



Molekulare, komponentenbasierte Diagnostik in der HNO-ärztlichen Allergologie

Hintergrund

In der Vergangenheit wurden im klinischen Alltag fast ausschließlich Allergenextrakte zur Diagnostik verwendet (Pricktests, spez. IgE-Bestimmungen und Provokationstests mit Extrakten; [1, 2]).

» Diagnostische Lücken können durch die molekulare, komponentenbasierte Diagnostik geschlossen werden

Diese Extrakte enthalten die krankheitsauslösenden Komponenten neben weiteren, meist klinisch unbedeutenden Substanzen. Inzwischen sind viele Allergene im engeren Sinne, d. h. die verantwortlichen Proteine (oder Allergenkomponenten), identifiziert und mittels proteinbiochemischer und molekularbiologischer Verfahren determiniert worden ([3]; s. auch www.allergen.org oder www.allergome.org). Sie stehen teilweise in biotechnologisch hergestellter, rekombinanter oder aus der natürlichen Allergenquelle gewonnener, hoch aufgereinigter Form für die In-vitro-Diagnostik zur Verfügung.

Bei den Allergenkomponenten handelt es sich um die eigentlich allergieaus-

lösenden Proteine oder Glykoproteine. Sie sollten im Idealfall Bestandteile des bislang zur Diagnostik verwendeten Allergenextrakts sein. Einige Proteine können jedoch im Extraktionsprozess verlorengelassen und sind im Extrakt dann deutlich unterrepräsentiert. Auch die Zugabe einzelner Allergenkomponenten zum Extrakt, das „Spiken“, ist nicht immer in ausreichendem Maße möglich, sodass diagnostische Lücken beim Einsatz von Extrakten auftreten können, die durch die molekulare, komponentenbasierte Diagnostik („component-resolved diagnostics“, CRD) geschlossen werden können.

Major-, Intermediär- und Minorallergene

Während sich die Allergenkunde bislang an der biologischen Verwandtschaft der Allergenquellen (z. B. Pflanzenpollen, Hausstaubmilben, Pilzsporen, Tierhaare) orientierte, ermöglicht die Klassifizierung über molekulare Aspekte eine neue Dimension der Betrachtung, die völlig neue diagnostische Möglichkeiten eröffnet [4]. Diese allergieauslösenden Proteine im engeren Sinne werden definitionsgemäß als Major-, Intermediär-, oder Minorallergene bezeichnet [5].

Aber nicht nur Proteine sind in der Lage, eine allergische Typ-I-Reaktion auszulösen. Auch Kohlenhydrate wie das α -Gal (Galactose- α -1,3-Galactose), welches sich im Fleisch von Säugetieren wie Rind, Schwein oder Wild findet, können zu einer Sensibilisierung mit Nachweis von spezifischem IgE gegen α -Gal führen. Bei betroffenen Patienten kommt es 3–6 h nach entsprechendem Fleischver-

zehr zu Urtikaria, gastrointestinalen Beschwerden bis hin zur Anaphylaxie [6].

Die Definition eines Moleküls als Allergen wird durch das Immunsystem des Menschen determiniert, wobei zwangsläufig eine epidemiologische Dimension in der Beschreibung ihrer Eigenschaften mitwirkt [5].

» Gegen Majorallergene weisen über 50 % der Patienten eine Sensibilisierung auf

So werden Allergenkomponenten als Majorallergene definiert, wenn über 50 % der Patienten eine Sensibilisierung gegen sie aufweisen. Minorallergene sind solche Komponenten, die von weniger als 10 % der Patienten erkannt werden. Im Bereich zwischen 10 und 50 % werden Allergenkomponenten als Intermediärallergene bezeichnet [5].

Allergennomenklatur

Das System der Benennung von Allergeneinzelkomponenten wurde unter der Schirmherrschaft der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO, www.who.int) und der International Union of Immunological Societies (IUIS, www.iuisonline.org) von einem Subkomitee (Allergen Nomenclature Sub-Committee, www.allergen.org) für Allergen-Nomenklatur entwickelt [7–9].

Zurzeit gelten folgende Grundregeln: In die Namensgebung gehen die ersten 3 Buchstaben des lateinischen Namens der Allergenquelle, gefolgt vom 1. Buch-

Einige Inhalte dieses Artikels wurden von den Autoren und ihren Arbeitsgruppen in anderen Artikeln, auch in Übersichten zu speziellen Aspekten der molekularen Allergologie, bereits publiziert. Diese werden hier teilweise wiederholt, da die genannten Arbeiten nicht allen Lesern der HNO ohne Weiteres zugänglich sind.

staben des Speziesnamens, ein. Beispielsweise werden Allergene im Extrakt von Birkenpollen (*Betula verrucosa*), in ihrer Basis mit „Bet v“ bezeichnet.

Die Allergeneinzelkomponenten werden dann in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit arabischen Ziffern durchnummeriert, also „Bet v 1“. Werden in ihrer Struktur und im immunologischen Verhalten homologe Allergene in anderen Spezies, z. B. in Haselnusspollen oder Erlenpollen gefunden, orientiert sich die Nummerierung an der arabischen Zahl des zuerst beschriebenen Allergens, solange diese noch nicht vergeben sind. Also „Cor a 1“ (von *Corylus avellana*), oder „Aln g 1“ (von *Alnus glutinosa*), aber „Ara h 8“ (von *Arachis hypogaea*) in der Erdnuss. Derartige Allergene werden in Gruppen zusammengefasst: Man spricht dann von den Gruppe-I-Allergenen der Baumpollen [8].

