

In-vitro-Allergiediagnostik

Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) unter Beteiligung des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) und der Deutschen Dermatologische Gesellschaft (DDG)

HARALD RENZ¹, TILO BIEDERMANN², ALBRECHT BUFE³, BERNADETTE EBERLEIN⁴, UTA JAPPE⁵, MARKUS OLLERT⁴, ARND PETERSEN⁶, JÖRG KLEINE-TEBBE⁷, MONIKA RAULF-HEIMSOH⁸, JOACHIM SALOGA⁹, THOMAS WERFEL¹⁰, MARGITTA WORM¹¹

¹Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik – Zentrallaboratorium, Philipps-Universität, Marburg; ²Universitäts-Hautklinik, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen; ³Experimentelle Pneumologie, Universitätsklinik Bergmannsheil, Ruhr-Universität Bochum; ⁴Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München; ⁵Abteilung Allergologie, Paul-Ehrlich-Institut, Langen; ⁶Laborgruppe Molekulare und Klinische Allergologie, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Forschungszentrum Borstel; ⁷Allergie- und Asthma-Zentrum Westend, Berlin; ⁸Kompetenz-Zentrum Allergologie/Immunologie, BGFA – Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum; ⁹Hautklinik und Poliklinik, Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz; ¹⁰Klinik für Dermatologie und Venerologie, Medizinische Hochschule Hannover; ¹¹Allergie-Centrum Charité, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin

In vitro allergy diagnostics

1. Zielsetzung

Ziel des Positionspapiers ist die wissenschaftlich begründete Bewertung der verfügbaren Testsysteme der In-vitro-Allergiediagnostik. Dazu werden die zur Verfügung stehenden serologischen und zellulären Systeme in Bezug auf Diagnostik, Prävention und Therapiekontrolle evaluiert.

Ein weiteres Ziel des Positionspapiers ist, Perspektiven zur Weiterentwicklung der In-vitro-Allergiediagnostik darzustellen, um im Bereich der Basisdiagnostik und auch spezialisierter Anwendungen die diagnostische Wertigkeit zu steigern. Dies umfasst auch Aspekte zur Weiterentwicklung der Standardisierung verschiedener Testverfahren.

2. Allgemeiner Teil

Präanalytik, Analytik und Postanalytik beeinflussen die Qualität der Labordiagnostik.

In der **präanalytischen Phase** sind Aspekte der Indikationsstellung sowie die Probenabnahme, -aufbereitung, -lagerung und -handhabung von zentraler Bedeutung. In der **analytischen Phase** werden Methoden hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit, Sensi-

tivität, Spezifität und technischen Durchführung überprüft. Dies gilt insbesondere für komplexere zelluläre Testverfahren. Fragen der internen und externen Qualitätskontrolle sind von essenzieller Bedeutung. In der **postanalytischen Phase** stehen Interpretation, Beurteilung und Einordnung des Testbefundes in das Krankheitsbild im Mittelpunkt. Ein zukünftiges Ziel soll darüber hinaus die Entwicklung von Konsensusprotokollen zur **Testdurchführung** sein.

Bei der Anwendung der Testsysteme für In-vitro-Allergiediagnostik gelten die allgemeinen Standards der „Guten Laborpraxis (GLP)“. Zentraler Teil der Postanalytik ist die medizinische Befundung und Beurteilung der Testresultate. Dies setzt seitens des Arztes eine (spezialisierte) Erfahrung im Umgang mit den jeweiligen Testverfahren voraus. Insbesondere komplexere und zelluläre Methoden stellen hohe Anforderungen an die Präanalytik und Analytik. Eine entsprechende Schulung und Erfahrung sind daher auch beim technischen Personal von essenzieller Bedeutung.

Die Qualitätssicherung im diagnostischen Laboratorium wird durch die Bundesärztekammer (BÄK) geregelt. Hierzu erlässt die BÄK Richtlinien (RiLiBÄK), die für den Anwender absolut verbindlich sind. Die letzte Richtlinie der BÄK zu Qualitätssicherungsmaßnahmen im Laborbereich wurde im Deutschen Ärzteblatt im Februar 2008 publiziert (Dtsch Ärztebl 2008; 105: A-341, B-305, C-301).

Diese Richtlinie ist von all denjenigen Ärztinnen und Ärzten anzuwenden, die laboratoriumsmedizi-

Korrespondenzanschrift/Correspondence to

Prof. Dr. Harald Renz
Abteilung Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik –
Zentrallaboratorium
UK Gießen und Marburg GmbH
Baldingerstraße
35033 Marburg
E-Mail: renzh@med.uni-marburg.de

Entwicklungsstufe

S1

Stand

21. August 2009

nische Untersuchungen durchführen. Also gilt sie nicht nur für Fachärzte der Laboratoriumsmedizin und deren Praxen, sondern auch für alle anderen Ärztinnen und Ärzte, die innerhalb ihrer Praxen Labortests im Rahmen der Patientenversorgung durchführen oder interpretieren. Darüber hinaus gilt diese Richtlinie sowohl für den ambulanten als auch den Krankenhausbereich.

In die aktuelle Richtlinie ist eine Reihe von gravierenden Änderungen aufgenommen worden, die auch für den Bereich der In-vitro-Allergiediagnostik Auswirkungen haben. Die wichtigsten Aspekte seien hier zusammengefasst:

— Für die Durchführung der internen und externen Qualitätskontrolle wird ein umfassendes Dokumentationssystem gefordert. Dieses lehnt sich im Wesentlichen an die Richtlinien für die Akkreditierung von diagnostischen Laboratorien an. Das heißt, ein Labor/eine Praxis, welches/welche sich den Akkreditierungsregeln unterwirft, kann davon ausgehen, dass es/sie die Maßgaben der RiLiBÄK entsprechend erfüllt.

Hierzu zählen u. a. das Führen eines Qualitätsmanagement-Handbuchs, das Anlegen von Standardarbeitsanleitungen (SOP) für Tests und Geräte, die Validierung der eingesetzten Testverfahren, die Lenkung der Dokumente, die Klärung von Beschwerden, die Feststellung von Fehlern und Maßnahmen zu deren Korrektur und die Durchführung interner Audits.

Eine solche Akkreditierung des diagnostischen Laboratoriums kann z. B. nach DIN EN ISO 15189 erfolgen. Offizielle Stellen in Deutschland, die zugelassen sind, solche Akkreditierungen diagnostischer Laboratorien durchzuführen, sind z. B. die Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie GmbH (DACH; www.dach-gmbh.de) oder die Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten (ZLG; www.zlg.de).

Wenn auf eine Akkreditierung verzichtet wird, so muss der verantwortliche Arzt die Einhaltung der entsprechenden Qualitätsregeln, wie sie in der RiLiBÄK festgehalten sind, sicherstellen, überwachen und kontrollieren.

— Für alle eingesetzten Labortests müssen interne **Qualitätssicherungsmaßnahmen** durchgeführt werden. Diese erfolgen mit sog. Kontrollproben. Diese Kontrollproben müssen mindestens in jedem Testlabor eingesetzt werden. Die Kontrollprobenmessungen werden bewertet. Hierbei sind bestimmte Fehlergrenzen in der Messabweichung zu beachten. Wie diese Fehlergrenzen für einzelne Tests berechnet werden können, ist ebenfalls in der RiLiBÄK dargestellt.

Wichtig ist, dass bei einer Messabweichung des Einzelwerts, außerhalb der vorgegebenen Fehler-

grenze, Konsequenzen für die Freigabe der Messergebnisse von Patientenproben resultieren. Dies ist ebenfalls in der RiLiBÄK geregelt.

Wichtig ist deshalb, dass diese internen Qualitätssicherungsmaßnahmen für alle Tests gelten, die im Rahmen der Patientenversorgung eingesetzt werden, also auch für spezifisches IgE, spezifisches IgG, zelluläre Tests und andere.

— Die **externe Qualitätskontrolle (Ringversuche)** ist ein weiterer essenzieller Aspekt des Qualitätsmanagementsystems. Für alle in der Praxis/im Labor durchgeführten Tests muss an entsprechenden nationalen Ringversuchen teilgenommen werden, die von anerkannten Referenzinstitutionen angeboten werden. In Deutschland sind dies insbesondere zwei Referenzinstitutionen, nämlich das Referenzinstitut für Bioanalytik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (www.dgkl-rfb.de) sowie Instand e. V. (www.instand-ev.de).

Es muss unterschieden werden zwischen sog. RiLiBÄK-pflichtigen Parametern, die in der Tabelle B1a bis c der RiLiBÄK aufgeführt sind, und solchen, die als nicht RiLiBÄK-pflichtig eingestuft wurden. Aktuell wird kein Parameter der In-vitro-Allergiediagnostik in dieser Tabelle aufgeführt, es unterliegen also alle der zweiten Kategorie. Das gilt auch für die Bestimmung des Gesamt-IgE. Bei den RiLiBÄK-pflichtigen Parametern besteht bei den Ringversuchen eine quartalsweise Teilnahmepflicht, während bei den nicht RiLiBÄK-pflichtigen Parametern, gemäß den Gremienbeschlüssen für den Bereich Medizinische Laboratoriumsdiagnostik, eine Teilnahme an Ringversuchen mindestens zweimal jährlich erfolgen muss.

Die **Reagenzienqualität** stellt in der In-vitro-Allergiediagnostik eine Herausforderung dar. Für den Einsatz von Allergenpräparationen in In-vitro-Tests ist die nach dem jeweiligen Stand der Wissenschaft höchstmögliche Qualität der Allergene zu fordern. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der eingesetzten Allergene soll mit den einschlägigen biochemischen und molekularen Methoden analysiert werden. Für den Einsatz zur Diagnostik spezifischer IgE-Antikörper können als wissenschaftlich begründet solche Allergene angesehen werden, für die positive Humansen vorliegen, die durch entsprechende klinische Symptome bzw. Provokationstests charakterisiert sind. In Einzelfällen können auch Allergene als wissenschaftlich abgesichert angesehen werden, sofern die Wirksamkeit allergenspezifischer IgE-Antikörper mithilfe von In-vivo-Testungen (z. B. Hauttestungen) belegt werden konnte. Für diese und alle anderen in den Assayverfahren verwendeten Reagenzien müssen die jeweiligen physikochemischen Eigenschaften in Bezug auf Haltbarkeit und Stabilität im Testsystem bekannt sein.

Zur Erzielung zuverlässiger Analysenergebnisse ist die Funktionsfähigkeit der benutzten Reagenzien und Messgeräte zu gewährleisten. Für diagnostische Verfahren sind ausschließlich geeignete, wissenschaftlich abgesicherte Methoden zu verwenden.

Für die nachfolgende Bestandsanalyse der verschiedenen In-vitro-Tests wurden, soweit verfügbar, als Basis publizierte Studien herangezogen, in denen ein Vergleich zur Klinik validiert worden ist.

Interne und externe Qualitätssicherungsmaßnahmen tragen im Labor entscheidend zum gleichbleibend hohen Qualitätsstandard bei.

3. Gesamt-IgE

3.1. Allgemeines

Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE) kommen im Serum im Vergleich zu den anderen Immunglobulinklassen in wesentlich geringerer Konzentration vor. Sie besitzen die Fähigkeit, über die Bindung an selektive hoch- oder niedrigaffine zelluläre Rezeptoren spezifische Reaktionen des Immunsystems auszulösen [74]. Sie unterscheiden sich strukturell von IgG-Antikörpern durch eine zusätzliche sog. CH-Region der konstanten Region der schweren Kette.

Für die Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung des Gesamt-IgE ist ein internationaler WHO-Standard verfügbar und ermöglicht eine absolute Konzentrationsbestimmung des Gesamt-IgE.

3.2. Indikationen zur Bestimmung von Gesamt-IgE

- Im Zusammenhang mit der Bestimmung von spezifischem IgE:
 - als Hinweis auf das Vorliegen einer atopischen Disposition in Verbindung mit dem spezifischen IgE,
 - als Interpretationshilfe für die Beurteilung der spezifischen IgE-Konzentration.
- In besonderen Fällen zur ergänzenden Diagnostik von Erkrankungen, die mit Atopie assoziiert sein können:
 - Urtikaria, Quincke-Ödem, eosinophile Gastroenteritis, unklare Exantheme, Verdacht auf Arzneimittelallergien.
- Bei weiteren Erkrankungen im Rahmen der Differenzialdiagnostik:
 - bei eosinophilen Lungeninfiltraten, allergischer Alveolitis (z. B. bei Farmerlunge oder Taubenzüchterkrankheit) oder Vaskulitiden wie der Wegener-Granulomatose und dem Churg-Strauss-Syndrom, bei allergischer bronchopulmonaler Aspergillose.
- Zur Diagnostik und Therapiekontrolle:
 - bei Parasitosen, besonders bei unklarer Bluteosinophilie und negativem Parasitenbefund, z. B.

Filariose, Trichinose, Toxokariasis, Capillariasis philippinensis, tropischer Eosinophilie.

- Im Rahmen der Diagnostik angeborener oder erworbener Immundefekte:
 - T-Zell-Defekte oder Hyper-IgE-Syndrom.

3.3. Bestimmungsmethoden

Das Gesamt-IgE kann in Serum, Plasma oder Sekreten untersucht werden. Verfahren sind:

- Nephelometrie,
- Immunoassays mit kompetitiven oder immunometrischen Verfahren und Anwendung eines Enzym-, Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder radioaktiv markierten Anti-IgE-Reaktionspartners.

