

Hans Jürgen Hoffmann\*, Ulf Darsow, Stephanie Hofmaier, Jörg Kleine-Tebbe, Paolo M. Matricardi, Bettina Wedi und Bernadette Eberlein

# Molekulare und Zelluläre Möglichkeiten in der Allergiediagnostik

## Molecular and cellular opportunities in allergy diagnostics

<https://doi.org/10.1515/labmed-2017-0063>

Eingang 11.4.2017; Akzeptanz 23.5.2017

**Zusammenfassung:** Eine Allergiediagnostik beruht auf einer gründlichen Anamnese, Sensibilisierungstests und Provokationstests zur objektiven Bestätigung des verursachenden Allergens unter kontrollierten Bedingungen. In dieser Übersicht werden die verfügbaren molekularen und zellulären Tests zur Allergensuche beschrieben. Seit der Identifikation, Klonierung und Expression des Hauptallergens der Birkenpollen, Bet v 1, haben sich die molekularen Einsatzmöglichkeiten in der Allergiediagnostik enorm gesteigert. In einer frei verfügbaren Monographie

der European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), dem „Molecular Allergy Users Guide 2016“, werden die Möglichkeiten einer modernen molekularen serologischen Diagnostik detailliert beschrieben. Auch die zelluläre Diagnostik hat sich in den letzten Jahren rasch weiterentwickelt mit der Möglichkeit molekulare Allergene einzusetzen und dem Ziel eine wiederholte Exposition des Patienten mit dem Allergen zu vermeiden. Exakte Messungen sind von externer Qualitätssicherung abhängig, die für die Serumdiagnostik bereits vorhanden ist und in der zellulären Diagnostik derzeit entwickelt wird. Mit der europäischen Standardisierung der diagnostischen Tests im Labor erweitert sich die Palette der Möglichkeiten zur persönlichen Allergiediagnostik.

**Schlüsselwörter:** Allergie; molekuläre Allergie; zelluläre Allergie.

**\*Korrespondenz:** Hans Jürgen Hoffmann, PhD, Professor, Department of Respiratory Diseases and Allergy, Aarhus University Hospital, Vorsitzender der „Interest Group Allergy Diagnosis“ (IGAD), EAACI, Nørrebrogade 44, 8000 Århus C, Denmark, E-Mail: hjh@clin.au.dk. <http://orcid.org/0000-0002-6743-7931>; and Department of Clinical Medicine, Aarhus University, Denmark

**Ulf Darsow:** Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München und ZAUM – Zentrum für Allergie und Umwelt, Technische Universität München, München, Deutschland

**Stephanie Hofmaier:** Charité Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie, Berlin, Deutschland

**Jörg Kleine-Tebbe:** Allergie- u. Asthma-Zentrum Westend, Praxis Hanf, Ackermann und Kleine-Tebbe, Berlin, Deutschland; and Beiratsmitglied der EAACI „Interest Group Immunotherapy“, Berlin, Deutschland

**Paolo M. Matricardi:** Charité Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie, Sekretär der IGAD, EAACI, Berlin, Deutschland

**Bettina Wedi:** Comprehensive Allergy Center, Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

**Bernadette Eberlein:** Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München, München, Deutschland; and Beiratsmitglied der IGAD, EAACI, München, Deutschland

**Abstract:** Allergy diagnosis depends on a thorough anamnesis, laboratory tests documenting sensitisation and provocation tests to objectively confirm the causative allergen under controlled conditions. In this review, we describe the molecular and cellular tests available for searching for the causative allergen. The molecular approaches in allergy diagnosis have increased enormously since the identification, cloning and expression of the major allergen for birch pollen, Bet v 1. The diagnostic options are described in detail in the freely available monographs of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), the “Molecular Allergy Users Guide 2016” for molecular serological tests and the “Clinical Utility of Basophil Activation Testing” for cellular tests, where molecular allergens can be employed and with the aim of reducing the re-exposure of patients to allergens they react to. Precise measurements depend on external quality assurance, already established for serology testing, and being in development for cellular testing. European

standardisation of diagnostic laboratory tests will expand the variety of test options for personalised allergy diagnosis.

**Keywords:** allergy; cellular allergy; molecular allergy.

## Einleitung

Die Allergiediagnostik beruht auf einer ausführlichen Anamnese, Hauttests, serologischen In-vitro-Tests, Ex-vivo-Methoden und Provokationstests.

Im Rahmen der Anamnese soll die Beziehung zwischen allergieverdächtigen Beschwerden und vermuteten Auslösern herausgearbeitet werden. Um den örtlichen und zeitlichen Zusammenhang zu sichern, können Symptomfragebögen z.B. bei Medikamentenüberempfindlichkeit [1, 2] hilfreich sein. Die Familienanamnese enthält Angaben zu atopischen Erkrankungen. Zusätzliche Grunderkrankungen und die Einnahme von Medikamenten sind ebenfalls von Interesse.