Es ist selbstverständlich, dass Gruppe-I-Allergene anderer Allergenquellen völlig andere Eigenschaften haben können. So sind Gruppe-I-Allergene von Gräserpollen in ihrer Struktur von Gruppe-I-Allergenen der Baumpollen völlig verschieden.

Die Nomenklatur berücksichtigt Isoallergene und Allergenvarianten, allergencodierende Gene, mRNA und cDNA sowie allergene Peptide rekombinanten oder synthetischen Ursprungs, sowohl in ursprünglicher als auch in modifizierter Form [4]. Isoallergenen und ihren Varianten werden nach der Haupt-Allergennummer mit einem vierstelligen Zahlencode versehen. Die ersten beiden Zahlen (01–99) bezeichnen Isoallergene mit einer Sequenzidentität >67 %. Die dritte und vierte Zahl (01–99) bezeichnen Varianten eines Isoallergens mit einer Sequenzidentität von >90 %, z. B. Bet v 1.0101 und Bet v 1.0103. Daten zu neuen Allergenen oder zugehörigen Molekülen werden sorgfältig geprüft, bevor sie ihren Namen erhalten und in die offizielle Liste der Allergene aufgenommen werden (www.allergen.org).

Genetische Basis

Im Folgenden wird der Zusammenhang der Aminosäuresequenz mit der Protein-

struktur und der Unterschied zwischen T-Zell- und Antikörper-Epitop erläutert.

Wie jedes Protein werden auch Allergene durch ein zugehöriges Gen codiert. Die resultierende Aminosäuresequenz (Primärstruktur) bedingt aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften eine räumliche Anordnung und Faltung der Polypeptidkette. Diese kann verschiedene Formen (Sekundärstruktur) annehmen.

Bekannte Beispiele sind z. B. α -Helix, β -Faltblatt und β -Schleife. Hierdurch wird die dreidimensionale Proteinstruktur festgelegt (Tertiärstruktur). Zusätzlich können sich mehrere Einzelproteine zu größeren Komplexen zusammenlagern (Quartärstruktur). Allergenmoleküle oder -fragmente entsprechen in ihrem Aufbau der allgemeinen Strukturhierarchie von Proteinen und werden als Determinanten oder Epitope bezeichnet, wenn sie durch das Immunsystem, repräsentiert durch Antikörper, Major-Histocompatibility-Complex(MHC)-Moleküle oder T-Zell-Rezeptoren, detektiert werden können.

» Konformationsepitope sind anfällig gegenüber Zerstörung der Tertiärstruktur

Epitope werden als seriell oder kontinuierlich bezeichnet, wenn sie auf Abschnitten der Primärstruktur der Proteine oder Glykoproteine erkannt werden. Epitope, die durch Faltung der Primärstruktur zur Tertiärstruktur ihre Formung herleiten, werden als Konformationsepitope bezeichnet oder diskontinuierlich genannt. Der Begriff diskontinuierlich hebt darauf ab, dass Ankerpunkte der Antikörperbindungsstellen des Konformationsepitops sich auf der Primärstruktur an getrennten Stellen befinden – dies können auch Peptiduntereinheiten sein. Konformationsepitope können nur von Immunglobulinen erkannt werden. Sie sind anfällig gegenüber Zerstörung der Tertiärstruktur (Denaturierung), dies kann sie beispielsweise labil gegen Hitzeeinwirkung machen. Hierbei können jedoch Abschnitte des diskontinuierlichen Epitops bei hinreichender Größe durchaus erkannt werden, sodass eine

abgeschwächte, aber keine aufgehobene Immunreaktion entstehen kann. Sie sind die Schnittstelle von chemischer Struktur und Immunsystem. T-Zellen erkennen dagegen ausschließlich kurze lineare Peptide (Peptidepitope) nach ihrer Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen.

Die Identifizierung und Charakterisierung von Allergeneinzelkomponenten ist ein dynamischer Prozess. Zusammenstellungen dieser Komponenten mit ihren Eigenschaften sind am umfassendsten in der Datenbank Allergome (<http://www.allergome.org>) zu finden. Sie wird wöchentlich auf den neuesten Stand gebracht. Zum Stand September 2016 sind in der Datenbank mehr als 6000 Einträge von Allergenen und ihren Isoformen enthalten. Die Vielzahl der beschriebenen Allergene kann in Allergenfamilien zusammengefasst werden [10].

Dies geschieht anhand ihrer dreidimensionalen Struktur, die häufig durch deren Peptidsequenzen bedingt ist, da diese die dreidimensionale Faltung und endgültige Proteinstruktur bestimmen. Nur ein Bruchteil der bekannten Proteinfamilien enthält jedoch potenzielle Soforttypallergene.