3.4. Referenzbereiche (für Serum)

Die Angaben zu Referenzbereichen für das Gesamt-IgE variieren. Je nach verwendeter Methode und epidemiologischer Datenbasis können die Normalwerte höher oder niedriger ausfallen [34]. Im Alter von sechs bis 14 Jahren ist die Streuung der Normalwerte am höchsten [72]. Die Gesamt-IgE-Werte werden auch durch Nikotin- oder Alkoholgenuß beeinflusst.

3.5. Bewertung

Erhöhtes Gesamt-IgE im Rahmen der Atopiediagnostik: Die höchsten IgE-Werte finden sich bei der atopischen Dermatitis. Konzentrationen von mehr als 10.000 U/ml können erreicht werden. Bei sehr hohen Werten (> 20.000 U/ml) muss differenzialdiagnostisch ein zellulärer Immundefekt ausgeschlossen werden [51]. Hohes Gesamt-IgE gepaart mit stark vermehrter Eosinophilenzahl muss an eine Parasitose oder ein Hypereosinophiliesyndrom denken lassen [66]. Höhere Gesamt-IgE-Werte finden sich darüber hinaus während der Zeit der Allergenexposition. Generell ist die Bestimmung des Gesamt-IgE zum Atopiescreening weniger gut geeignet als das spezifische IgE gegen häufige Umweltallergene (Sammeltestung, keine Einzeltestung). Ein hohes Gesamt-IgE ist für das Vorliegen einer Atopie nicht beweisend, andererseits schließt ein normales (siehe oben) Gesamt-IgE eine atopische Erkrankung nicht aus [13].

Atopiediagnostik im Nabelschnurblut: Ein Wert kann nur beurteilt werden, wenn sichergestellt ist, dass das Nabelschnurblut nicht mit mütterlichem Blut kontaminiert wurde. Eine Erhöhung des Nabelschnur-IgE > 0,9 U/ml kann als prädiktiver Parameter für ein Atopierisiko angesehen werden [6]. Hingegen schließen Werte < 0,9 U/ml die Atopieentwicklung nicht aus. Aus diesem Grund ist das Nabelschnur-IgE-Screening nicht zu empfehlen. Diese Bestimmung sollte einer Risikopopulation, z. B. positive Atopieanamnese in der Familie, vorbehalten bleiben.

Immundefekte: Eine Vielzahl von angeborenen Immundefekten, insbesondere des zellulären Immunsystems, kann mit einer Erhöhung des Gesamt-IgE einhergehen [79]. Im Rahmen der Immundefektdiagnostik ist die Bestimmung des Gesamt-IgE Teil des Screenings für das humorale Immunsystem, zusammen mit den übrigen Immunglobulinklassen und -subklassen.

Infektionskrankheiten: Im Rahmen der HIV-Infektion entwickelt sich insbesondere im Spätstadium bei ausgeprägter Depletion der CD4⁺-Zellen ein atopieähnliches Syndrom, welches mit zum Teil exzessiver IgE-Erhöhung einhergeht [53]. Nach bestimmten Infektionskrankheiten wie Mykoplasmeninfektionen, Pertussis und Masern sowie RSV-Bronchiolitis sind Gesamt-IgE-Erhöhdungen beobachtet worden.

Weitere Erkrankungen: Erhöhungen des Gesamt-IgE finden sich auch bei folgenden Erkrankungen:

- bestimmte Autoimmunerkrankungen,
- Churg-Strauss-Syndrom,
- einige maligne Erkrankungen und
- Lymphome.

Das Gesamt-IgE dient im Zusammenhang mit der Bestimmung des spezifischen IgE als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung der spezifischen IgE-Werte, es kann jedoch eine spezifische Sensibilisierung nie ausschließen oder nachweisen. Zum „Atopie-screening“ ist das Gesamt-IgE nur eingeschränkt geeignet. Außerhalb der Allergologie besitzt das Gesamt-IgE vor allem eine Bedeutung bei der Diagnostik von Parasitosen und Immundefekten.

3.6. „Freies“ Gesamt-IgE

Wenn Patienten mit Anti-IgE (Omalizumab) behandelt werden, können die üblichen Gesamt-IgE-Messungen abweichende Werte zeigen, so dass ein Assay notwendig ist, der ausschließlich das freie totale IgE bestimmt [27, 28]. Bei diesem Assay wird ein biotinylierter FcεR1-Antikörper zu dem Serum des Patienten gegeben. Das freie IgE, das nicht von dem Anti-IgE-Antikörper (Omalizumab) komplexiert wurde, wird an den biotinylierten Anti-FcεR1-Antikörper binden. Diese Serumprobe wird dann mit einem an eine Festphase gekoppelten Anti-IgE inkubiert. Der so gebundene biotinylierte Anti-FcεR1 wird dann über Streptavidin nach Substratzusatz enzymatisch bestimmt. Die Menge der gebundenen biotinylierten α-Kette ist proportional gegenüber der Menge des freien IgE in der Serumprobe. Eine Referenzkurve wird mittels eines kommerziell erhältlichen Gesamt-IgE-Kalibrators erstellt. Es wird empfohlen, ein bis drei Monate nach Beginn einer Anti-IgE-Behandlung das totale freie IgE zu bestimmen, allerdings steht der Test noch nicht zur Routineanwendung zur

Verfügung. Das Assaysystem ist geeignet, um Patienten, die mit Omalizumab behandelt werden, zu verfolgen und gegebenenfalls die Dosis anzupassen.

4. Spezifisches IgE (sIgE)

4.1. Allgemeines

Spezifisches IgE beschreibt diejenige Fraktion der gesamten IgE-Antikörper im Serum, deren Spezifität gegenüber bestimmten Allergenen mithilfe von In-vitro-Testverfahren bestimmt werden kann. Der Nachweis von sIgE bedeutet, dass eine spezifische Sensibilisierung gegen das entsprechende Allergen vorliegt. Es muss anschließend überprüft werden, ob die gefundene Sensibilisierung von klinischer Relevanz ist. Das sIgE ist damit nur ein Parameter in der klassischen allergologischen Stufendiagnostik: Anamnese – Hauttestung – Laboruntersuchung – Provokation (Abb. 1).

Die Qualität der verwendeten Allergene oder Extrakte (z. B. intakte Konformation der Proteine, Reinheitsgrad) spielt für die Bestimmung des sIgE eine zentrale Rolle.

4.2. Indikationen

Die Bestimmung von sIgE im Serum und die Hauttestung sind in der Allergiediagnostik grundsätzlich als gleichwertig zu betrachten.

Zur Bestimmung des sIgE werden primäre und sekundäre Indikationen unterschieden. Der primäre Nachweis von sIgE, d. h. Bestimmung vor anderen diagnostischen Maßnahmen wie der Hauttestung, ist indiziert bei:

- Patienten, bei denen die Hauttestung schwierig durchzuführen ist:
 - verminderte Belastbarkeit des Patienten (Gravidität, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, vasomotorische Dysregulation),
 - Hautveränderungen im Testbereich,
 - Vorliegen einer Urticaria factitia,
 - Säuglinge und Kleinkinder,
 - weitere Kontraindikationen zum Hauttest oder zu anderen diagnostischen Verfahren (Antihistaminikaeinnahme etc.),
 - Allergene, die für die Hauttestung nicht verfügbar sind.
- Gefährdung des Patienten:
 - z. B. anaphylaktischer Schock,
 - Verdacht auf hochgradige Sensibilisierung (Insektengiftallergie, Arzneimittelallergie, insbesondere β-Laktam-Antibiotika),
 - Einnahme von interferierenden Medikamenten wie β-Bockern im Einzelfall.

Der sekundäre Nachweis von sIgE, d. h. die Bestimmung nach anderen diagnostischen Maßnahmen, ist indiziert:

- als zusätzlicher Baustein bei Diskrepanz zwischen Hauttest und Anamnese,

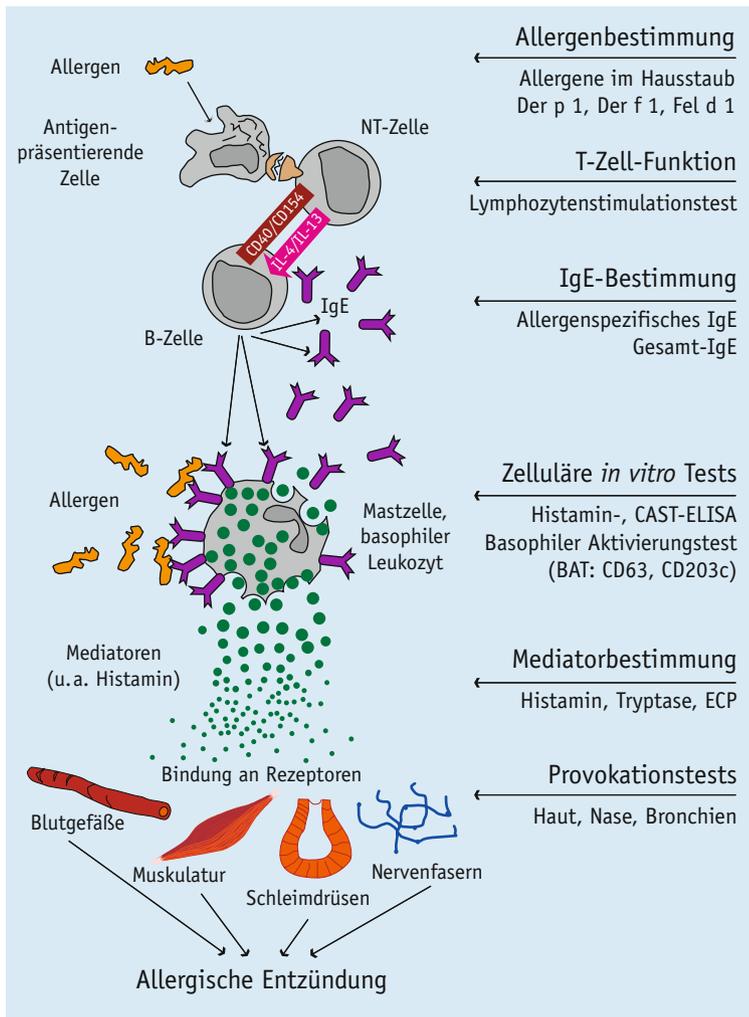


Abbildung 1. Modell der IgE-vermittelten Sensibilisierung und Effektorphase. Die Pfeile (rechte Bildhälfte) markieren den Angriffspunkt verschiedener diagnostischer Prinzipien und allergologischer Tests.

- in Einzelfällen bei weiteren klinisch ausgewählten Fragestellungen zur zusätzlichen Abschätzung des Sensibilisierungsgrades – auch als zusätzliche Maßnahme zur Vorbereitung für die Provokation oder die spezifische Immuntherapie.

4.3. Bestimmungsmethoden

Klassische Bestimmungsmethoden: Es existieren zahlreiche Methoden zur Bestimmung des sIgE, die auf ähnlichen Prinzipien beruhen: Spezifische Allergenextrakte und teils verfügbare rekombinante Allergene werden entweder an eine feste Phase gekoppelt oder als Flüssigallergene eingesetzt, an die Immunglobuline mit entsprechender Spezifität nach Inkubation binden [9]. Im Fall der Verwendung von Festphasen sollte deren Oberfläche die Aufnahme einer ausreichenden Menge und eine Qualität der Allergene sicherstellen, so dass im Idealfall die Gesamtheit des sIgE gebunden werden kann. Nach

Entfernen der ungebundenen Immunglobuline werden in einem anschließenden Inkubationsschritt radioaktive, mit Fluoreszenz markierte oder enzymgekoppelte Anti-IgE-Antikörper zugesetzt. Die gebundenen Anti-IgE-Antikörper werden entweder durch direkte Bestimmung der Radioaktivität, der Fluoreszenzintensität oder nach Zusatz eines Substrats durch die Messung der enzymatisch eingeleiteten Farbreaktion nachgewiesen. Die Quantifizierung gelingt durch eine auf bekannte Gesamt-IgE-Mengen bezogene Eichkurve (heterologe Interpolation). Dabei werden eine dem WHO-Standard für Gesamt-IgE-Werte angepasste Eichkurve zur Bestimmung der sIgE-Werte zugrunde gelegt oder künstlich definierte Einheiten verwendet. Somit ist bis heute eine echte Quantifizierung des sIgE im eigentlichen Sinne nicht möglich.

Abgesehen von den verwendeten Allergenen unterscheiden sich die Testsysteme nicht nur in der Festphase zur Kopplung der Allergene, sondern auch in den notwendigen Reagenzien und dem anschließenden Detektionssystem (Tab. 1).