Zur Anwendung an der Haut sind Tests zum Nachweis von Typ-I-Sensibilisierungen von denen bei Typ-IV-Sensibilisierungen zu unterscheiden. Zu den ersteren gehören der Prick-Test und der Intrakutan-Test, zu den letzteren der Epikutantest. Beim Prick-Test wird ein Tropfen des Allergens auf den Unterarm gegeben und die Haut mit einer Prick-Lanzette kurz angestochen („geprickt“). Nach 15 Minuten wird die Testreaktion abgelesen und der mittlere Quaddeldurchmesser dokumentiert. Bei einem unerwarteten negativen Ergebnis im Prick-Test kann zusätzlich ein Intrakutantest durchgeführt werden, bei dem die Allergenlösung in einer deutlich niedrigeren Konzentration intrakutan injiziert wird. Allerdings gibt es in Deutschland aufgrund der Priorisierung der Allergenhersteller keine kommerziellen Testlösungen mehr zu diesem Zweck.

Zur Diagnose einer Typ IV Allergie werden im Epikutantest die Allergene meist in einer Salbengrundlage (Vaseline) verdünnt in Aluminiumkammern gefüllt und verbleiben für 1-2 Tage auf der Haut. Die Testreaktionen (Ekzem) werden dann nach 48 und 72 Stunden abgelesen [3].

Die In-vitro-Diagnostik umfasst vor allem die Bestimmung allergenspezifischer Immunglobuline der Klasse E (IgE). Es stehen etablierte Testsysteme für IgE-Einzelbestimmungen (Singleplex) sowie für Multiplex-Verfahren zur Verfügung. Die früher ausschließlich Extrakt-basierte Diagnostik wurde durch die neuen Möglichkeiten der molekularen Allergologie (1. erhöhte Nachweisempfindlichkeit, 2. gesteigerte analytische Spezifität, Marker für primäre Sensibilisierungen, Indikatorfunktion für

Kreuzreaktionen) deutlich erweitert und optimiert den Nachweis einer Sensibilisierung im Rahmen der Allergiediagnostik [4].

Darüber hinaus stehen für die erweiterte Allergiediagnostik zelluläre ex vivo-Tests zur Verfügung. Für Typ-I-Sensibilisierungen ist dies vor allem der Basophilen-Aktivierungstest (BAT, gelegentlich noch der Histamin- und Leukotrienfreisetzungstest, sog. CAST-ELISA), für Typ-IV-Sensibilisierungen der Lymphozyten-Transformationstest.

Für den BAT wird Blut mit Allergenen und fluoreszenzkonjugierten Antikörpern (z.B. CD193 zur Identifikation von basophilen Granulozyten im Blut, sowie CD63 zur Messung der Aktivierung) bei 37 °C aktiviert. Wird IgE auf Fc $\epsilon$ RI durch Allergenmoleküle aggregiert, werden ca. 1000 bis 10 000 CD63 Antigene an die Zelloberfläche von basophilen Granulozyten transloziert. CD63 wird anschließend auf der Zelloberfläche von basophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Wichtig ist es, eine standardisierte Allergenkonzentrationen im BAT einzusetzen. Zelluläre Tests zum Nachweis von Typ-I-Allergien werden primär zur Spezialdiagnostik eingesetzt, wenn in der Routinediagnostik (Hauttest, sIgE-Bestimmung) Probleme auftreten. Dies kann bei der Interpretation der Fall sein, wenn z.B. im Falle einer Insektengiftallergie mit unklarer Anamnese hinsichtlich des auslösenden Insektes negative oder widersprüchliche Resultate auftreten. Darüber hinaus sind diese Tests dann hilfreich, wenn z.B. Hauttestungen bei Ekzemen oder Urticaria factitia nicht durchführbar oder auswertbar sind, das Gesamt-IgE extrem niedrig ist [5] oder seltene Allergene (z.B. bei Allergien auf Nahrungsmittel oder Medikamente) für die Bestimmung von sIgE-Antikörpern nicht zur Verfügung stehen. Weiterhin ist ihr Einsatz möglich, wenn Provokationstestungen aufgrund pharmakologischer Eigenschaften von Medikamenten, aufgrund der Schwere der anamnestisch angegebenen Reaktion oder aus ethischen Bedenken (Gefahr der Neu-Sensibilisierung) nicht durchgeführt werden können. Viele Allergene, die hierzu in Frage kommen, stehen kommerziell zur Verfügung; es können aber auch z.B. frische, native Nahrungsmittel eingesetzt werden. Auch sollen diese Tests in gewissem Rahmen die Bewertung der klinischen Relevanz einer Allergie und Überwachung der Allergietherapie erleichtern (siehe Abschnitt 5).

