensibilisierung gegen CCDs detektiert.

Insgesamt wurden im ISAC® 23 Individuen detektiert, die eine Sensibilisierung gegen Pol d 5 aufwiesen, diese waren stets kosensibilisiert gegen Ves v 5. Das ImmunoCAP®-Testsystem erbrachte den Nachweis von 28 Sensibilisierungen gegen Pol d 5, nur einer dieser Probanden war nicht gegen Ves v 5 sensibilisiert.

Insgesamt zeigte sich im ISAC® eine einzige Sensibilisierung gegen Api m 4, das entsprechende Individuum war kosensibilisiert gegen Api m 1.

Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Zusatznutzen der CRD im Hinblick auf die Bienen- und Wespengiftallergie zu beschreiben, wobei die konventionellen extraktgebundenen IgE-Testsysteme bereits seit Langem als verlässliches Diagnostikum etabliert sind [13, 14]. Demzufolge verwundert es nicht, dass das Probandenkollektiv (n = 143) eine hohe Anzahl von Individuen mit Sensibilisierungen gegen die Extrakte i1 und i3 aufwies: Nur sieben Probanden waren nicht gegen die Extrakte sensibilisiert. Die Anzahl dieser falsch-negativen Individuen konnte durch Bestimmung der sIgE-AK gegen Ves v 5 zusätzlich fast auf die Hälfte reduziert werden [2].

Dennoch gab es auch Probanden, die trotz Monosensibilisierung gegen i3 nicht gegen Ves v 5 sensibilisiert waren (n = 12, entspricht 28,6 %), und zwar deutlich mehr als in oben genannter Vergleichspublikation (6 %) [2]. Durch die Bestimmung der sIgE-AK gegen Ves v 1 konnte die Sensitivität der CRD bei Wespengiftallergien von 78,5 auf 92,3 % gesteigert werden [15]. Dagegen verbesserte die Messung von Antikörpern gegen Pol d 5 die Aussagekraft der CRD nicht. Es fand sich kein Patient mit einer Sensibilisierung gegen Pol d 5, der nicht gleichzeitig gegen Ves v 1 oder Ves v 5 sensibilisiert gewesen wäre. Offenbar ist die Exposition gegen die vornehmlich im Mittelmeerraum vorkommende Wespenart *Polistes dominulus* in Mitteleuropa nicht gegeben und die Sensibilisierungen sind Ausdruck einer Kreuzsensibilisierung. In einer spanischen Population fanden sich dagegen auch Probanden mit isolierter *Polistes*-Sensibilisierung [16], was Auswirkungen auf die Auswahl des zu verordnenden Hyposensibilisats hatte [17].

Die Beschränkung der komponentenbasierten Diagnostik von Bienengiftallergien auf Api m 1 erwies sich – wie auch schon in anderen Studien gezeigt – als problematisch [5, 18, 19]. In unserem Kollektiv zeigten nur 50 % aller Individuen mit einer Monosensibilisierung gegen das Bienengiftextrakt (4 von 8) eine Sensibilisierung gegen Api m 1. Die Sensitivität bei isolierten Bienengiftallergikern war mit 25 % sehr niedrig, wobei die Aussagekraft dieser Angabe bei der geringen Fallzahl als eingeschränkt zu beurteilen ist. Dennoch ist dies als deutlicher Hinweis zu werten, dass mehr Bienengiftallergene für eine suffiziente komponentenbasierte Diagnostik notwendig sind (u. a. Api m 2, 3, 5 und 10) [5, 7, 20–22]. Seit 2015 steht auch Api m 10 für die Routinediagnostik zur Verfügung, sodass sich die diagnostische Lücke mit der Verfügbarkeit weiterer rekombinanter Allergene allmählich verringern wird.

Fünfundsechzig von 143 Probanden (46 %) zeigten Sensibilisierungen gegen i1 und i3. Damit liegt die Rate an Doppelsensibilisierungen unwesentlich niedriger als in der Literatur geschildert (50–60 %) [23]. Über die klinische Relevanz der Doppelsensibilisierungen bzw. die Indikation einer spezifischen Immuntherapie (SIT) gegen beide Gifte liefert die extraktgebundene Diagnostik leider keine Aussage. Hierbei soll die CRD Abhilfe schaffen, indem zwischen genuinen Doppelsensibilisierungen gegenüber Majorallergenen beider Gifte und klinisch nicht relevanten CCD-bedingten Kreuzsensibilisierungen unterschieden werden kann.