Blotverfahren:

- Dot-Blot mit nicht aufgetrennten Allergenmolekülen: Eine Form der vereinfachten semiquantitativen Bestimmung von sIgE wird mit der Entwicklung von Streifentests angestrebt. Die an die Streifen gekoppelten Allergene werden zunächst mit Serum, anschließend mit Anti-IgE-Antikörpern inkubiert und die allergenspezifische Bindung mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Zur Semiquantifizierung erfolgt ein Vergleich mit einer standardisierten Farbskala. Die Standardisierung und die Quantifizierung stellen bei dieser Methode Probleme dar.
- Western-Blot (kein Routineverfahren, aufwendig, nur für ausgewählte Fragestellungen oder Forschungszwecke): Die verschiedenen Allergenquellen (z. B. Baum- oder Graspollen) enthalten unterschiedliche Allergenkomponenten (z. B. Bet v 1, Bet v 2 etc.), die sich molekular differenzieren lassen. sIgE-Antikörper gegen diese Einzelkomponenten lassen sich im Western-Blot-Streifentest qualitativ analysieren. Die durch Elektrophorese getrennten und auf geeignete Membranen übertragenen (Glyko-)Proteinkomponenten der Allergenextrakte werden in Streifen geschnitten mit Serum inkubiert. Der Nachweis der IgE-Bindung erfolgt anschließend unter Verwendung von Anti-IgE-Antikörpern mit den bekannten Nachweisverfahren. Als erstes klinisch relevantes Beispiel hat sich die Bestimmung von IgE-Antikörpern gegen Komponenten aus *Aspergillus fumigatus* etabliert, um die allergische bronchopulmonale Aspergillose abzugrenzen (siehe unten). Darüber hinaus gibt es bis heute nur vereinzelte Hinweise,

Tabelle 1. Testmethoden zur Bestimmung von allergenspezifischen IgE-Antikörpern

Anbieter, Ort, Internetadresse	Name (Art) des Assays	Allergene	Feste/flüssige Phase	Markierung	Detektionssystem	Standardkurve (Einheiten)
Adaltis, Freiburg, www.adaltis.com	ALLERgen	div	Flüssigallergene	aIgE-HRP	Photometrie (405/450 nm)	
ADL-Matritech GmbH, Freiburg, www.matritech.de	RA-Allergenpanel	div	Zellulose	aIgE-HRP	Chemilumineszenz	Kalibrierung an interner Standardkurve (LU-Klassen)
Allergopharma, Reinbek, www.allergopharma.de	Allervance® (EIA)	eig	CNR-aktivierte Papierscheiben	aIgE-AP	Photometrie (405 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/ml)
	Allergodip® (EIA-Streifen-test)	eig	Patentiertes Trägermaterial	aIgE-AP	Farbreaktion (chromogen)	Semiquantitativ (visuell, Klassen), kalibriert auf EAST-Basis (Klassen 1-4) Qualitativ
Artu Biologicals, Hamburg, www.artu-biologicals.de	IGE-VAC Fastcheck identisch mit FastCheckPOC Allergy	div	Nitrozellulose	aIgE-AP	Farbreaktion (chromogen)	Qualitativ
Dr. Fooke, Neuss, www.fooke-labs.de	Fooke-EAST® (EIA)	eig	CNR-aktivierte Papierscheiben	aIgE-AP	Photometrie (405 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/ml)
	Allerg-O-Liq® (EIA)	eig	aIgE an der Festphase und biotinylierte Flüssigallergene „Lateral flow“	S	Photometrie (450/620 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/ml)
	ALFA Seasonal Screen	eig		aIgE-Farbstoff	Farbanreicherung	Qualitativ
	ALFA Perennial Screen	eig		aIgE-AP	Farbreaktion (chromogen)	Qualitativ
DST, Schwerin, www.dst-diagnostic.com	FastCheckPOC Allergy (Streifen-test)	div	Nitrozellulose	aIgE-AP	Farbreaktion (chromogen)	Qualitativ
	LAS Liquid	div	Flüssigallergene	aIgE-AP	Photometrie (450/620 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/ml)
	Allergen System	div		aIgE-PO	Farbreaktion (chromogen)	Semiquantitativ (visuell, Klassen)
Euroimmun, Lübeck, www.euroimmun.de	EUROLINE (EIA-Streifen-test)	div	Nitrozellulose	aIgE-AP	Photometrie (405 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/l)
	Allercoat 6® (EIA)	div	CNR-aktivierte Papierscheiben	aIgE-AP	Photometrie (405 nm)	Referenz mit 1- oder 3-Punkt-Kalibrierung (AU/ml)
HAL Allergie, Düsseldorf, www.hal-allergie.de	ACTI. TIP® (EIA)	div	Polystyrolkugeln	aIgE-PO	Photometrie (405 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/ml)
Hycor Biomedical, Kassel, www.hycorbiomedical.com	HYTEC® (EIA)	div	CNR-aktivierte Papierscheiben	aIgE-AP	Photometrie (405 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/ml)
Intex, Weil am Rhein, www.intex-diagnostika.com	Allergoset® (EIA-Streifen-test)	div	Nitrozellulose	aIgE-PO	Farbreaktion (chromogen)	Semiquantitativ (visuell, Klassen)
MEDIWISS Analytic, Moers, www.mediwiss-analytic.de	AllergyScreen	div	Nitrozellulose	aIgE-B, SAP	Farbreaktion (chromogen)	Semiquantitativ (visuell, Klassen)
Milenia Biotech, Bad Nauheim, www.milenia-biotech.de	PolyCheck® System (EIA-Streifen-test)	div	Nitrozellulose	aIgE-B, SAP	Farbreaktion, Scannerauswertung	Referenzkurve mit konjugiertem Rinderalbumin (KU/l)
Phadia, Freiburg, www.phadia.com	ImmunoCAP® (FEIA)	eig	CNR-aktivierte Zellulose (ImmunoCAP)	aIgE-βG	Fluorophotometer	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (kU/l)
	ImmunoCAP® ISAC (FIA)	div	Mikrochip	aIgE-Fluoreszenzfarbstoff	Fluoreszenzmessung (Laserscanner)	Semiquantitativ, „in-house“-Referenzserum mit 1-Punkt-Kalibrierung (ISU)
R-Biopharm, Darmstadt, www.r-biopharm.com	Ridascreen® (EAST)	div	CNR-aktivierte Papierscheiben	aIgE-AP	Photometrie (405 nm)	Standardkurve mit Kalibrierung am WHO-IgE-Standard (IU/ml)
	Rida® AllergyScreen (EIA-Streifen-test)	div	Nitrozellulose	aIgE-B, SAP	Farbreaktion (chromogen)	Semiquantitativ (visuell, Klassen)
Siemens Medical Solutions Diagnostic, Bad Nauheim, www.medicalsiemens.de	Immunitite 2000® 3gAllergy™ (EIA)	div	Flüssigallergene	aIgE-AP	Chemilumineszenz	Am WHO-IgE-Standard (kU/l)

AE, Acridiniumester; aIgE, Anti-IgE-Antikörper; AP, alkalische Phosphatase; B, Biotin; βG, β-Galaktosidase; CNBr, Cyanbromid; div, diverse Hersteller; eig, eigene Herstellung; HRP, Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“); IgE, Gesamt-Serum-IgE; PO, Peroxidase; S, Streptavidin; SAP, Streptavidin-alkalische Phosphatase

dass das Vorkommen von sIgE-Antikörpern gegen ein Muster von Allergenkomponenten mit bestimmten Erkrankungen oder Verläufen korreliert. Es bleibt daher abzuwarten, inwieweit der Nachweis von Allergenkomponenten einzelner Spezies dem Kliniker zusätzliche Auskünfte geben kann (siehe auch rekombinante Allergene). Validität, Linearität, Parallelität und Reproduzierbarkeit der verschiedenen Testsysteme können durch unterschiedliche Variablen beeinflusst werden.

4.4. Interpretation

Allgemeines: Das Ergebnis der spezifischen IgE-Testung kann nur im Zusammenhang mit Anamnese, Klinik und den eventuell zusätzlichen Ergebnissen organspezifischer Provokationstests richtig interpretiert werden. Die quantitativen Ergebnisse der sIgE werden üblicherweise von den verschiedenen Herstellern in Graduierungen oder Klassen eingeteilt. Sowohl die Allergenzusammensetzungen, die verwendeten Reagenzien als auch der technische Aufbau der Bestimmungsmethoden weichen erheblich voneinander ab, so dass ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse, gemessen mit unterschiedlichen Systemen, kaum möglich ist. Verschiedene Hersteller bieten eigene Qualitätskontrollen an, die eine Vergleichbarkeit der Testergebnisse zwischen den Laboratorien sicherstellen sollen. Da die meisten Erfahrungen mit dem seit Langem verfügbaren Phadebas-RAST-System und seiner Weiterentwicklung, dem ImmunoCAP-System von Phadia [16], vorliegen, sind beide Methoden in vielen Studien als Referenzsysteme für vergleichende Untersuchungen angewandt worden. Dennoch können diese Tests nicht als Standard verwendet werden, weil die Variablen der In-vitro-sIgE-Bestimmung auch in diese Systeme mit eingehen. Erst bei Verfügbarkeit von nationalen und internationalen Standards und entsprechenden Reagenzien zur Erstellung einheitlicher Standardkurven ist eine Vergleichbarkeit der Methoden möglich. Untersuchungen von Ollert et al. [58] zeigten, dass eine Herabsetzung der Quantifizierungsgrenze von 0,35 kU/l auf 0,1 kU/l, die technisch mit der neuesten Gerätegeneration möglich wurde, eine bessere Übereinstimmung zwischen Hauttestbefunden und den spezifischen IgE-Werten ergab. Weitere Untersuchungen sind allerdings erforderlich, um die Wertigkeit der Nachweisgrenze als klinische Entscheidungsgrenze zu überprüfen.

Screeningtests für spezifische IgE-Antikörper:

Eine Vielzahl von Screeningtests ist zum Nachweis von sIgE gegen Mischungen aus Nahrungsmittel- und Inhalationsallergenen verfügbar. Ein positiver Screeningtest besagt lediglich, dass eine Sensibilisierung gegen eines oder mehrere Allergene vorliegt. Grundsätzlich ist das Screening zu begrüßen, wenn

damit die Rationalisierung der Diagnostik erreicht wird, jedoch sollte der Screeningcharakter dieser Untersuchungen deutlich sein. Generell muss aber der Stellenwert solcher Screeningtests in größeren Studien evaluiert werden.

Durch den Nachweis erhöhter allergenspezifischer IgE-Antikörper lässt sich eine (IgE-vermittelte) spezifische Sensibilisierung dokumentieren, deren klinische Aktualität/Relevanz mittels Anamnese und gegebenenfalls Provokationstests bewertet werden muss.

Einschränkung der Spezifität des Nachweisverfahrens und der Relevanzbeurteilung bei Vorliegen von Kreuzreaktionen gegen Kohlenhydratepitope („cross-reactive carbohydrate determinants“ [CCD]):

Viele Allergene pflanzlichen Ursprungs sind Glykoproteine, bestehend aus einem Protein und einer oder mehreren kovalent gebundenen Kohlenhydrateseitenketten. Im Gegensatz zu klassischen Peptidepitopen tragen die Glykoepitope dazu bei, dass Allergene auch außerhalb phylogenetisch verwandter Proteinfamilien Gemeinsamkeiten aufweisen. Da Glykoepitope prädestiniert sind, ausgeprägte Kreuzreaktionen zu verursachen, werden sie auch als kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten („cross-reactive carbohydrate determinants“, abgekürzt CCD) bezeichnet. Spezifisches Anti-CCD-IgE in Seren von Pollenallergikern beispielsweise ist für die Kreuzreaktivität mit vielen Inhalations- und Nahrungsmittelallergenen sowie den Hymenopterenengiften und Latex verantwortlich. Zumeist fehlt aber die klinische Relevanz dieser Sensibilisierung [2, 31, 37, 42, 49]. Das hatte man zunächst mit einer niedrigen Affinität erklärt und einer geringen biologischen Aktivität des Anti-CCD-IgE zugeschrieben. Jin et al. [39] zeigten, dass Anti-CCD-IgG-Antikörper stärker an CCD binden als an Proteine, so dass eine geringe klinische Relevanz der Anti-CCD-IgE möglicherweise auf einer Toleranzinduktion dieser ubiquitär vorkommenden Epitope durch den Genuss CCD-haltiger pflanzlicher Nahrungsmittel mit der Folge der Bildung „blockierender“ Anti-CCD-IgG beruht.

Die Bedeutung der CCD für die allergologische In-vitro-Diagnostik stellt sich wie folgt dar:

1. CCD scheinen die Spezifität der IgE-Detektion nachteilig zu beeinflussen (positive Reaktionen ohne klinische Relevanz).
2. Bei einigen Patienten wurden allerdings sowohl bei Nahrungsmittel- als auch bei Insektengiftallergie Hinweise auf eine klinische Relevanz von Anti-CCD-IgE gefunden, so dass die In-vitro-Diagnostik auf die CCD nicht verzichten kann. An das Vorliegen von Anti-CCD-IgE sollte gedacht werden bei a) Diskrepanz zwischen Hauttest- und serologischen Befunden und b) bei IgE-Positivität

gegenüber vielen verschiedenen pflanzlichen Allergenen [49, 78] sowie beiden Hymenopterengiften (Bienen- und Vespidengift) [32, 36, 37] und im Fall latexspezifischer IgE-Antikörper ohne klinische Relevanz [61, 62].

Im Wesentlichen sind diejenigen In-vitro-Testverfahren beeinträchtigt, die auf einer Antikörperbindung beruhen. Obwohl zelluläre Tests (u. a. Basophilaktivierungstest) weniger durch CCD-IgE beeinflussbar zu sein scheinen, zeigen Untersuchungen an Insektengiftallergikern, die IgE-positiv für beide Hymenopterengifte sind, mehrheitlich auch im Basophilaktivierungstest eine Doppelpositivität [20].