» Epitope sind die Schnittstelle zwischen chemischer Struktur der Allergene und dem Immunsystem

So wurden Pollenallergene in nur 29 von 7868 bekannten Proteinfamilien gefunden, die bekannten Nahrungsmittelallergene können 20 verschiedenen Familien zugeordnet werden, wobei 4 Familien (Prolamine/Speicherproteine, Parvalbumine/Tropomyosine, Bet-v-1-Analoga, Profilinen) 65 % der Nahrungsmittelallergene beinhalten. Diese Angaben stellen nur eine Momentaufnahme eines dynamischen Forschungsgebiets da, bedeuten aber in der Tendenz, dass konservierte Strukturbereiche und biologische Aktivitäten der Substanzfamilien die Allergenität bestimmen und verstärken. Es gibt Hinweise, dass konservierte räumliche Strukturen der Allergenfamilien eine größere Übereinstimmung aufwei-

sen können, als die Sequenzidentität der Primärstrukturen vermuten lässt. Der Aspekt der Allergenfamilien wird in der Datenbank Allfam (<http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/>) zugrunde gelegt.

Trotz der Kenntnisse der Eiweißstruktur ist es bislang nicht gelungen, die Frage zu beantworten, was ein Allergen zum Allergen macht. Die Antwort ist in der Wechselwirkung zwischen chemischer Struktur der Allergene und dem Immunsystem zu suchen, deren Schnittstelle die Epitope sind.

Proteinfamilien und Verwandtschaft der Typ-I-Allergene

Die Zuordnung ähnlicher Proteine anhand ihrer dreidimensionalen Struktur zu gemeinsamen Allergenfamilien hat sich in der praktischen Anwendung als sinnvoll erwiesen. Häufig zeigen bereits deren Peptide (teil)identische oder ähnliche Sequenzen, da sie die dreidimensionale Faltung und endgültige Proteinstruktur bestimmen [10]. Daraus wurde abgeleitet, dass eine Sequenzidentität/-ähnlichkeit von mehr als 50 % wahrscheinlich eine ähnliche Struktur bedingt und damit das Potenzial für gemeinsame Epitope kreuzreaktiver Antikörper steigt. Offenbar beherbergt nur ein Bruchteil der bekannten Proteinfamilien potenzielle Soforttypallergene [11].

Die Grundlagen für diese selektive Eignung zum Allergen sind bisher nicht bekannt. Der evolutionäre Verwandtschaftsgrad, angegeben als Sequenzidentität/-ähnlichkeit, entscheidet bei Proteinen, die auch im Menschen vorkommen, wahrscheinlich über Toleranz (bei enger Verwandtschaft) oder die Möglichkeit zur Typ-I-Allergie (bei entfernter Verwandtschaft). Kreuzreaktionen durch Allergene, die nicht im Menschen vorkommen, können ebenfalls aufgrund ihrer evolutionären Verwandtschaft (in Prozent der Sequenzidentität) und resultierenden Strukturähnlichkeit vorhergesagt werden.

Pathogeneseassoziierte Proteine entstehen als Abwehrreaktion der Pflanzen auf von außen einwirkenden Stress, wie z. B. Besiedlung mit Parasiten oder Luft-

HNO DOI 10.1007/s00106-017-0372-6
© Springer Medizin Verlag GmbH 2017

L. Klimek · S. Becker

Molekulare, komponenten-basierte Diagnostik in der HNO-ärztlichen Allergologie

Zusammenfassung

Die molekulare, komponentenbasierte Diagnostik („component-resolved diagnostics“, CRD) setzt sich neben der Wissenschaft auch mehr und mehr in der alltäglichen klinischen Routine durch. Sie bietet eine höhere diagnostische Sicherheit in Bezug auf das zugrunde liegende Allergen, kann bei der Klärung von Kreuzreaktionen und Polysensibilisierungen helfen und bietet damit die Möglichkeit einer individuellen personalisierten Therapieplanung. Bei Anaphylaxien und Lebensmittelallergien ist darüber hinaus eine Abschätzung des Risikos

in Bezug auf das Wiederauftreten sowie die Schwere der zu erwartenden Reaktion möglich. Mit dem immensen Wissenszuwachs sollte eine gezielte Aus- und Weiterbildung der klinisch tätigen Allergologen auf dem Gebiet der molekularen Allergologie einhergehen.

Schlüsselwörter

Molekulare Allergologie · Allergenkomponenten · Allergene · Allergische Rhinitis · Kreuzreaktionen

Molecular component-resolved allergy diagnostics in ENT

Abstract

Molecular component-resolved diagnostics (CRD) are, in addition to its research applications, being increasingly used in daily allergological routine. CRD offers improved diagnostic accuracy via a better understanding of the underlying allergen causing symptoms and helps to distinguish between true sensitization and cross reactions in polysensitized patients, thereby providing an approach for individual personalized therapy. Particularly in food allergies and

anaphylaxis, CRD can stratify risks for the recurrence of reactions and their severity. The education and extended vocational training of clinical allergologists has to keep pace with the tremendous increase of knowledge in the field of molecular allergology.

Keywords

Molecular allergology · Allergen components · Allergens · Allergic rhinitis · Cross reactions

verschmutzung [12]. Pathogeneseassoziierte Proteine mit ähnlicher Aminosäuresequenz werden in Proteinfamilien eingeteilt (■ Tab. 1). So gehört beispielsweise Bet v 1 zur pathogeneseassoziierten Proteinfamilie PR-10. PR-10-Proteine werden in hohen Konzentrationen in Pollen, Samen oder Früchten exprimiert. Dies gilt insbesondere für die Pflanzenfamilien der Buchenartigen, *Fagales*, wie Hasel- und Erlenpollen, der *Rosaceae* wie Apfel, Birne und Steinfrüchten, der *Apiaceae* wie Sellerie und Karotte und der *Fabaceae* wie Soja und Erdnuss. Die PR-10-Proteine zeichnen sich durch eine große Übereinstimmung in der Struktur aus, sodass sie aufgrund ihrer Kreuzreaktivität als Panallergene bezeichnet werden.