Tatsächlich zeigten nur zwölf von 65 (18,5 %) Probanden Sensibilisierungen gegen Majorallergene beider Insektengifte (Ves v 1, Ves v 5, Api m 1). Bei allen anderen Individuen lagen entweder Monosensibilisierungen zumeist gegen Wespengiftallergene oder additiv CCD-Sensibilisierungen vor. Die zusätzliche Bestimmung von sIgE-AK gegen Api m 10 würde die Anzahl von Doppelsensibilisierten aller Voraussicht nach erhöhen. So wurden diesbezüglich bereits Steigerungen der Detektionsrate von Bienengiftsensibilisierungen um ca. 20 % publiziert [24]. Vor diesem Hintergrund ist eine Beurteilung in Hinblick auf Art und Umfang einer SCIT gegen Insektengifte ohne Messung der sIgE-AK gegen Api m 10 als bei weitem nicht ausreichend zu beurteilen!

Auch in unserem Labor wurde inzwischen die Bestimmung von sIgE-AK gegen Api m 10 fest implementiert, eine erste interne Zwischenbilanz steht derzeit noch aus.

Die Ergebnisse der Inhibitionstests rechtfertigen die Ausweitung des Allergenrepertoires bei der CRD von Insektengiftallergien: Die meisten der insgesamt 29 Probanden zeigten eine Doppelsensibilisierung ohne Kreuzinhibition, eine partiell einseitige Kreuzinhibition oder eine wechselseitige Kreuzinhibition, so dass hier im Falle der Unklarheit über das symptomauslösende Insektengift eine SIT sowohl gegen Wespen- als auch Bienengift erfolgen sollte [1]. Nur zwei

Probanden (6,9 %) zeigten eine komplette einseitige Kreuzinhibition, hier ist eine SIT gegen ein Gift ausreichend.

Dieselben 29 Probanden wurden auch der CRD unterzogen. Hier zeigten sich immerhin sieben Monosensibilisierungen gegen Ves v 5. Bei unkritischer Betrachtung ist bei diesen Individuen die SIT gegen ein Gift ausreichend. Im Vergleich zum Inhibitionstest ist dies immerhin das 3,5-Fache.

Die Firma Phadia bietet für die CRD neben dem ImmunoCAP®-Testsystem den Allergiechip ISAC® an. Letzterer enthält die Insektengiftallergene Api m 1, Api m 4, Ves v 5 und Pol d 5. Der Vergleich beider Methoden erbrachte deutliche Unterschiede vor allem im Hinblick auf die Diagnostik von Api m 1 und CCDs. Hier wurden durch den ISAC® immerhin 30 % bzw. 38,5 % der Sensibilisierungen übersehen. Dagegen erbrachte die Bestimmung von Ves v 5 für beide Testverfahren übereinstimmende Ergebnisse. Da die Indikation zur molekularen Allergiediagnostik mit Multiplex-Verfahren vornehmlich in der Abklärung von Pollen- und Nahrungsmittelallergien liegt, wird der Verbleib der Insektengiftallergene im Allergenspektrum des ISAC® derzeit kritisch diskutiert [22]. Ein spezieller Allergiechip für die Diagnostik von Insektengiftallergien befindet sich in der Entwicklung [25].

In Zusammenschau der verschiedenen Studien und der eigenen Ergebnisse zeigen sich noch Inkonsistenzen zwischen der CRD und anderen Testverfahren. Die klinische Beurteilung der Relevanz einer Sensibilisierung bleibt im Einzelfall schwierig. Da nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass mittels CRD Sensibilisierungen übersehen werden, sollten in die Interpretation immer Hauttestungen und andere Labormethoden wie CAST oder basophiler Aktivierungstest einbezogen werden [19, 26]. Monosensibilisierungen gegen die Komponenten eines Giftes bei gleichzeitig erhöhtem spezifischen IgE gegen beide Giftextrakte sollten stets kritisch gewertet werden. Sprechen auch die anderen Testmethoden für eine Doppelsensibilisierung und ist die Anamnese unklar, sollte eine Hyposensibilisierung gegen beide Gifte durchgeführt werden [15]. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass eine Doppelsensibilisierung gegen Api m 1 und Ves v 5 nicht automatisch mit einer klinisch relevanten Sensibilisierung gegen beide Gifte gleichzusetzen ist [18, 19].

Eine Verbesserung der Aussagekraft ist durch die bereits initiierte Ausweitung des Angebots kommerzieller Allergene und die optimierte Herstellung rekombinanter Allergene in eukaryoten Zellsystemen (z. B. Insektenzellen) mit erhöhter Epitopauthentizität zu erwarten [6, 27]. Die komponentenbasierte Diagnostik sollte neben Ves v 5 stets die Bestimmung der IgE-Antikörper gegen Ves v 1 miteinschließen.