Verbesserung der CCD-dominierten In-vitro-Allergiediagnostik: Die Bestätigung des Verdachts auf das Vorliegen von Anti-CCD-IgE kann mithilfe eines CCD-haltigen Screeningallergens (z. B. Meerrettichperoxidase, Bromelain, Ascorbatoxidase) in den IgE-Nachweisverfahren erfolgen. Eine Inhibitionstestung mit dem verwendeten CCD-Screeningallergen kann die Testspezifität deutlich verbessern [36].

IgE-Reaktivitäten können gegen kreuzreaktive Kohlenhydratdeterminanten (CCD) gerichtet sein, die die Spezifität der IgE-Detektion verringern, aber meist ohne klinische Relevanz sind. Der In-vitro-Nachweis kann über CCD-haltige Antigene, z. B. Meerrettichperoxidase oder Bromelain, erfolgen.

Rekombinante Allergene und Mikroarray: Neben den natürlichen Allergenquellen und den daraus hergestellten Extrakten können auch durch Reinigung gewonnene oder rekombinant, d. h. mittels biotechnologischer Verfahren, hergestellte Allergene für die In-vitro-Diagnostik eingesetzt werden. Der Begriff „Allergen“ wird leider mehrdeutig verwendet: In der In-vitro-/In-vivo-Diagnostik bezeichnete man bisher die Allergenquelle als „Allergen“. In der molekular orientierten Forschung versteht man unter „Allergen“ die Allergeneinzelkomponenten der Allergenquellen, z. B. Phl p 1 als ein Allergen des Lieschgrasallergenextraktes. Die molekulare Charakterisierung von Einzelkomponenten in Allergenextrakten und ihre gezielte Verwendung für die In-vitro- und In-vivo-Allergiediagnostik erlauben es, eine komponentenaufgelöste Diagnostik zu etablieren [77]. Eine derartig verfeinerte Diagnostik ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn sie Konsequenzen für die Beratung und Therapie beinhaltet.

Für die rekombinante Herstellung von Einzelallergenen wird das Gen, das für das bestimmte Allergen kodiert, aus seiner natürlichen Allergenquelle isoliert und meist in ein Bakterium übertragen, so dass dieses das Allergen produzieren kann. Einen Überblick über die rekombinanten Allergene, die verfügbar sind, findet man im Internet unter www.allergome.org und www.allergen.org. Gegen-

über den natürlichen Allergenen erlauben die rekombinanten Allergene eine einfachere Isolierung. Nach ihrer Herstellung handelt es sich um identische Moleküle, während bei den natürlichen Allergenen strukturelle Varianten (Isoformen) vorkommen.

Bei in Bakterien exprimierten Proteinen fehlen posttranslationale Modifikationen wie Disulfidbrücken, Glykosylierung usw. Die 3-D-Struktur kann stark verändert sein, mit Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins, seine Immunität und Allergenität. (Die fehlende Glykosylierung kann durchaus erwünscht sein, da dann IgE-Reaktivitäten mit den CCD nicht auftreten können.)

Einzelne rekombinante Allergene konnten bereits erfolgreich in der Immundiagnostik bzw. -therapie eingesetzt werden. So können durch bestimmte Einzelallergene bei der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) bzw. beim allergischen Asthma auf Aspergillen verschiedene Sensibilisierungsprofile identifiziert werden [30]. Auch bei der Diagnostik der Naturlatexallergie können mithilfe von Einzelallergenen individuelle Sensibilisierungsmuster erkannt werden. Zusätzlich erweist sich ein Verfahren als sehr erfolgreich, bei dem die natürlichen Allergenextrakte mit labilen, aber dennoch wichtigen Einzelallergenkomponenten durch sog. „spiking“ angereichert werden. So konnte die Sensibilität der In-vitro-Diagnostik der Naturlatexallergie eindeutig durch die Zugabe des rekombinant hergestellten rHev b 5 zum natürlichen Latexallergenextrakt verbessert werden [47, 62].

In Fachkreisen wird nach wie vor diskutiert, ob rekombinant hergestellte Allergene den Allergenextrakten für die Austestung in der Diagnostik vorzuziehen wären. Ein großer Vorteil der rekombinanten Allergene ist ihre gleichbleibende Qualität und damit ihre gute Quantifizierbarkeit und Standardisierbarkeit. Allergenextrakte schwanken dagegen in ihrer Zusammensetzung von Hersteller zu Hersteller und Produktcharge zu Produktcharge.

IgE-Antikörper sind gegen bestimmte Epitope auf Allergenmolekülen gerichtet. Diese Allergenmoleküle lassen sich nach der Arbeitsgruppe von Breiteneder [38, 60] in wenige relevante Allergenfamilien zusammenfassen, wie z. B. Profilin, Bet v 1-Homologe, Lipidtransferproteine (LTPs). So zeigt die „AllFam“-Datenbank (www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/), dass alle pflanzlichen Nahrungsmittelallergene in nur 27 Pfam-Proteinfamilien gefunden werden, was einen Anteil von 0,33% der 8.183 möglichen Familien ausmacht. Alle Pollenallergene konnten 29 Pfam-Familien zugeordnet werden (entspricht 0,35% aller möglichen Proteinfamilien). Zusätzlich sind die meisten Allergene auf wenige dieser Proteinfamilien konzentriert. Vier Proteinfamilien beinhalten z. B. über 65% aller pflanzlichen Nahrungsmittelallergene. Damit zeigen die Daten, dass einerseits die Allerge-

nität eines Proteins eng mit seiner Struktur verknüpft ist und andererseits auch die Kreuzreaktivität eine Funktion der Struktur des Allergens ist. Dadurch ist es nicht notwendig, alle Allergenextrakte auf eine IgE-Reaktivität zu testen, sondern gezielt nur die zugrunde liegenden Allergenmoleküle. Auch könnte darüber entschieden werden, ob eine spezifische Hyposensibilisierung sinnvoll wäre, wie z. B. bei der Allergie gegen spezifische Gräserpollenallergene Phl p 1 und Phl p 5, wohingegen eine Sensibilisierung gegen Gräserprofilin, wenn überhaupt, meist nur schwache Reaktionen auslöst.

Da viele Allergene komplex aufgebaut sind (Disulfidbrücken, Kohlenhydratseitenketten), können sie nicht rekombinant in gleicher 3-D-Struktur wie die natürlichen Allergene hergestellt werden. Aus diesem Grund muss immer noch auf die aus den natürlichen Extrakten isolierten Allergene zurückgegriffen werden. Zum anderen bleibt bei der Verwendung von rekombinatem Material die Problematik der Isoallergene unberücksichtigt. So konnten vom Bet v 1 über 20 Isoformen isoliert werden, die sich in ihrer IgE-Reaktivität und in ihrer Immunogenität stark unterscheiden. Hier müsste festgelegt werden, welche, eventuell auch mehrere, Isoformen für die Diagnostik eingesetzt werden sollten. Überhaupt wird man auf Allergenextrakte nicht vollständig verzichten können, da sie immer wieder zum Abgleich gebraucht werden, ob man mit den rekombinanten Molekülen auch alle Allergene des Extraktes erfasst.

Eine logische Konsequenz wäre, die rekombinanten Allergene nach ihrer Übertragung in die Diagnostik auch für die Therapie zu verwenden. Bislang sind keine rekombinanten Therapieallergene zugelassen, jedoch werden derzeit klinische Studien durchgeführt, um die Wirksamkeit und Verträglichkeit der rekombinanten Allergene zur spezifischen Immuntherapie zu prüfen.

Die umfassende Diagnostik zur Erstellung eines Allergogramms des Patienten mittels chipbasierter In-vitro-Allergietests ist seit Kurzem möglich und wird in verschiedenen Allergiezentren Europas bereits eingesetzt. Es handelt sich um einen Screeningtest mit einer Vielzahl von Einzelallergenen auf einem einzigen Chip. Im Fall der Nahrungsmittelallergien könnte damit eine Voruntersuchung erfolgen, um vorliegende Sensibilisierungen festzustellen, die allerdings nur bei korrespondierenden Symptomen klinisch relevant wären. Darüber hinaus könnten Sensibilisierungen gegen speziesspezifische Allergene von Panallergenen (z. B. Profilin) differenziert werden, die in zahlreichen biologischen Organismen auftreten und die Diagnostik durch vielfältige Kreuzreaktivität erschweren. Risikoallergene in Nahrungsmitteln, mit gehäuftem Auftreten systemischer Reaktionen assoziiert, lassen sich von kreuzreaktiven Komponenten unterscheiden [41]. Aufgrund der

hohen Anzahl von rekombinanten Allergenen wurde ein chipbasierender In-vitro-Allergietest (Mikroarray) für die gleichzeitige Detektion von bis zu ca. 100 verschiedenen Einzelallergenen entwickelt, der nur geringe Blutmengen erfordert und neben der Diagnostik auch das Monitoring während der spezifischen Immuntherapie erlaubt [56]. Grundsätzlich ist aber wie bei jedem Nachweis einer Sensibilisierung der allergologisch tätige Arzt aufgefordert, die klinische Relevanz der Sensibilisierungen zu prüfen. Dies dürfte bei einer komplexen Datenlage, wie sie sich beispielsweise aus den Arrays ergibt, aufwendig für den Arzt sein und die Beratung der Patienten anspruchsvoller gestalten.

Neben Allergenextrakten können auch rekombinant hergestellte Allergene zur Diagnostik eingesetzt werden. Letztere bieten eine bessere Möglichkeit der Standardisierung und erlauben potenziell eine einzelallergenkomponentenaufgelöste Diagnostik. Bevor die chipbasierte In-vitro-Allergiediagnostik (Mikroarrays) routinemäßig angewandt werden kann, müssen noch breitere Erfahrungen (technisch und auch klinisch) mit diesen neuen Verfahren gesammelt werden. Die klinische Relevanz der Testergebnisse ist aber in jedem Fall zu evaluieren.

5. Allergenspezifisches IgG/IgG₄

Allergenspezifische Antikörper vom Isotyp M, G, A können sowohl in Seren von gesunden als auch atopischen Individuen nachgewiesen werden [8]. Die Bildung von allergenspezifischen Antikörpern dieser Immunglobulinklassen ist Ausdruck der normalen Immunantwort auf eine Fremdstoffexposition; es besteht keine Korrelation zur klinischen Symptomatik mit der allergischen Soforttypreaktion. Die Rolle von allergenspezifischen IgG/IgG₄ in der Pathogenese des Asthma bronchiale bzw. der Allergie ist unbekannt. Bezüglich ihrer Krankheitsrelevanz ist die Bedeutung der Antikörper völlig ungesichert [10]. Spezifisches IgG₄ steigt während der spezifischen Immuntherapie an, die klinische Relevanz dieser Befunde ist bislang aber nicht eindeutig geklärt.

5.1. Nachweisverfahren

Im Gegensatz zum allergenspezifischen IgE sind die Serumkonzentrationen der allergenspezifischen IgG-Antikörper 100- bis 1.000-mal höher, so dass ein Nachweis mit weniger sensitiven Methoden möglich ist. Es gibt zahlreiche Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Immunglobuline (Tab. 2).

5.2. Indikationen/Kontraindikationen im Rahmen der Typ-I-Sensibilisierung

Der Nachweis von allergenspezifischen IgG-Subklassen (IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄) reflektiert eine All-

ergenexposition, zeigt aber keine Relevanz bezüglich spezifischer klinischer Symptomatik [23, 75]. Eine definitive Bedeutung von IgG₄ als anaphylaktischer bzw. als blockierender Antikörper mit protektiver Wirkung für die Typ-I-Allergie konnte auch durch zahlreiche Studien [35] nicht klar belegt werden, obwohl IgG-Antikörper unter spezifischer Immuntherapie ansteigen können [26]. Aus diesem Grund besitzt die Bestimmung von allergenspezifischem IgG₄ keine diagnostische Bedeutung bei der Behandlung von Patienten mit allergischer Typ-I-Sensibilisierung [1]. Bei allergischen Soforttypreaktionen ist die pathogenetische Bedeutung von allergenspezifischen IgG-Antikörpern unklar. Ihre Bestimmung hat keine diagnostische Bedeutung. Dies gilt auch für IgG-Bestimmungen im Rahmen einer Nahrungsmittelallergie. Sie haben keine diagnostische Aussagekraft und sind nicht zu empfehlen [41].