Kreuzreaktive Störfaktoren

Zu klären ist die Frage, ob eine echte Sensibilisierung oder eine Kreuzreaktion vorliegt. Aus den sog. pathogeneseassoziierten Proteinen lassen sich für eine Allergenquelle spezifische Markerallergene bzw. kreuzreaktive Allergenkomponenten bestimmen (■ Tab. 2). Spezifische Allergenkomponenten zeigen mit hoher Sicherheit die zugrunde liegende Sensibilisierung gegen die entsprechende Allergenquelle an, können aber in ähnlicher Form auch in anderen Allergenquellen vorkommen. Klassisches Beispiel ist das Bet v 1, welches in Homologie, wie bereits beschrieben, z. B. in Erdnuss, Haselnuss und Pfirsich vorkommt. Kreuzreaktive Allergenkomponenten wie Profilin oder Ca-bindendes Protein (Polcal-

Tab. 1 Wichtige Allergengruppen [37]

Pathogeneseassoziierte Proteine	Relevante Allergene in:
PR-2: β -1,3-Glukanasen	Olivenpollen, Latex, Banane, Tomate, Kartoffel
PR-3: Klasse-1-Chitinasen	Latex, Früchte (Latex-Frucht-Syndrom), Obecheholz (Abachiholz)
PR-5: „Thaumatin-like proteins“	Zypressenpollen, Kern- und Steinobst, Kiwi, Banane, Paprika
PR-10: Bet-v-1-Homologe	Birkenpollen und Verwandte (<i>Fagales</i>), Kern- und Steinobst, Kiwi, Baumnüsse, Erdnuss, Soja, Karotte, Feige, u. a.
PR-14: nichtspezifische Lipidtransferproteine, „non-specific lipid-transfer-proteins“ (ns-LPT)	Beifuß-, Glaskraut-, Platanenpollen, Kern- und Steinobst, Nüsse, Kiwi, u. v. a. Nahrungsmittel
<i>Speicherproteine</i>	
Cupine (Viciline, Legumine)	Erdnuss, Soja, Baumnüsse
2S Albumine	Erdnuss, Baumnüsse, Senf, Samen
<i>Enzyme</i>	
Papainartige Zysteinproteasen	Hausstaubmilbe, Gräserpollen, <i>Ficus benjamina</i> , Feige, Papaya, Kiwi, Ananas, Soja
Ribonukleasen	Majorallergene in Gräserpollen (Gruppe 5)
Pektatlyasen	Zypressen- und Ragweedpollen, Früchte
Enolasen	Latex, Schimmelpilze
Hyaluronidasen, Phospholipasen	Insektengifte
<i>Andere</i>	
Tropomyosin (Muskelprotein)	Hausstaubmilbe, Krebstiere, Weichtiere, Insekten
Parvalbumin (Muskelprotein)	Fisch
Lipocaline (Transporterproteine)	Katze, Hund u. a. felltragende Tiere, Milben, Schaben, Raubwanzen

Tab. 2 Markerallergene für echte Sensibilisierungen vs. Kreuzreaktionen [37]

Allergenquelle	Spezifisch	Kreuzreaktiv
Birkenpollen	Bet v 1	Bet v 2 (Profilin), Bet v 4 (Ca-bindendes Protein)
Gräserpollen	Phl p 1, Phl p 5, Phl p 2, Phl p 6	Phl p 12 (Profilin), Phl p 7 (Ca-bindendes Protein)
Eschenpollen	Ole e 1	–
Beifußpollen	Art v 1	–
Ragweedpollen	Amb a 1	–
Hausstaubmilbe	Der p 1, Der p 2, Der p 23	Tropomyosin (Der p 10, Pen a 1)
Katze	Fel d 1	Fel d 2 (Serumalbumin)
Latex	Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6, u. a.	Hev b 8 (Profilin)
Erdnuss	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 9	Ara h 8 (Bet-v-1-Homolog)
Haselnuss	Cor a 8	Cor a 1 (Bet-v-1-Homolog)
Pfirsich	Pru p 3	Pru p 1 (Bet-v-1-Homolog), Pru p 4 (Profilin)

cin) sind Intermediär- oder Minorallergene, die in fast allen Pflanzenarten vorkommen und eine Polysensibilisierung vortäuschen können, wenn ausschließlich mit Extrakten getestet wird [13, 14]. Trotz der Schwierigkeiten, die sich für die extraktbasierte Diagnostik ergeben, scheinen Sensibilisierungen gegen Profi-

lin und Polcalcin nur von untergeordneter klinischer Relevanz zu sein [15].

Neben der Diagnostik spielen die spezifischen Allergenkomponenten auch eine Rolle bei der Herstellung von Therapielösungen für die spezifische Immuntherapie (SIT). So werden Therapielösungen in erster Linie auf die

Markerallergene der jeweiligen Allergenquelle standardisiert, wohingegen die Konzentration an unspezifischen Proteinen und kreuzreaktiven Allergenkomponenten extrem stark schwanken kann. Das von der Europäischen Union geförderte CREATE-Projekt hat die Schaffung von Referenzstandards für Allergenkomponenten zur Aufgabe und trägt zur Harmonisierung der Qualität der Allergenkomponenten in Diagnostik und Therapie bei [16].

» Kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten sind ein Störfaktor in der Diagnostik mit Gesamtextrakten

Neben den bereits beschriebenen Kreuzreaktionen aufgrund der Strukturhomologie der Epitope verschiedener Allergenquellen gibt es weitere kreuzreaktive Störfaktoren für die In-vitro-Diagnostik. Einen beträchtlichen Nachteil von Gesamtextrakten stellt dabei die Tatsache dar, dass viele der enthaltenen Proteine N-Glykane mit α 1-3-verknüpfter Fucose aufweisen. Diese beim Menschen nicht vorkommenden Zuckerstrukturen können IgE induzieren und sind Ursache ausgeprägter Kreuzreaktionen zwischen strukturell gänzlich unähnlichen Proteinen („cross-reactive carbohydrate determinants“, CCD). Etwa 10–20 % aller Atopiker weisen CCD-spezifische IgE-Antikörper auf. Diese Antikörper haben offensichtlich keine oder nur sehr geringe klinische Relevanz und sind demnach regelmäßige Ursache „falsch-positiver“ In-vitro-Befunde. Kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten sind also ein Störfaktor in der Diagnostik mit Gesamtextrakten.

Besonders störend ist dies bei der Abklärung potenziell lebensbedrohlicher Allergieformen, wie z. B. Erdnuss- oder Latexallergien. Auch bei Insektengiftallergien täuschen CCD bei schätzungsweise 25 % aller Patienten eine irrelevante Doppelsensibilisierung gegenüber Bienen- und Wespengift vor. CCD-freie rekombinante Allergene bieten hier einen unschätzbaren Vorteil. Sofern noch keine geeigneten Einzelmo-

leküle für die Testung verfügbar sind, können einfache kommerzielle Screeningtests auf geeignete Glykanquellen (z. B. Bromelain, CCD-MUXF3) zumindest wertvolle Hinweise geben, ob im Serum derartige Anti-CCD-IgE-Antikörper vorliegen.

Etablierte Testverfahren

Als Testverfahren für die molekulare, komponentenbasierte Diagnostik sind folgende Methoden etabliert: Für die Bestimmung der allergenspezifischen IgE-Antikörper sind heute FEIA (Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay)-, seltener EIA (Enzym-Immunoassay)-Bestimmungen üblich. Eher veraltete Messmethoden sind RIST (Radio-Immuno-Sorbens-Test) für das Gesamt-IgE und RAST (Radio-Allergo-Sorbens-Test) für allergenspezifisches IgE. Die Testverfahren zum Nachweis bestimmter Allergenkomponenten unterscheiden sich dabei nicht von extraktbasierten Verfahren.

Eine ständig steigende Anzahl an Einzelkomponenten steht für die Testung zur Verfügung und muss sinnvoll zur Klärung des Sensibilisierungsprofils des Patienten eingesetzt werden. Dies setzt ein fundiertes Wissen über die lokale Prävalenz unterschiedlicher Sensibilisierungen, entsprechender Markerallergene und Kreuzreaktionen voraus und kann zu Beginn zeitaufwendig sein. Teurer, aber deutlich umfangreicher ist die Testung mittels Allergen-Microarrays.

Prinzip des Allergen-Microarrays

Im Gegensatz zur konventionellen Allergiediagnostik ist mithilfe von Allergen-Microarrays eine simultane Testung multipler Allergenkomponenten möglich [17]. Sie stellen im Prinzip einen Multi-Analyt-Festphase-Immunoassay zur Bindung von Antikörpern im Patientenserum dar. In der nachfolgenden Detektion können mittels additiver fluoreszenzmarkierter Sekundäntikörper die IgE-Antikörper im Serum quantifiziert werden [17].

Ein erster standardisierter multiplexdiagnostischer Test ist für den Nachweis

von molekularen Allergenkomponenten verfügbar. Er ermöglicht die Messung spezifischer IgE-Antikörper von 112 unterschiedlichen Allergenkomponenten, wozu 30 µl Serum oder Plasma ausreichen, und liefert eine vergleichbar gute Sensitivität wie der FEIA [17]. Hierdurch ist bereits eine Kapillarblutprobe ausreichend, was ein schonenderes Vorgehen, z. B. bei der Untersuchung von Kleinkindern, ermöglicht [18].

» Zur Messung der IgE-Antikörper von 112 Allergenkomponenten reichen 30 µl Serum oder Plasma aus

Allergen-Microarrays werden mittels eines Biochipscanners und der zugehörigen Software evaluiert. Bei dem aktuell erhältlichen Biochip, dem ImmunoCAP® ISAC (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden) handelt es sich um einen semiquantitativen Test; die Ergebnisse werden in ISAC Standardized Units (ISU) angegeben.

Einsatzbereich komponentenbasierter Diagnostik

Die CRD eignet sich als Hilfestellung bei der Indikation zur allergenspezifischen Immuntherapie (SIT). Eine Immuntherapie ist v. a. bei Vorliegen einer Sensibilisierung auf die Majorallergene sinnvoll [19, 20]. So zeigt eine retrospektive Untersuchung von Schmid-Grendelmeier et al. an 746 Patienten in 73 % einen guten bis sehr guten Therapieerfolg der SIT bei Vorliegen einer Sensibilisierung gegen die Majorallergene. Bei Vorliegen einer Sensibilisierung gegen Minorallergene (Profilin oder Polcalcin) jedoch lediglich in 16 % [21].