Korrespondenzanschrift

Diana Miguel
Klinik für Hautkrankheiten
Universitätsklinikum Jena

Erfurter Straße 35
07743 Jena

E-Mail: diana.miguel@med.uni-jena.de

Literatur

- 1 Hemmer W. [Cross-reactivity to honeybee and wasp venom]. *Hautarzt* 2008; 59(3): 194–9.
- 2 Hofmann SC, Pfender N, Weckesser S et al. Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(1): 265–7.
- 3 Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M et al. In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006; 61(10): 1220–9.
- 4 Stoevesandt J, Hosp C, Kerstan A, Trautmann A. Risk stratification of systemic allergic reactions during Hymenoptera venom immunotherapy buildup phase. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014; 12(3): 244–55, 244–56.
- 5 Treudler R. Update on in vitro allergy diagnostics. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012; 10(2): 89–97; quiz 98–9.
- 6 Spillner E, Blank S, Jakob T. Potenzial, Fallstricke und aktueller Status der molekularen Diagnostik am Beispiel der Insektengiftallergie. *Allergo Journal* 2012; 21(4): 249–58.
- 7 Blank S, Seismann H, Michel Y et al. Api m 10, a genuine *A. mellifera* venom allergen, is clinically relevant but underrepresented in therapeutic extracts. *Allergy* 2011; 66(10): 1322–9.
- 8 Phadia-Produktionformation. Allergenkomponent und ihre Kreuzreaktivitäten 2012. Available on http://www.inter-2t.phadia.com/Global/Market%20Companies/Germany/Dokumentenbibliothek/Promotionsmaterial%20Allergie/Allergenkomponenten%20und%20Kreuzreaktionen-12-11_small.pdf. [Last accessed December 10, 2016].
- 9 Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966; 3(4): 331–3.
- 10 Hipler UC, Wigger-Alberti W, Bauer A, Elsner P. Case report. *Monascus purpureus* – a new fungus of allergologic relevance. *Mycoses* 2002; 45(1–2): 58–60.
- 11 Karamfilov T, Wilmer A, Hipler UC, Wollina U. Cetirizine-induced urticarial reaction. *Br J Dermatol* 1999; 140(5): 979–80.
- 12 Straumann F, Bucher C, Wuthrich B. Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with both venoms? Value of FEIA inhibition for the identification of the cross-reacting IgE antibodies in double-sensitized patients to honeybee and wasp venom. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123(3): 268–74.
- 13 Rueff F, Jappe U, Przybilla B. [Standards and pitfalls of in-vitro diagnostics of Hymenoptera venom allergy]. *Hautarzt* 2010; 61(11): 938–45.
- 14 Przybilla B, Rueff F. Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2010; 8(2): 114–27; quiz 128–30.

- 15 Müller U, Schmid-Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A. IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy* 2012; 67(8): 1069–73.
- 16 Monsalve RI, Vega A, Marques L et al. Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. *Allergy* 2012; 67(4): 528–36.
- 17 Dalmau Duch G, Gazquez Garcia V, Gaig Jane P et al. Importance of controlled sting challenge and component-resolved diagnosis in the success of venom immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22(2): 135–6.
- 18 Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B et al. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One* 2011; 6(6): e20842.
- 19 Eberlein B, Krischan L, Darsow U et al. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130(1): 155–61.
- 20 Grunwald T, Bockisch B, Spillner E et al. Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(4): 848–54.
- 21 Jakob T, Müller S, Rafei-Shamsabadi D, Bantleon F, Spillner E. Aktueller Stand und neue Entwicklungen in der Diagnostik mit rekombinanten Insektengiftallergenen. *Allergologie* 2014; 37(9): 352–61.
- 22 Kohler J, Blank S, Müller S et al. Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(5): 1383–9, 1389 e1–6.
- 23 Müller UR, Johansen N, Petersen AB et al. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m 1 and Ves v 5. *Allergy* 2009; 64(4): 543–8.
- 24 Frick M, Müller S, Bantleon F et al. rApi m 3 and rApi m 10 improve detection of honey bee sensitization in Hymenoptera venom-allergic patients with double sensitization to honey bee and yellow jacket venom. *Allergy* 2015; 70(12): 1665–8.
- 25 Jakob T, Forstenlechner P, Matricardi P, Kleine-Tebbe J. Molekulare Allergiediagnostik im Multiplex-Verfahren. *Allergo Journal* 2015; 24(8): 42–56.
- 26 Eberlein B, Darsow U, Ring J. Inkonsistente Ergebnisse bei der Insektengiftallergiediagnostik: praktisches vorgehen. *Allergologie* 2014(9): 362–7.
- 27 Soldatova LN, Crameri R, Gmachl M et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(5): 691–8.