5.3. Im Rahmen der Diagnostik bei allergischer Alveolitis

Dem Nachweis von antigenspezifischen IgG-Antikörpern kommt im Rahmen der Diagnostik der exogen-allergischen Alveolitis (EAA, eine Entzündungsreaktion des Lungenparenchyms) eine bedeutende Rolle zu [3–5]. Die exogen-allergische Alveolitis wird durch wiederholte und intensive Inhalation von organischem Staub verursacht. Im immunologischen Sinne nach Gell und Coombs stellt die exogen-allergische Alveolitis eine Kombination aus Typ III und Typ IV der allergischen Reaktion dar. Die Bildung von Immunkomplexen, bestehend aus antigenspezifischen IgG-Antikörpern und dem Antigen, führt zur Aktivierung der Komplementkaskade. Das Zusammenspiel zwischen Komplementkomponenten (C3a und C5a) und die Phagozytose von Immunkomplexen mit der Initiierung von freigesetzten Entzündungsmediatoren resultieren in einer interstitiellen Entzündung. Bei der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose kommt es neben einer Erhöhung des Gesamt-IgE und des spezifischen IgE gegen *Aspergillus fumigatus* auch zu einer deutlichen Erhöhung von spezifischem IgG gegen *A. fumigatus*. Letzteres ist im Vergleich zu Patienten mit einer allergischen Sensibilisierung gegenüber *A. fumigatus* deutlich erhöht (Spezialdiagnostik zur Unterscheidung beider Entitäten über rekombinante Allergene – Asp f 4 und Asp f 6 – möglich [15]). Bei der Farmerlunge (Beispiel für eine exogen-allergische Alveolitis) spielen IgG-Antikörper, insbesondere IgG₂ [57, 63], gegen spezielle bakterielle Komponenten, u.a. aus *Saccharopolyspora rectivirgula* (*Micropolyspora faeni*), eine entscheidende Rolle. Patienten mit Farmerlunge haben eine erhöhte Serumkonzentration von antigenspezifischem IgG, verglichen mit nicht exponierten Kontrollpersonen. Im Gegensatz dazu zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Gesamt-IgG- und IgG-

Tabelle 2. Testverfahren für den Nachweis von allergen- bzw. antigenspezifischem IgG

Qualitative Verfahren	— Ouchterlony-Technik — Immunelektrophorese — Gekreuzte Elektrophorese
Quantitative Verfahren	— Radioimmunoassay (RIA) — Enzymimmunoassay (EIA) — „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)

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

Subklassen-Spiegel zwischen Patienten mit Farmerlunge und exponierten, aber gesunden Probanden. Insgesamt ist der Nachweis von IgG-vermittelter antigenspezifischer Sensibilisierung nur eines von drei Kriterien, die von der Arbeitsgruppe „Exogen-allergische Alveolitis“ der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie im Kriterienkatalog zur Diagnose einer exogen-allergischen Alveolitis gefordert werden [71]. Die Bestimmung von allergenspezifischen IgG-Antikörpern stellt einen Baustein bei der Diagnose der exogen-allergischen Alveolitiden dar, besitzt jedoch für den Nachweis von Soforttypallergien keine wesentliche Bedeutung.

Die Bestimmung von allergenspezifischem IgG/IgG₄ hat keine diagnostische Bedeutung bei Patienten mit allergischen (IgE-vermittelten) Erkrankungen. Bei der Diagnose der exogen-allergischen Alveolitis stellen spezifische IgG-Antikörper nur einen von mehreren Bausteinen in der Diagnosesicherung dar. Hierbei fehlt nach wie vor eine Standardisierung der verfügbaren Tests.

6. Zelluläre Testsysteme mit Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten

Einige zelluläre In-vitro-Testsysteme zur Soforttypallergiediagnostik nutzen den Nachweis von Mediatoren oder von zellulären Antigenen, die bei erfolgreicher Aktivierung auf der Zelloberfläche erscheinen. Für diese „immunologische Reaktion im Reagenzglas“ werden durch Dextransedimentation angereicherte Blutleukozyten oder Vollblut mit Allergenen oder anderen Auslösern inkubiert. Die nach Allergenstimulation exprimierten Oberflächenmarker (CD63 bzw. CD203c) bzw. die freigesetzten Mediatoren der basophilen Granulozyten (z. B. Histamin, Sulfidoleukotriene) dienen als indirektes Maß für zellulär gebundenes spezifisches IgE. Bei anderen Auslösern/Stimuli (bakterielles Peptid fMLP, Kom-

plementkomponente C5a) spiegeln eine erfolgreiche Aktivierung und Mediatorfreisetzung die zelluläre, IgE-unabhängige Reaktionsbereitschaft der beteiligten Leukozyten wider, deren Bedeutung nur unzureichend geklärt ist.

Bei Verwendung ansteigender Allergenkonzentrationen entstehen sigmoide oder glockenförmige Dosis-Wirkungs-Kurven, deren Anstieg der zellulären Sensibilisierung entspricht und keine Beziehung zum Maximum der Kurven (zelluläre Reaktivität als diagnostisch in der Regel unerhebliches Maß der Signalübertragung) besitzt [48]. Allergenspezifische Dosis-Wirkungs-Kurven sind intra- und interindividuell höchst variabel. Ein Freisetzung- oder Aktivierungstest mit nur einer Allergenkonzentration ist daher zum indirekten Sensibilisierungsnachweis häufig nicht ausreichend [40]. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Basophilen von ungefähr 5–15% der Zellspender trotz vorhandenem zellulären IgE nicht in der Lage sind, nach IgE-vermittelter Stimulation aktiv zu werden und Mediatoren freizusetzen (sog. Nonresponder). Zelluläre Tests sind daher gegenüber einer direkten IgE-Bestimmung in ihrer Aussagekraft geschwächt. Sie sind methodisch aufwendig, nicht ohne Weiteres für den Versand von Proben geeignet, kostspielig und anspruchsvoll in Durchführung und Interpretation. Für die allergologische Routinediagnostik ist ihr Stellenwert eher gering; eine geeignete Indikation stellen Proben mit niedrigem Gesamt-IgE und erfolglosem spezifischen IgE-Nachweis trotz vermuteter Sensibilisierung oder seltene Allergene dar. Aufgrund der technischen Anforderungen und der komplexen Interpretation sollten sie nur von Labors durchgeführt werden, die umfangreiche Erfahrung mit spezialisierten zellulären Allergietests erworben haben.

Zelluläre Allergenstimulationstests sind zur Bestimmung IgE-vermittelter, zellulärer Sensibilisierungen geeignet. Bei Verdacht einer IgE-vermittelten Allergie und unklaren diagnostischen Vorbefunden sowie in Fällen mit fehlender Möglichkeit zur spezifischen IgE-Bestimmung und/oder Durchführung von Hauttests ist ihr Einsatz hilfreich. Darüber hinaus kann mittels dieser Tests in Einzelfällen auch bei negativem spezifischen IgE sowie negativem Hauttest eine IgE-vermittelte Sensibilisierung nachgewiesen werden.

6.1. Basophilendegranulationstest und Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten

Im Basophilendegranulationstest werden die Zellen nach Stimulation mit Allergenen gefärbt und ausgezählt. Durch die inakzeptable Streuung der Ergebnisse besitzt die Methode derzeit keine Bedeutung mehr.

Der Histaminfreisetzungstest beruht auf der Messung des aus den Granula basophiler Leukozyten freigesetzten präformierten Mediators Histamin. Die Zellen werden mit den fraglichen Allergenen, dem Verdünnungspuffer (Negativkontrolle) und einer Positivkontrolle (häufig Anti-IgE-Antikörper) inkubiert. Darüber hinaus wird der Gesamthistamingehalt nach Zerstörung der Zellen bestimmt. Nach Beendigung der Inkubation werden die Überstände für die spektrofluorometrische, enzym- oder radioimmunologische Histaminbestimmung aufbewahrt. Die Histaminfreisetzung wird meist in Prozent des Gesamthistamingehalts angegeben. Eine Vorinkubation mit Interleukin-3 verstärkt die allergeninduzierte Histaminfreisetzung. Da sich keine Vorteile in der Routinediagnostik von IgE-vermittelten Allergien gegenüber direkten IgE-Nachweisverfahren ergeben, wird der Test nur in wenigen Zentren durchgeführt und bleibt vorwiegend speziellen diagnostischen oder wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten.

Der Histaminfreisetzungstest aus basophilen Granulozyten ist aufwendig und nicht zur Routinediagnostik geeignet. Er sollte bei Verdacht einer IgE-vermittelten Allergie und unklaren diagnostischen Vorbefunden der spezialisierten In-vitro-Allergiediagnostik und wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten bleiben.

6.2 Bestimmung anderer Effektorzellmediatoren (Leukotrienfreisetzungstest)

Bei diesem Test werden die in der Zellmembran basophiler Granulozyten synthetisierten Sulfidoleukotriene gemessen, die nach Präaktivierung mit Interleukin-3 und Allergenkontakt beim Sensibilisierten gebildet werden (z. B. „cellular antigen stimulation test“ [CAST]) [81]. Nach Beendigung der Allergeninkubation und Zentrifugation werden die Leukotriene in den Überständen mithilfe eines ELISA bestimmt und in pg/ml angegeben.

Als Positivkontrolle für die allergeninduzierte Freisetzung wird ein monoklonaler Anti-Fc-IgE-Rezeptor-Antikörper verwendet. Durch Zugabe weiterer Stimuli wie C5a, fMLP oder PAF wird die Leukotrienfreisetzung verstärkt.

Der Leukotrienfreisetzungstest stellt ein komplexes zelluläres Testsystem dar, dessen Bedeutung in der weiterführenden In-vitro- und nicht der Basis-Allergiediagnostik liegt. Zur Identifizierung von nicht IgE-abhängigen Reaktionen (z.B. Intoleranzreaktionen) lässt sich der Leukotrienfreisetzungstest zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht empfehlen. Bei gezielter Indikation, kontrollierter Durchführung und kritischer Interpretation ist der Leukotrienfreisetzungstest ein potenzieller Baustein für die spezialisierte In-vitro-Allergiediagnostik.

Der Leukotrienfreisetzungstest ist komplex und nicht zur Routinediagnostik geeignet. Bei Verdacht einer IgE-vermittelten Allergie und unklaren diagnostischen Vorbefunden kann er der spezialisierten In-vitro-Allergiediagnostik dienen und für wissenschaftliche Fragestellungen eingesetzt werden.

6.3. Bestimmung der Basophilenaktivierung mithilfe der Durchflusszytometrie

Die Basophilenaktivierungstests beruhen auf dem durchflusszytometrischen Nachweis von Aktivierungsmarkern auf basophilen Granulozyten. Für IgE-vermittelte Reaktionen wurden bisher vor allem die Marker CD63 und CD203c eingesetzt. CD63, Bestandteil der Granulamembranen, ist kein basophilen-spezifischer Marker und wird auch auf anderen Blutzellen exprimiert. Daher ist eine weitere Markierung zur Identifizierung von Basophilen erforderlich. CD203c ist ein basophilen-spezifischer Marker und wird konstitutiv exprimiert. Beide Marker werden nach IgE-Rezeptor-Aggregation hochreguliert, haben aber teilweise verschiedene Stoffwechselwege und folgen unterschiedlichen Kinetiken [33]. Interleukin-3 potenziert die allergeninduzierte CD63-Expression, ohne selbst CD63 hochzuregulieren, während es die CD203c-Expression auch ohne Allergen steigert (sog. „Priming“-Marker). Resultate der Basophilenaktivierungstests werden in Prozent aktivierte Basophile angegeben. Untersuchungen mit Pollen-, Insektengift- und Nahrungsmittelallergenen sowie Medikamenten demonstrieren die Tauglichkeit der Bestimmung mit CD63 oder CD203c für spezielle diagnostische Fragestellungen [19, 21, 22, 40, 55, 68, 69, 82, 83].

Inwieweit die Basophilenaktivierungstests einen höheren Stellenwert für die In-vitro-Allergiediagnostik im Vergleich zum Histamin- oder Leukotrienfreisetzungstest besitzen, muss in weiteren kontrollierten Studien ermittelt werden.

Die Basophilenaktivierungstests sind potenziell zur Bestimmung IgE-vermittelter, zellulärer Sensibilisierungen in der Lage. Bei Verdacht einer IgE-vermittelten Allergie und unklaren diagnostischen Vorbefunden liegt ihr Stellenwert in der spezialisierten In-vitro-Allergiediagnostik.

7. Zelluläre Testsysteme mit T-Lymphozyten

Die Anwendung von In-vitro-Tests in der Diagnostik zellulär vermittelter allergischer Reaktionen ist begrenzt. Der Lymphozytenstimulationstest (LST) ist der zurzeit gebräuchlichste Test. Im LST werden Lymphozytenkulturen in Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen mit dem verdächtigen Allergen exponiert.

Der Einbau von tritiummarkiertem Thymidin (^3H -Thymidin) ist der gebräuchlichste „read-out“-Parameter zur Abschätzung der Lymphozytenstimu-

lation. Im LST wird eine spezifische T-Zell-Antwort aus dem Blut isolierter mononukleärer Zellen gegen ein Antigen/Allergen nachgewiesen. Ein prinzipielles Problem des LST besteht darin, dass nicht zwischen einer „physiologischen“ Antwort auf ein Antigen und einer „allergischen“ T-Zell-Antwort unterschieden werden kann.

7.1. Klinische Indikation

Der breiteste anerkannte Anwendungsbereich ist die Diagnostik von Arzneimittelunverträglichkeiten [52, 59]. Dabei ist die diagnostische Aussagekraft von Arzneimittel zu Arzneimittel unterschiedlich. Da Hauttestungen und In-vitro-Testungen für exanthematische Hautveränderungen nach Medikamenteneinnahme häufig keine klinisch relevanten Ergebnisse liefern, zählt diese Krankheitsgruppe zu den häufigsten Indikationen, bei denen ein LST veranlasst wird, um die „diagnostische Lücke“ zu schließen. Daneben sind auch ganz andere Medikamentenüberreaktionen, bei denen LST in der Diagnostik eingesetzt wurden, wie Vasculitis allergica, aplastische Anämie oder Hepatitis beschrieben worden.