Die zur SIT verwendeten Extrakte werden v. a. auf die entsprechenden Majorallergene standardisiert, was sicherstellen soll, dass diese in gleichbleibender und ausreichend hoher Menge in der Therapielösung vorhanden sind und damit eine besonders gute Immunmodulation im Sinne einer Toleranzinduktion gelingt [22]. Dies ist umso wichtiger, da der Gehalt an Intermediär- und Mi-

norallergenen von Produkt zu Produkt und von Hersteller zu Hersteller stark schwanken kann [23, 24].

» Die zur SIT verwendeten Extrakte werden v. a. auf die entsprechenden Majorallergene standardisiert

Lässt sich erhöhtes spezifisches IgE gegen die Gräserpollen-Markerallergene Phl p 1 und Phl p 5 nachweisen, ist dies ein Hinweis auf eine spezifische Sensibilisierung, bei der eine SIT sinnvoll ist. Liegt hingegen ausschließlich erhöhtes spezifisches IgE (sIgE) gegen Kreuzallergene wie das Polcalcin Phl p 12 und das Profilin Phl p 7 vor, ist eine SIT weniger erfolgversprechend und sollte daher sehr zurückhaltend indiziert werden. Ähnlich ist eine SIT bei birkenpollenassoziierter Rhinokonjunktivitis sinnvoll, wenn IgE gegen das Markerallergen Bet v 1 vorliegt, bei einer alleinigen Sensibilisierung gegen die Kreuzallergene Bet v 4 und Bet v 2 dagegen nicht [14, 20]. Eine ausschließliche Sensibilisierung auf die Panallergene Profilin/Polcalcin kann je nach Kollektiv bei 10–25 % der Pollinosepatienten vorliegen, scheint aber klinisch eher von untergeordneter Relevanz zu sein [15, 25].

Die komponentenbasierte Diagnostik scheint also tatsächlich sinnvoll zu sein, um insbesondere für die Pollen-SIT ungeeignete Patienten selektionieren zu können und dadurch neben dem großen Zeitaufwand allfällige Nebenwirkungen und letztendlich auch unnötige Kosten zu vermeiden. Dabei können Sensibilisierungen auf Profilin und Polcalcin durchaus summarisch erfasst werden, da im klinischen Alltag eine Abgrenzung auf eine der beiden Gruppen nicht notwendig ist. So ist die kombinierte Bestimmung etwa von Phl p 7/Phl p 12 als eine einzelne Bestimmung oft ausreichend. Aufgrund der hohen Kreuzreaktivität werden dadurch auch Sensibilisierungen auf die entsprechenden Panallergene anderer Pollengruppen wie Baum- oder Kräuterpollen miterfasst und müssen daher nicht gesondert bestimmt werden.

Zudem können pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien, etwa zwischen Birkenpollen und rohem Stein- und Kernobst und anderen Nahrungsmitteln, in überwiegendem Maße auf Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Bet-v-1-Homologen zurückgeführt werden [11].

» Die SIT gegen Hausstaubmilben ist nur bei Sensibilisierung gegen die Majorallergene aussichtsreich

Auch bei der Hausstaubmilbenallergie, bei der die spezifische Immuntherapie deutlich geringere Erfolgsraten aufweist als bei den pollenassoziierten Allergien [26], trägt die komponentenbasierte Diagnostik sinnvoll zur Verbesserung eines individuellen Therapiekonzepts bei. Da die aktuell verfügbaren Präparate zur SIT v. a. gegen die Majorallergene Der p 1 und Der p 2 standardisiert sind, sollte eine Therapie bei fehlender Sensibilisierung gegen die Majorallergene verworfen oder zumindest kritisch mit dem Patienten diskutiert werden. Sensibilisierungen gegen die Majorallergene sind deutlichen regionalen Schwankungen unterworfen und können in einer nicht unerheblichen Anzahl der Fälle fehlen, obwohl positive Reaktionen gegen das Milbenextrakt nachgewiesen werden können [27, 28]. Die Testung mittels Milbenextrakt ist somit zum Nachweis einer Milbenallergie geeignet, auch wenn diese auf andere Allergenkomponenten wie z. B. Der p 23 zurückzuführen ist [29, 30]. Vor der Einleitung einer SIT sollte aufgrund der Standardisierung der Therapiepräparate jedoch auf Der p 1 und Der p 2 getestet werden. Sensibilisierungen gegen Der p 10 (Tropomyosin) sind deutlich seltener und können bei Unverträglichkeitsreaktionen gegenüber Meeresfrüchten zur Klärung der Symptome beitragen [28, 31]. Kreuzreaktive Antikörper gegen Der p 10 reagieren mit Tropomyosin, z. B. in Shrimps, und lösen so eine allergische Reaktion aus.

Bei Tierhaarallergien spricht eine Sensibilisierung gegen Lipocaline oder Serumalbumin für eine breite Reaktionsbereitschaft gegenüber sämtlichen fell-

tragenden Tieren, während eine reine Sensibilisierung etwa gegen Katzen-Uteroglobulin Fel d 1 eine ausschließliche Katzenallergie erwarten lässt.