Bei akuten Überreaktionen auf Arzneimittel liegt die höchste Treffsicherheit in der Regel etwa vier bis acht Wochen nach der klinischen Reaktion vor. Besonders häufig wurden positive Reaktionen im LST für Exantheme (makulopapulös, bullös), die akute generalisierte exanthematische Pustulose (AGEP), das DRES-Syndrom und Anaphylaxien beschrieben. Gelegentlich wurden positive Reaktionen für arzneimittelinduzierte Hepatitiden, Nephritiden, Urtikaria und Angioödem beschrieben. Bei der toxischen epidermalen Nekrolyse und Vasculitiden ist ein positiver LST eine Ausnahme.

Besonders gute Ergebnisse lassen sich mit dem LST bei Penicillin- und anderen β -Laktam-Antibiotika-Allergien und für Sulfonamide erzielen [59]. Dies führte zu vertiefenden Untersuchungen zum Mechanismus zellulärer Immunreaktionen gegen Penicillin [67]. Auch für Carbamazepin und Phenytoin liegen publizierte Berichte über – im Vergleich zur klinischen Reaktion – aussagekräftige LST-Ergebnisse vor einem immunologischen Hintergrund vor [50]. Positive Reaktionen im LST wurden in kleinerer Fallzahl oder in Einzelfällen aber auch zu einer Vielzahl anderer Arzneimittel beschrieben, so z. B. ACE-Hemmer, Diuretika, Lokalanästhetika und nichtsteroidale Antirheumatika, Nitrofurantoin, Chinidin oder Nystatin [59].

Medikamentenallergien – häufigste Indikation für die Durchführung von LST.

Auch gibt es Berichte über positive LST von Blutlymphozyten bei proteininduzierten Allergien wie Nahrungsmittelallergien oder Verschlechterungen

der atopischen Dermatitis durch Inhalationsallergene [84]. Hier hat sich der LST für klinische Fragestellungen aufgrund seiner Störanfälligkeit allerdings nicht durchsetzen können, so dass die Anwendung außerhalb von wissenschaftlichen Untersuchungen nicht empfohlen wird. Für die Abklärung von Soforttypreaktionen und von allergischen Kontaktekzemen sind in der Regel sensitivere Testmöglichkeiten vorhanden (Hauttestungen, spezifisches IgE). Wie störanfällig der LST ist, konnte am Beispiel von Endotoxinen gezeigt werden, die fast obligat als Kontaminanten in Proteinfractionen zu finden sind und bei der Untersuchung von Milchproteinen zu falsch positiven Ergebnissen bei Kontrollpersonen führten, so dass eine „Detoxifizierung“ von kommerziellen Proteinfractionen oder Allergenextrakten vor deren Einsatz im LST zu fordern ist [84].

Proteinallergene im LST: Probleme mit kontaminierenden Endotoxinen.

Eine weitere Gruppe von Allergenen sind „klassische“ Kontaktallergene wie Nickelsulfat, Chromsalze oder Isothiazoline [65]. Auch wurde der LST als geeigneter Test beschrieben, um eine Sensibilisierung gegen Beryllium nachzuweisen, und die Abklärung einer Berylliose ist zurzeit eine besonders gut etablierte Indikation für einen LST [65]. In höheren Konzentrationen können einige Kontaktallergene auch als Mitogene (also obligate Stimuli) fungieren, so dass eine individuelle Austitration zu fordern ist. Ob die zum Teil schlechte Spezifität von LST bei der Untersuchung von Metallverbindungen mit nicht optimierten Bedingungen zu begründen ist, ist nicht ganz klar. Besonders gute Übereinstimmungen lassen sich zwischen LST und Epikutantestungen insbesondere für Nickelsulfat erzielen. Dennoch gibt es aus dermatologischer Sicht keine klinische Indikation, den aufwendigen und für die meisten Allergene nicht validierten In-vitro-Test dem Hauttest vorzuziehen, so dass der eigentliche Wert des LST in Bezug auf Kontaktallergien fraglos bei der Klärung von wissenschaftlichen Fragestellungen (auch im Hinblick auf mögliche Weiterentwicklungen dieses Testsystems) zu sehen ist. Ein unkritischer Einsatz von LST (oder Modifikationen wie dem MELISA) [11] bei der Abklärung von vermeintlichen Quecksilberallergien ist abzulehnen.

Der LST bei epikutanen Kontaktallergien – Indikation bei wissenschaftlichen, kaum jedoch bei klinischen Fragestellungen.

7.2. Probleme bei der Durchführung und Auswertung von LST

Das Ergebnis im LST wird in der Regel als Stimulationsindex (SI) angegeben, der sich als Quotient

aus der Thymidineinbaurate der Zellen mit und ohne Antigenzusatz errechnet. Der Schwellenwert, bei dem ein Test als positiv zu werten wäre, muss für jedes Allergen einzeln ermittelt werden. Bei einem $SI > 3$ kann bei guter Methodik eine Proliferationsstimulierung sicher angenommen werden. Ein SI zwischen 2 und 3 ist in der Regel grenzwertig und nur in einem sehr gut kontrollierten System „mit großer Wahrscheinlichkeit positiv“.

Bei der Bewertung des SI ist die Hintergrundproliferation der Ansätze mit zu berücksichtigen. Ein hoher SI spiegelt eine hohe Frequenz antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen wieder und nicht unbedingt eine klinisch schwer verlaufende Reaktion [59]. Ein positiver LST hilft in der Diagnostik, aber ein negativer Test schließt eine Sensibilisierung nicht aus [80]. Die Ergebnisse sind nur im Kontext mit der Klinik und den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren zu verwerthen.

Die Ergebnisinterpretation ist durch die Möglichkeit falsch positiver und falsch negativer Befunde erschwert. Weil der LST sich nicht vollkommen standardisieren lässt, ist die Beachtung von Qualitätssicherungsaspekten durch den Auftraggeber und durch das Labor besonders wichtig [65].

Konkret ist für jede zu testende Substanz zu fordern, dass das Labor im Rahmen der Validierung ein Referenzkollektiv von exponierten, jedoch nicht symptomatischen Kontrollpersonen mituntersucht. Für den LST gilt wie für jeden In-vitro-Test, dass er nur vor dem Hintergrund einer klaren klinischen Reaktion zu werten ist. Anders als beim Nachweis von spezifischen IgE ist bei zellulären Proliferationen auf einen Stimulus noch nicht sicher, ob diese den „allergischen“ Reaktionsmechanismen zuzuordnen oder lediglich Ausdruck einer „normalen“ Auseinandersetzung des Organismus mit einem Antigen ist. In der Praxis wird man daher ein positives LST-Ergebnis kaum zur „Weichenstellung“ für weitere diagnostische Schritte (z. B. Provokationstestungen) heranziehen.

Sensibilisierung bedeutet nicht Allergie! Eine erhöhte Lymphozytenstimulation kann auch als Ausdruck einer normalen Auseinandersetzung des Organismus mit einem Antigen interpretiert werden.

Besonders falsch negative Reaktionen limitieren die Anwendung bzw. Akzeptanz des Tests in der Praxis. Für negative Ergebnisse gibt es eine Reihe von Gründen:

- Die am Patienten beobachtete Reaktion ist nicht immunologisch vermittelt.
- Es wurde zum falschen Zeitpunkt, z.B. zu früh nach Behandlung mit Steroiden, oder nach einem zu großen Zeitintervall zwischen Allergenkontakt und Blutentnahme getestet.

- Nicht das Medikament, sondern ein Metabolit, der nicht in vitro getestet wurde, wirkt allergen.
- Das Medikament hemmt durch seine pharmakologische Eigenwirkung den Einbau von Thymidin.
- ³H-Thymidin wird durch Enzyme in zugegebenen Testseren stärker enzymatisch abgebaut als in Kontrollen.
- Der Test ist aufgrund der zu geringen Zahl von sensibilisierten Gedächtniszellen im Blut, die wahrscheinlich im LST reagieren, nicht sensitiv genug.

Problem: falsch negative Reaktionen im LST.

7.3. Variationen und Entwicklungsmöglichkeiten von zellulären In-vitro-Testsystemen

Dem Inkubationsmedium kann anstelle des autologen Serums (Eigenplasma) ein kommerziell verfügbares AB-Spenderpoolserum zugesetzt werden. Allerdings führt die Inkubation in Eigenplasma oft zu einer stärkeren Stimulierung der Lymphozyten [25].

Da nicht immer nur die Ausgangssubstanz, sondern manchmal auch deren Metaboliten zu klinischen Reaktionen führen können, kann die alleinige Testung mit der Ausgangssubstanz im LST dann zu einem negativen Ergebnis führen. Erst durch Einsatz der – allerdings nur selten zur Verfügung stehenden Metaboliten – können dann oft doch noch positive Befunde erhoben werden. Durch Präinkubation von Antigenen mit Cytochrom-P450-haltigen Lebermikrosomen konnte die Aussagekraft des LST insbesondere bei Sensibilisierungen gegen Pyrazolone und Antikonvulsiva verbessert werden, da so auch Metaboliten erfasst werden können [52].

Neuere „read-out“-Systeme wie die Messungen von Zytokinen, der sog. MTT-Assay oder die durchflusszytometrische Darstellung von sich teilenden Zellen mit dem Farbstoff CFSE nach Zugabe eines Stimulus bieten interessante Perspektiven für die Weiterentwicklung der zellulären In-vitro-Diagnostik von allergischen Reaktionen. Bei Untersuchungen zu Beryllium hatte diese Methode eine sehr hohe Spezifität und war besser als der klassische LST [54].

Neben der Messung der DNA-Synthese als Proliferationsmarker lässt die Bestimmung von Zytokinen eine Aussage über stimulierte Zellen und deren Funktionen zu. Daher wurden mehrere Alternativen zum klassischen LST etabliert, die nicht auf Methoden der Proliferationsmessung, sondern auf der Bestimmung von Zytokinen im Überstand aufbauen [52, 59].

Die Technik des Elispot macht ebenfalls zytokinsezernierende Zellen sichtbar, kann zwischen naiven und Gedächtniszellen unterscheiden. Hierzu gibt

es positive Berichte in der Diagnostik von Metallunverträglichkeiten z. B. gegen Nickel [73].

Durchflusszytometrische Auswertungen von LST mit Aktivierungsmarkern, d. h. Membranmolekülen, die nach Antigentriggerung vermehrt oder vermindert auf Lymphozyten nachweisbar sind, scheinen weniger sensitiv als die Bestimmungen des Thymidineinbaus zu sein. Durch die Möglichkeit, Lymphozytensubpopulationen durch funktionell assoziierte Marker weiter einzugrenzen, lässt sich mit der Durchflusszytometrie für wissenschaftliche Fragestellungen aber eine höhere Spezifität von LST (etwa durch die Bestimmung von allergengetriggerten CLA⁺-Blutlymphozyten bei kutanen Entzündungen oder von α₄β₇⁺-Lymphozyten bei Nahrungsmittelallergien) erzielen.

7.4. Stellenwert des LST in der Diagnostik

Die Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“ am Robert-Koch-Institut [64] ordnet den LST zur Diagnostik von Arzneimittelallergien in die Kategorie IA ein: Maßnahme kann bei gegebener umweltmedizinischer Indikation „uneingeschränkt empfohlen“ werden [64]. In einer aktuellen ergänzenden Stellungnahme weisen die Mitglieder der Kommission auf eine Reihe von Limitierungen des Testsystems hin, bleiben aber bei der grundsätzlich positiven Einschätzung [65].

In der Allergologie hat der LST seinen Stellenwert im Rahmen einer weiterführenden allergologischen Diagnostik bei gegebener Indikation. Er kann angezeigt sein bei speziellen Fragestellungen oder Krankheitsbildern, wenn andere Methoden der Routinediagnostik nicht weiterhelfen. Insbesondere hat der LST jedoch seinen Platz zur Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen in der Allergieforschung.

8. Entzündungsmediatoren (ECP, Tryptase, Histamin und deren Metaboliten)

8.1. Histamin und seine Metaboliten

Der prototypische Mediator aus Mastzellen und basophilen Granulozyten bei Soforttypreaktionen ist Histamin. Der Nachweis von Histamin und seinen Metaboliten im Plasma oder Urin bei anaphylaktischen Reaktionen ist möglich, und eine Erhöhung korreliert mit dem Ereignis einer Anaphylaxie, wenngleich bei einigen Patienten mit Anaphylaxie keine Erhöhung detektiert werden kann [45]. Auch ohne sichtbare Aktivierung kann bei systemischer Mastozytose eine erhöhte N-Methylhistamin-Ausscheidung in den Urin als Folge der hohen Mastzellbelastung gefunden werden [17]. Des Weiteren wird freigesetztes Histamin im Rahmen von zellulären In-vitro-Tests mit basophilen Granulozyten zum Sensibilisierungsnachweis nach Inkubation mit Allergenen bestimmt (siehe dort).

Serum ist für den Nachweis von Histamin nicht geeignet, und es müssen einige ungünstige Einflussfaktoren bei der Bestimmung von Histamin und seinen Metaboliten bedacht werden. Die Halbwertszeit von Histamin beträgt nur wenige Minuten, Blutentnahmen müssen daher zeitnah zum Ereignis erfolgen, möglichst innerhalb der ersten Stunde. Zusätzlich muss das Blut bis zur Gewinnung des Plasmas durch Zentrifugation möglichst einer Kühlkette unterworfen werden. Histaminmetaboliten wie Nt-Methylhistamin und Methylimidazolessigsäure weisen eine deutlich längere Halbwertszeit auf, werden über den Urin ausgeschieden und können daher im Sammelurin bestimmt werden. Allerdings stören andere Histaminquellen wie Nahrungsmittel oder histaminbildende Bakterien eine eindeutige Korrelation zu der Freisetzung von Histamin in vivo. Histamin und seine Metaboliten wie Nt-Methylhistamin oder Methylimidazolessigsäure können aus Körperflüssigkeiten mit verschiedenen sensitiven und spezifischen Methoden (Radio-, Immunoassay, „high-performance liquid chromatography“ [HPLC]) bestimmt werden, vorwiegend aber auf Immunoassaybasis [29]. Eine Normierung auf die Nierenfunktion (und Körpergröße) ist allerdings nötig, um Unterschiede zwischen Alters- und Gewichtsklassen und Geschlecht angemessen zu berücksichtigen. Zusammengefasst besitzt die Bestimmung von Histamin und seinen Metaboliten im Plasma oder Urin bei allergischen Ereignissen keinen großen diagnostischen Stellenwert mehr, da durch rasche Metabolisierung im Organismus und den Einfluss zahlreicher weiterer Variablen dieses Verfahren aufwendig und störanfällig ist.

Durch rasche Metabolisierung und zahlreiche Variablen besitzt die Bestimmung von Histamin oder seinen Metaboliten im Plasma oder Urin bei allergischen Ereignissen keinen diagnostischen Stellenwert.

8.2 Tryptase

Tryptasen sind Serinepeptidasen der Trypsinfamilie und gehören zu den Mediatoren, die vor allem für Mastzellen weitgehend spezifisch sind, aber auch von basophilen Granulozyten sezerniert werden können. Wie die Bestimmung von Histamin und seinen Metaboliten kann auch der Nachweis einer erhöhten Tryptase Hinweise auf eine aktuelle oder gerade abgelaufene Aktivierung dieser Entzündungszellen geben (z. B. nach anaphylaktischer Reaktion). Im Gegensatz zum Histamin wird die Tryptase aber langsamer abgebaut (Serumhalbwertszeit ca. 2 h) und kann retrospektiv Ereignisse mit Mastzellbeteiligung aufdecken helfen [12]. Die humane Mastzelltryptase wird von vier Genloci sowie einer Vielzahl von Allelvariationen kodiert. Das gewachsene Verständnis über die Tryptasen erlaubt eine Neubewertung ihres Einsatzes für die Diagnostik. Heute sind α -, β_{1-3} -, δ - und γ -Trypta-

sen bekannt, wobei nur die α - und die β -Tryptasen als (Pro-)Peptide in löslicher Form vorkommen. Ein sensitiver und spezifischer Immunoassay erkennt diese zwei verschiedenen Isoformen der Mastzelltryptase, die aber nicht differenziert werden (Phadia, Freiburg). Der Basiswert der Serumtryptase besteht aus der Pro- α - und zum Großteil der Pro- β -Tryptase [14]. Dieser Basiswert kann bei Patienten mit systemischer Mastozytose erhöht sein, und ein Wert von $> 20 \mu\text{g/l}$ ist als Minor Kriterium von diagnostischer Bedeutung für die systemische Mastozytose (Leitlinie „Mastozytose“; www.awmf.org). Erhöhte basale Serumtryptasewerte können aber auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen gefunden werden, weshalb gegebenenfalls weitere diagnostische Schritte an den Nachweis eines erhöhten Basalwerts der Tryptase angeschlossen werden müssen. Da α -Tryptase nicht in den Granula gespeichert werden kann, ist es der Anstieg der β -Tryptase, der im Anschluss an anaphylaktische Ereignisse detektiert wird. Der günstigste Zeitpunkt zur Erfassung eines Tryptaseanstiegs ist wenige Stunden nach einem anaphylaktischen Ereignis [70]. Der immunologisch detektierte Anstieg der Serumtryptase wird auch dann eher bei starken als bei mildereren anaphylaktischen Reaktionen beobachtet [45]. Eine diagnostische Zuordnung bei fraglich anaphylaktischen Ereignissen ist häufig auch mit dieser Methode nicht möglich [43]. Das bedeutet, dass gleichbleibende Tryptasespiegel eine Anaphylaxie nicht ausschließen, der Nachweis eines Anstiegs ist diagnostisch aber in jedem Fall hilfreich [24].

Tryptase kann auch in anderen Körperflüssigkeiten bestimmt werden. Es konnten signifikante Tryptasespiegel in Nasensekret bei Polyposis nasi und perennialer Rhinitis allergica detektiert werden [44], diese Untersuchungen können aber bis dato für die Routine nicht empfohlen werden.

Indikationen für die Tryptasebestimmung im Serum sind:

- fragliche Reaktionen mit Mastzellbeteiligung innerhalb der letzten Stunden, z. B. IgE-vermittelte Reaktionen durch Soforttypallergene wie Insektengift oder Pharmaka mit geringerer Sensitivität bei Reaktionen auf Nahrungsmittel,
- differenzialdiagnostische Abklärung einer vermuteten Schockreaktion,
- erhöhter basaler Tryptasewert zur Diagnostik einer Risikogruppe für schwere Anaphylaxie (z. B. erhöhter basaler Tryptasewert und gleichzeitig anaphylaktische Reaktionen auf Insektenstiche in der Anamnese) [7, 46].

Verschiedene Variable beeinflussen das Ergebnis von Bestimmungen im Verlauf einer Anaphylaxie und erschweren die Interpretation:

- Schweregrad der Reaktion,
- Zeitverlauf des Ereignisses und Zeitpunkt der Blutentnahme,

- interindividuelle Abweichungen der Mastzellaktivierung und der Tryptasewerte,
- keine Verfügbarkeit allgemeingültiger Normwerte.

Ein hoher Tryptasespiegel ($> 11,4 \mu\text{g/l}$, Phadia, Freiburg) kann für die diagnostische Zuordnung bei V. a. Mastozytose hilfreich sein. Bei allergischen Soforttypreaktionen unterliegen Patienten mit einer Mastozytose einem besonderen Risiko, schwer zu reagieren, weshalb der basale Tryptasespiegel insbesondere im Rahmen einer Anaphylaxieabklärung immer bestimmt werden sollte (Leitlinie „Erhöhte basale Serumtryptasekonzentration oder Mastozytose als Risikofaktor der Hymenopterenallergie“, www.awmf.org oder *Allergo J* 2004; 13: 440–2). Seltener Ursachen einer stark erhöhten basalen Serumtryptase können beispielsweise andere hämatologische Erkrankungen oder auch eine Hämodialyse sein [18, 76]. Für die diagnostische Zuordnung möglicher allergischer Soforttypreaktionen ist nur der Verlauf (Anstieg) des Tryptasespiegels aussagekräftig. Ein niedriger Basalwert schließt ein akutes Ereignis mit Mastzellbeteiligung nicht aus. Insbesondere ist der Normbereich der basalen Tryptase ($\leq 11,4 \mu\text{g/l}$) für die diagnostische Zuordnung einer vermuteten Schockreaktion nicht aussagekräftig. Für das Monitoring moderater allergischer Ereignisse (z. B. beginnende IgE-vermittelte Nahrungsmittelreaktionen nach oraler Provokation) bringt die Tryptasebestimmung aber aufgrund unzureichender Sensitivität offenbar oft keine Vorteile gegenüber einer klinischen Beurteilung [7].

Erhöhte basale Tryptasekonzentrationen im Serum ($> 11,4 \mu\text{g/l}$) können auf eine systemische Mastozytose hinweisen. Ein Anstieg der Tryptasekonzentration im Serum gegenüber dem Basalwert ist ein starker Hinweis auf eine Reaktion mit Mastzellbeteiligung.

8.3. Eosinophiles kationisches Protein

Die eosinophilen Granulozyten sind an der Pathogenese allergischer Erkrankungen maßgeblich beteiligt und können in der Schleimhaut der oberen und unteren Atemwege von Allergikern sowie in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis vermehrt nachgewiesen werden. Die im Serum messbaren Mediatoren spiegeln nicht nur die Zahl der Eosinophilen, sondern auch deren Aktivierungszustand und damit den Grad und aktuellen Zustand der entzündlichen Reaktion wider.

Zahlreiche Untersuchungen beruhen auf der Bestimmung des „eosinophil cationic protein“ (ECP), die stark von der Präanalytik abhängt: Bei der Gewinnung von Serum wird während der Gerinnung von Vollblut (präanalytische Vorbereitung: 1 h bei Raumtemperatur, d. h. $18\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$) die Freisetzung von ECP aus den eosinophilen Granulozyten je nach

deren Aktivierungsgrad induziert. ECP kann ebenfalls aus anderen biologischen Flüssigkeiten (z. B. Serum, Lavageflüssigkeiten) mithilfe eines Immunoassays bestimmt werden. Die Werte für das Serum-ECP liegen beim CAP-FEIA-System laut Herstellerangaben bei $< 11,1 \mu\text{g/l}$ für die 90. Perzentile und bei $< 13,3 \mu\text{g/l}$ für die 95. Perzentile, mithin wird für Erwachsene ein Wert $> 15 \mu\text{g/l}$ als pathologisch betrachtet (Phadia, Schweden). Studien zur Bestimmung von ECP aus Nasensekret bei verschiedenen chronischen Rhinitisformen ergaben die erwarteten Erhöhungen von ECP bei perennialer und saisonaler Rhinitis. Auffällig waren die besonders hohen Werte für das „nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome“ (NARES), allerdings wurden hier bisher keine Grenz- oder Referenzwerte etabliert [44]. Bis auf Weiteres kann die Untersuchung von Nasensekret auf seinen ECP-Gehalt daher nur bei individueller Indikation als ein Baustein umfassender Diagnostik eingesetzt werden. Weitere wissenschaftliche Untersuchungen bleiben abzuwarten. Generell gilt, dass die ECP-Bestimmung aus dem Serum eine erhebliche interindividuelle Streuung aufweist. Insofern ist mithilfe von erhöhten ECP-Spiegeln weder eine diagnostische Abklärung noch eine klare Zuordnung zu einem spezifischen Krankheitsbild möglich [85]. In einzelnen Fällen kann die ECP-Bestimmung zur Bestätigung einer Diagnose oder als Verlaufsparemeter dienen, sofern andere Verlaufsparemeter nicht zur Verfügung stehen.

Erhöhte ECP-Konzentrationen spiegeln den Aktivierungszustand der eosinophilen Leukozyten wider, gestatten aber keine Zuordnung oder Abklärung von bestimmten allergischen Erkrankungen.

9. Perspektiven der In-vitro-Diagnostik

Viele Bereiche und Aspekte der In-vitro-Allergiediagnostik unterliegen sowohl in technischer als auch in wissenschaftlicher Hinsicht einer kontinuierlichen Weiterentwicklung. Hieraus ergeben sich Chancen, aber auch Risiken, auf die im Folgenden stichpunktartig hingewiesen werden soll:

- Im Zentrum der In-vitro-Diagnostik steht nach wie vor die Bestimmung des allergenspezifischen IgE. Angesichts der klinischen Bedeutung dieses Verfahrens ist es umso verwunderlicher, dass bis heute eine Standardisierung dieser Diagnostik fehlt und somit die Vergleichbarkeit von Resultaten zwischen den Testsystemen ein ungelöstes Problem darstellt. Im Prinzip muss die Messung von IgE-Antikörpern gegen jedes einzelne Allergen als ein eigener Laborparameter betrachtet werden. Für jedes einzelne Allergen sind Parameter wie Affinität und Avidität differenziell zu betrachten. Insofern müssen alle heute in den verschiedenen Assaysystemen eingesetzten Standardisierungsversuche als

Hilfskonstrukte betrachtet werden. Es ist dringend erforderlich, dass herstellerübergreifend Referenzmaterialien für die Kalibrierung der IgE-Assaysysteme entwickelt werden, die dann von den Herstellern verbindlich zur Standardisierung der Testsysteme eingesetzt werden können.

- Ein weiterer wesentlicher Aspekt, der zur Qualitätssicherung beiträgt, ist die interne und externe Qualitätskontrolle. Gerade für Spezialbereiche der Labordiagnostik wie die Allergologie muss dringend ein höheres Maß an Verbindlichkeit für die Durchführung von Qualitätssicherungsmaßnahmen beim Anwender gefordert werden.
- Die zelluläre Allergiediagnostik zeigt in den letzten Jahren neue und interessante Weiterentwicklungen. Die Aufgabe der vor uns liegenden Jahre wird darin bestehen, den klinischen Stellenwert dieser Tests zu validieren. Hierzu müssen gut konzeptionierte klinische Studien durchgeführt werden, die immer auch die klinische Situation des Patienten als „Goldstandard“ berücksichtigen.
- Erheblicher Entwicklungsbedarf besteht im Bereich des (lokalen) Monitorings der Entzündungsantwort. Vorbildcharakter in diesem Zusammenhang hat sicherlich die NO-Messung im Atemwegskondensat bei entzündlichen Lungenerkrankungen.

Aufbauend auf Erfahrung in diesem Bereich mit hier entwickelten Technologien, stellt dies einen Aspekt der In-vitro-Allergiediagnostik mit erheblichem Zukunftspotenzial dar. Ein derartiges Monitoring wird dringend benötigt, um den Entwicklungen auf der Ebene der Therapie gerecht zu werden. Hier zeichnen sich immer mehr Therapieoptionen ab, die einem speziellen Kreis von Indikationen gerecht werden. Eine dann zukünftig „maßgeschneiderte“ Therapie bedarf einer analogen und parallelen „maßgeschneiderten“ Diagnostik.