Während bei der Milbenallergie die Testung auf Der p 1 und Der p 2 bereits vielerorts Einzug in die alltägliche Diagnostik gehalten hat, ist der Einsatz der komponentenbasierten Diagnostik bei Tierhaarallergien noch vorwiegend zu wissenschaftlichen Zwecken und weniger in der alltäglichen Praxis einzuordnen.

Ausblick

Welches sind die Vorteile der Untersuchung mit Allergenkomponenten gegenüber der Testung mit Gesamtextrakten? Die molekulare Diagnostik mit Allergenkomponenten ermöglicht eine gezielte Testung auf relevante Sensibilisierungen gegenüber den allergieauslösenden Komponenten [32]. Somit erlaubt sie eine höhere analytische diagnostische Empfindlichkeit und Präzision. Es werden nur definierte Einzelmoleküle und somit nur relevante Proteine gemessen, keine Kontaminationen mit anderen Allergenen, unabhängig vom Ausgangsmaterial [33]. Dies ebnet den Weg hin zu einer personalisierten und stratifizierten Allergiediagnostik in der HNO-Heilkunde [34].

» Einen Einblick in molekulare Allergiediagnostik bietet der „EAACI Molecular Allergy User's Guide“

Es können umfassende individuelle Sensibilisierungsmuster erstellt werden, die eine bessere Einordnung der klinischen Symptome erlaubt. In vielen Fällen ermöglicht sie eine Abgrenzung von Primärsensibilisierungen (genuinen Sensibilisierungen) und Kreuzreaktionen. Bei entsprechenden technischen Voraussetzungen kann somit eine höhere Sensitivität und Spezifität erreicht werden (beispielsweise entfällt die Interferenz mit CCD). Nachteile sind weiterhin, dass bislang (noch) nicht alle relevanten Allergene für die molekulare Diagnostik verfügbar sind, die Herstellung korrekt gefalteter rekombinanter Moleküle manch-

mal schwierig ist und Polymorphismen natürlicher Extrakte teilweise schwer abbildbar sind [35].

Definitiv besteht ein verstärkter Fortbildungsbedarf für alle anwendenden allergologisch tätigen Kollegen, da die Interpretation der Ergebnisse ein umfangreicheres Wissen voraussetzt. Einen guten Einblick in den aktuellen Stand des Wissens zur molekularen Allergiediagnostik bietet der „EAACI Molecular Allergy User's Guide“ [36].

Durch eine präzisere Diagnostik werden in einigen Fällen höhere Kosten entstehen, denen von regulatorischer Seite Rechnung getragen werden muss. Auf der anderen Seite ist zu erwarten, dass es durch eine Verbesserung der Diagnostik mittel- bis langfristig auch zu einem verbesserten Therapieansprechen kommt und damit zu einer besseren Kosten-Nutzen-Relation.

Fazit für die Praxis

- Die molekulare, komponentenbasierte Diagnostik (CRD) setzt sich zunehmend in der alltäglichen klinischen Routine durch.
- Eine umfangreiche Zusammenstellung aktuell bekannter Allergenkomponenten bietet die Allergomedienbank (<http://www.allergome.org>).
- Die Bestimmung allergenspezifischer IgE-Antikörper wird heute mittels Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay, seltener Enzym-Immunoassay, durchgeführt.
- Allergen-Microarrays bieten die Möglichkeit einer simultanen Testung multipler Allergenkomponenten.
- Sie ermöglichen die Erstellung eines umfassenden individuellen Sensibilisierungsmusters.
- Eine Immuntherapie ist vorrangig bei Vorliegen einer Sensibilisierung auf die Majorallergene sinnvoll, da die zur spezifischen Immuntherapie verwendeten Extrakte v. a. auf die Majorallergene standardisiert sind.
- Die CRD ebnet den Weg hin zu einer personalisierten und stratifizierten Allergiediagnostik in der HNO-Heilkunde.