- Aktuelle Neuentwicklungen wie die Verfügbarkeit von rekombinanten Allergenen, die Chipdiagnostik und andere eröffnen einerseits neue Perspektiven und Dimensionen in der Diagnostik, andererseits stellt sich aber auch die Frage des klinischen Umgangs mit den hier gewonnenen neuen Informationen. Diese Diskrepanz in Einklang zu bringen ist eine Aufgabe der kommenden Jahre.

Verfahren zur Leitlinienentwicklung

Update von früherer S1-Leitlinie; Literaturrecherche, Schwerpunkt: „Evidenz“-basierte Publikationen, Delphiverfahren; Konsensus der Arbeitsgruppe „In-vitro-Allergiediagnostik“ der Sektion Immunologie der DGAKI; konsentiert von DGAKI, ÄDA, GPA und DDG; nächste Überprüfung geplant: 2014.

Literatur

1. AAAAI. Position statement. Measurement of specific and non-specific IgG4 levels as diagnostic and prognostic tests for clinical allergy. Milwaukee: AAAAI, 1995
2. Aalberse RC, Koshte V, Clemens JG. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 356–64
3. Baldwin CI, Todd A, Bourke S, Allen A, Calvert JE. Pigeon fanciers' lung: effects of smoking on serum and salivary antibody responses to pigeon antigens. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 166–72
4. Baur X, Richter G, Pethran A, Czuppon AB, Schwaiblmair M. Increased prevalence of IgG-induced sensitization and hypersensitivity pneumonitis (humidifier lung) in nonsmokers exposed to aerosols of a contaminated air conditioner. *Respiration* 1992; 59: 211–4
5. Bergmann K-C, Costabel U, Knape H, Kroidl R, Müller-Wening D, Repp H, Rust M, Schwarz H, Sennekamp J. Empfehlungen zur Diagnosestellung einer exogen-allergischen Alveolitis. *Allergologie* 1990; 13: 111–2
6. Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Guggenmoos-Holzmann I, Forster J, Bauer CP, Wahn V, Zepp F, Wahn U. Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 752–60
7. Biedermann T, Ruëff F, Sander CA, Przybilla B. Mastocytosis associated with severe wasp sting anaphylaxis detected by elevated serum mast cell tryptase levels. *Br J Dermatol* 1999; 141: 1110–2
8. Bjorksten B. Immunological outcome measures. *Eur Respir J Suppl* 1996; 21: 225–75
9. Boccagni P, Favari F, Zanoni G, Pezzini A, Tridente G. Comparison of four in vitro assays for specific IgE detection. *Int J Clin Lab Res* 1994; 24: 102–5
10. Boluda L, Fernandez-Caldas E, Berrens L. The role of IgG in type-I allergy: an unsolved problem. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997; 7: 205–10
11. Brehler R, Becker D, Merk H. [MELISA – in vitro test for detection of contact allergy? A comment by the German Contact Allergy Group.] *Hautarzt* 1998; 49: 418–9
12. Brockow K, Vieluf D, Püschel K, Grosch J, Ring J. Increased postmortem serum mast cell tryptase in a fatal anaphylactoid reaction to nonionic radiocontrast medium. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 237–8
13. Burney P, Malmberg E, Chinn S, Jarvis D, Luczynska C, Lai E. The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 314–22
14. Caughey GH. Tryptase genetics and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1411–4
15. Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115: 99–114
16. Crobach MJ, Kaptein AA, Kramps JA, Hermans J, Ridderikhoff J, Mulder JD. The Phadiatop test compared with RAST, with the CAP system; proposal for a third Phadiatop outcome: “inconclusive”. *Allergy* 1994; 49: 170–6
17. Dubois AE. Mastocytosis and Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 291–5
18. Dugas-Breit S, Schöpf P, Dugas M, Schiffl H, Ruëff F, Przybilla B. Baseline serum levels of mast cell tryptase are raised in hemodialysis patients and associated with severity of pruritus. *J Dtsch Dermatol Ges* 2005; 3: 343–7
19. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74: 201–10

20. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Clerck LS de, Stevens WJ. Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17: 357–60
21. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, Clerck LS De, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 332–9
22. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61: 1028–39
23. Eich-Wanger C, Muller UR. Bee sting allergy in beekeepers. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1292–8
24. Enrique E, García-Ortega P, Sotorra O, Gaig P, Richart C. Usefulness of UniCAP-Trypsase fluoroimmunoassay in the diagnosis of anaphylaxis. *Allergy* 1999; 54: 602–6
25. Farris GM, Newman LS, Frome EL, Shou Y, Barker E, Habbersett RC, Maier L, Smith HN, Marrone BL. Detection of beryllium sensitivity using a flow cytometric lymphocyte proliferation test: the Immuno-BE-LPT. *Toxicology* 2000; 143: 125–40
26. Gehlhar K, Schlaak M, Becker W, Bufe A. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 497–506
27. Hamilton RG. Accuracy of US Food and Drug Administration-cleared IgE antibody assays in the presence of anti-IgE (omalizumab). *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 759–66
28. Hamilton RG, Marcotte GV, Saini SS. Immunological methods for quantifying free and total serum IgE levels in allergy patients receiving omalizumab (Xolair) therapy. *J Immunol Methods* 2005; 303: 81–91
29. Hammar E, Berglund A, Hedin A, Norrman A, Rustas K, Ytterström U, Akerblom E. An immunoassay for histamine based on monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1990; 128: 51–8
30. Hemmann S, Menz G, Ismail C, Blaser K, Cramer R. Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A. fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 601–7
31. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Dalik I, Götz M, Jarisch R. Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 460–9
32. Hemmer W, Focke M, Kolarich D, Wilson IB, Altmann F, Wöhrl S, Götz M, Jarisch R. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 1045–52
33. Hennersdorf F, Florian S, Jakob A, Baumgärtner K, Sonneck K, Nordheim A, Biedermann T, Valent P, Bühring HJ. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation. *Cell Res* 2005; 15: 325–35
34. Holford-Strevens V, Warren P, Wong C, Manfreda J. Serum total immunoglobulin E levels in Canadian adults. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 516–22
35. Hvatum M, Scott H, Brandtzaeg P. Pitfalls in determining IgG and IgG subclass antibodies to food antigens. *J Immunol Methods* 1992; 148: 77–85
36. Jappe U, Raulf-Heimsoth M. Kreuzreagierende Kohlenhydratdeterminanten (cross-reactive carbohydrate determinants, CCD). *Allergologie* 2008; 31: 82–90
37. Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hübsch-Müller C, Enk A. In vitro Hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006; 61: 1220–9
38. Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills EN. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 163–70
39. Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 185–90
40. Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW Jr, Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 79–90
41. Kleine-Tebbe J, Reese I, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Erdmann S, Fuchs T, Henzgen M, Heratizadeh A, Hutteger I, Häger L, Jappe U, Lepp U, Niggemann B, Raithel M, Saloga J, Szépfalusi Z, Vieths S, Werfel T, Zuberbier T, Worm M. Keine Empfehlung für IgG und IgG4-Bestimmungen gegen Nahrungsmittel. Präambel und übersetzte EAACI-Position der deutschsprachigen Allergiegesellschaften. *Allergo J* 2009; 18: 267–73
42. Kochuyt AM, Hoeyveld EM van, Stevens EA. Prevalence and clinical relevance of specific immunoglobulin E to pollen caused by sting-induced specific immunoglobulin E to cross-reacting carbohydrate determinants in Hymenoptera venoms. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 441–7
43. Komericki P, Arbab E, Grims R, Kränke B, Aberer W. Trypsin as severity marker in drug provocation tests. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140: 164–9
44. Kramer MF, Burow G, Pfrogner E, Rasp G. In vitro diagnosis of chronic nasal inflammation. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1086–92
45. Linden PW van der, Hack CE, Poortman J, Vивиé-Kipp YC, Struyvenberg A, Zwan JK van der. Insect-sting challenge in 138 patients: relation between clinical severity of anaphylaxis and mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 110–8
46. Ludolph-Hauser D, Ruëff F, Fries C, Schöpf P, Przybilla B. Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet* 2001; 357: 361–2
47. Lundberg M, Chen Z, Rihs HP, Wrangsjö K. Recombinant spiked allergen extract. *Allergy* 2001; 56: 794–95
48. MacGlashan DW Jr. Releasability of human basophils: cellular sensitivity and maximal histamine release are independent variables. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 605–15
49. Mari A, Iacovacci P, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Di Felice G, Pini C. Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1005–11
50. Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. *J Immunol* 1995; 155: 462–72
51. Mensing H. Zur Differentialdiagnose der Dermatitis atopica. *Allergologie* 1994; 17: 477–80
52. Merk HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology* 2005; 209: 217–20
53. Meyaard L, Schuitemaker H, Miedema F. T-cell dysfunction in HIV infection: energy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunol Today* 1993; 14: 161–4
54. Milovanova TN. Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: 265–75

55. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Frémont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC₄ release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82: 33–40
56. Mothes N, Valenta R, Spitzauer S. Allergy testing: the role of recombinant allergens. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 125–32
57. Mundt C, Becker WM, Schlaak M. Farmer's lung: patients' IgG2 antibodies specifically recognize *Saccharopolyspora rectivirgula* proteins and carbohydrate structures. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 441–50
58. Ollert M, Weissenbacher S, Rakoski J, Ring J. Allergen-specific IgE measured by a continuous random-access immunoanalyzer: interassay comparison and agreement with skin testing. *Clin Chem* 2005; 51: 1241–9
59. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004; 59: 809–20
60. Radauer C, Breiteneder H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 141–7
61. Raulf-Heimsoth M, Jappe U, Yeang HY, Arif SA, Rihs HP, Lopata AL, Jeebhay MF, Brüning T. Relevance of carbohydrate determinants in differentiating true latex allergy from asymptomatic IgE reactivity. *Allergy Clin Immunol Int – J World Allergy Org* 2007; 19 (Suppl 1): 103–5
62. Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Rozynek P, Cremer R, Gaspar A, Pires G, Yeang HY, Arif SA, Hamilton RG, Sander I, Lundberg M, Brüning T. Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1657–67
63. Reese G, Becker WM, Schlaak M. [Farmer's lung: IgG-subclass reactivities against thermophilic actinomycetes.] *Immun Infekt* 1989; 17: 59–60
64. RKI. Empfehlung des Robert-Koch-Institutes. Diagnostische Relevanz des Lymphozytentransformationstest in der Umweltmedizin. *Umweltmed Forsch Prax* 2002; 8: 473–8
65. RKI. „Qualitätssicherung beim Lymphozytentransformationstest“ – Addendum zum LTT-Papier der RKI-Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 2008; 51: 1070–6
66. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338: 1592–600
67. Sachs B, Masaoudi T Al, Merk HF, Erdmann S. Combined in vivo and in vitro approach for the characterization of penicillin-specific polyclonal lymphocyte reactivity: tolerance tests with safe penicillins instead of challenge with culprit drugs. *Br J Dermatol* 2004; 151: 809–16
68. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C₄ release. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1166–71
69. Saporta M, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B. Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens. *Allergy* 2001; 56: 442–5
70. Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, Bokhari R, Dull D. Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989; 83: 1551–5
71. Sennekamp J, Müller-Wening D, Amthor M, Baur X, Bergmann KC, Costabel U, Kirsten D, Koschel D, Kroidl R, Liebetrau G, Nowak D, Schreiber J, Vogelmeier C. [Guidelines for diagnosing extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity pneumonitis) (German Extrinsic Allergic Alveolitis Study Group).] *Pneumologie* 2007; 61: 52–6
72. Sitzmann F. Normalwerte. München: Marseille, 1986
73. Spiewak R, Moed H, Blomberg BM von, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. Allergic contact dermatitis to nickel: modified in vitro test protocols for better detection of allergen-specific response. *Contact Dermatitis* 2007; 56: 63–9
74. Sutton BJ, Gould HJ. The human IgE network. *Nature* 1993; 366: 421–8
75. Tiikkainen U, Klockars M. Clinical significance of IgG subclass antibodies to wheat flour antigens in bakers. *Allergy* 1990; 45: 497–504
76. Valent P, Sperr WR, Schwartz LB, Horny HP. Diagnosis and classification of mast cell proliferative disorders: delineation from immunologic diseases and non-mast cell hematopoietic neoplasms. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 3–11
77. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17 (Suppl 1): 36–40
78. Vieths S, Jankiewicz A, Wüthrich B, Baltes W. Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 75: 48–55
79. Wahn V. Differentialdiagnose kindlicher Immundefekte. *Prädiatr Prax* 1998; 55: 79–100
80. Weber-Mani U, Pichler WJ. Der Lymphozytentransformationstest (LTT) in der Diagnostik von Arzneimittellergien. *Schweiz Med Forum* 2003; 15: 357–61
81. Weck AL de. Zellulärer Allergen-Stimulierungs-Test (CAST). *Allergologie* 1997; 20: 487–502
82. Weck AL de, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Ebo DG, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146: 177–89
83. Weck AL de, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Ebo DG, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; 18: 143–55
84. Werfel T, Breuer K. Role of food allergy in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 379–85
85. Winther L, Moseholm L, Reimert CM, Stahl Skov P, Kaergaard Poulsen L. Basophil histamine release, IgE, eosinophil counts, ECP, and EPX are related to the severity of symptoms in seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 1999; 54: 436–45