Korrespondenzadresse

S. Becker

Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik,
Universitätsmedizin Mainz
Langenbeckstr. 1, 55131 Mainz, Deutschland
sven.becker@unimedizin-mainz.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. L. Klimek hat Gelder für Studien-durchführung, Berater- und/oder Gutachtertätigkeit, Vortrags- und/oder Schulungstätigkeiten und/oder bezahlte Mitarbeit in einem wissenschaftlichen Beirat erhalten von den Firmen ALK-Abelló, Allergopharma, Bencard, Bionorica, Biomay, Boehringer Ingelheim, Cytos, Circassia, Euroimmun, Dr. Focke, HAL, GSK, Leti, Lofarma, MEDA/Mylan, Novartis, Stallergenes, Thermofisher und Roxall; S. Becker hat Honorare für Vorträge für die Firmen HAL Allergy, Thermo Fischer Scientific und Allergopharma erhalten. Ein direkter Interessenkonflikt besteht nicht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine von den Autoren durchgeführten Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Klimek L (2013) The new face of ENT allergology. *HNO* 61:817. doi:10.1007/s00106-013-2758-4
2. Forster U, Sperl A, Klimek L (2013) The NTP in allergy research : open questions regarding nasal provocation tests using allergens. *HNO* 61:818–825. doi:10.1007/s00106-013-2757-5
3. Traidl-Hoffmann C, Jakob T, Behrendt H (2009) Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 123:558–566. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.003
4. Kleine-Tebbe J, Ollert M, Jakob T (2010) Molekulare Allergologie-Teil 1. Nomenklatur, Proteinfamilien, Datenbanken und potentieller Nutzen. *Allergo J* 19:390–394
5. Klimek L, Pfaar O, Rietschel E (2013) Allergien bei Kindern und Jugendlichen. Grundlagen und klinische Praxis Bd. 1. Schattauer, Stuttgart
6. Commins SP et al (2009) Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose- α -1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 123:426–433. doi:10.1016/j.jaci.2008.10.052
7. Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Platts-Mills TA (1986) Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ* 64:767–774
8. King TP et al (1994) Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 105:224–233
9. King TP et al (1995) Allergen nomenclature. *Allergy* 50:765–774
10. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H (2008) Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 121:847–852e7. doi:10.1016/j.jaci.2008.01.025
11. Renz H et al (2010) In-vitro-Allergiediagnostik. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) unter Beteiligung des Ärztverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG). *Allergo J* 19:110–128
12. Sinha M et al (2014) Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *ScientificWorldJournal*. doi:10.1155/2014/543195
13. Canis M, Groger M, Becker S, Klemens C, Kramer MF (2010) Recombinant allergen profiles and health-related quality of life in seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 31:219–226. doi:10.2500/aap.2010.31.3333
14. Canis M, Groger M, Becker S, Klemens C, Kramer MF (2011) Recombinant marker allergens in diagnosis of patients with allergic rhinoconjunctivitis to tree and grass pollens. *Am J Rhinol Allergy* 25:36–39. doi:10.2500/ajra.2011.25.3551
15. San Nicolo M, Braun T, Eder K, Berghaus A, Groger M (2016) Clinical relevance of IgE to profilin and/or polcalcin in pollen-sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 169:101–107. doi:10.1159/000444279
16. Chapman MD et al (2008) The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 122:882–889e2. doi:10.1016/j.jaci.2008.07.030
17. Klimek L, Vetter D, von Bernus L, Thorn C (2010) Allergen-Microarrays für die molekulare Komponentendiagnostik von Typ-I-Allergien. An der Schwelle von der Forschung zur Routinediagnostik. *HNO* 59:988–993
18. Ott H et al (2008) Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy* 63:1521–1528. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01748.x
19. Valenta R, Kraft D (2002) From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 14:718–727
20. Valenta R et al (1999) The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 29:896–904
21. Schmid-Grendelmeier P (2010) Recombinant allergens. For routine use or still only science? *Hautarzt* 61:946–953. doi:10.1007/s00105-010-1967-y
22. Klimek L, Willers J, Schendzielorz P, Kundig TM, Senti G (2013) Immunotherapy of allergic rhinitis without allergens? : new options for immunomodulation by vaccination with virus-like particles and CpG motifs. *HNO* 61:826–833. doi:10.1007/s00106-013-2761-9
23. Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R (2008) Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. *Clin Exp Allergy* 38:1400–1408. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03031.x
24. Focke M, Marth K, Valenta R (2009) Molecular composition and biological activity of commercial birch pollen allergen extracts. *Eur J Clin Invest* 39:429–436. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02109.x
25. Heiss S et al (1999) Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing. *J Invest Dermatol* 113:830–837. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00796.x
26. Calderon MA et al (2007) Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. doi:10.1002/14651858.CD001936.pub2
27. Becker S et al (2013) IgE reactivity profiles among house dust mite allergic patients in Bavaria. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270:3177–3182. doi:10.1007/s00405-013-2516-y
28. Weghofer M et al (2008) Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest* 38:959–965. doi:10.1111/j.1365-2362.2008.02048.x
29. Becker S et al (2016) Real-life study for the diagnosis of house dust mite allergy – the value of recombinant allergen-based IgE serology. *Int Arch Allergy Immunol* 170:132–137. doi:10.1159/000447694
30. Weghofer M et al (2013) Identification of Der p 23, a peritrophin-like protein, as a new major Dermatophagoides pteronyssinus allergen associated with the peritrophic matrix of mite fecal pellets. *J Immunol* 190:3059–3067. doi:10.4049/jimmunol.1202288
31. Becker S, Groger M, Canis M, Pfoegner E, Kramer MF (2012) Tropomyosin sensitization in house dust mite allergic patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269:1291–1296. doi:10.1007/s00405-011-1826-1
32. Niederberger V et al (2004) Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(Suppl 2):14677–14682. doi:10.1073/pnas.0404735101
33. Niederberger V, Valenta R (2006) Molecular approaches for new vaccines against allergy. *Expert Rev Vaccines* 5:103–110. doi:10.1586/14760584.5.1.103
34. Chaker AM, Klimek L (2015) Individualized, personalized and stratified medicine: a challenge for allergology in ENT? *HNO* 63:334–342. doi:10.1007/s00106-015-0004-y
35. Ott H, Folster-Holst R, Merk HF, Baron JM (2010) Allergen microarrays: a novel tool for high-resolution IgE profiling in adults with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* 20:54–61. doi:10.1684/ejd.2010.0810
36. Matricardi PM et al (2016) EAACI molecular allergology user's guide. *Pediatr Allergy Immunol* 27(Suppl 23):1–250. doi:10.1111/pai.12563
37. Hemmer W (2009) Allergiediagnostik: Extrakte oder Moleküle? *Wien Med Wochenschr* 6(8):9–10