Bei schweren arzneimittel-induzierten Hautreaktionen wie dem Stevens-Johnson-Syndrom und der Toxischen epidermalen Nekrolyse können Epikutantestungen diagnostisch hilfreich sein [6]. Es kann weiterhin versucht werden, das relevante T-Zell Antigen mit einem Lymphozytentransformationstest zu identifizieren. Die Ausschöpfung aller

risikolosen diagnostischen Methoden ist insbesondere bei den schweren bullösen Arzneireaktionen wichtig, weil ein Provokationstest hier kontraindiziert ist. Im LTT werden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut isoliert und mehrere Tage mit Allergenen kultiviert. Die einsetzende Proliferationsantwort der das Antigen erkennenden Lymphozyten wird als Ausdruck der Sensibilisierung gemessen. Als Messparameter dient meist der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin ( $^3\text{H}$ -Thymidin), wobei ein Stimulationsindex (inkorporierte Radioaktivität in der unstimulierten Kultur : Allergen-stimulierten Kultur) als Ergebnis angegeben wird. Für die Ergebnisbewertung müssen Kontrollen eingeschlossen werden und das klinische Bild der vermuteten Spättyp-Allergie einbezogen werden [7].

Provokationstests mit den vermuteten Auslösern bzw. mit Ausweichpräparaten werden als Goldstandard der Allergiediagnostik angesehen. Mit Inhalationsallergenen können sie ambulant an der Schleimhaut (Augen, Nase) durchgeführt werden. Provokationen mit Medikamenten und Nahrungsmittel erfordern bei potentiell bedrohlichen Systemreaktionen meist einen stationären Aufenthalt unter Notfallbereitschaft. Darüber hinaus kann 6 – 12 Monate nach Beginn einer spezifischen Immuntherapie eine Insektengiftstichprovokation durchgeführt werden, die in Deutschland nur in ganz wenigen Spezialzentren möglich ist [3].

## Molekulare und Zelluläre Algorithmen zur Allergiediagnostik

Wird bei einem Patienten eine IgE-vermittelte allergische Erkrankung vermutet, beginnt die Allergiediagnostik mit Erhebung der Krankengeschichte sowie einer körperlichen Untersuchung (Abbildung 1). Die Anamnese liefert

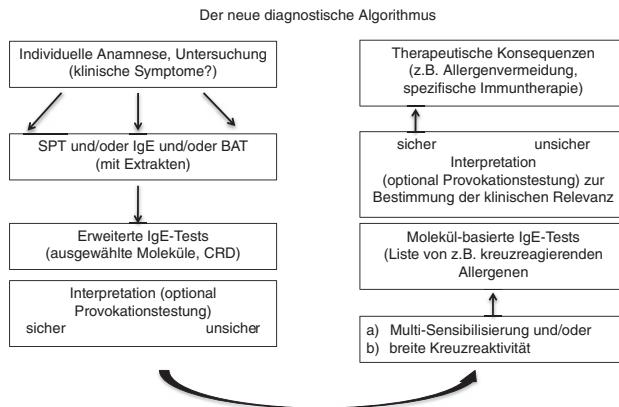


Abbildung 1: Der neue diagnostische Algorithmus (aus [8]).

wichtige Hinweise für oder gegen das Vorliegen eines allergischen Zusammenhangs bzw. auf mögliche Auslöser.

Saisonal auftretende Symptome einer Rhinokonjunktivitis lassen sich z.B. folgenden Allergenquellen zuordnen:

- Feb bis April: Baumpollen (Birke, Hasel, Erle, Buche, Eiche, seltener Esche)
- Mitte Mai bis Juli: Gräserpollen (incl. Roggen)
- Juli-August: Schimmelpilz Alternaria oder Kräuterpolen (Beifuß).

Ganzjährige allergische Symptome beruhen häufig auf Hausstaubmilben oder Tierbestandteilen.

Auch wenn die genaue Ursache der allergischen Symptome anamnestisch schwer einzugrenzen ist, sollte in jedem Fall eine Sensibilisierung auf häufige Allergenquellen geprüft werden [9]. Dies kann mit Hilfe von Allergenextrakten über einen direkten serologischen Nachweis, oder aber indirekt in-vivo durch Hauttests bzw. in begründeten Fällen ex-vivo durch einen Basophilenaktivierungstest erfolgen. Die Testreihenfolge ergibt sich aus der Verfügbarkeit der Methoden; meist werden Hauttests (z.B. Pricktests) vor Labortests durchgeführt. Die mittels Extrakt-basierter Diagnostik gewonnenen Ergebnisse sollten gewissenhaft auf ihre klinische Relevanz überprüft werden. Im Falle einer Nicht-Übereinstimmung zwischen positiver Anamnese, Untersuchung und negativen serologischen Testergebnissen kann ein Basophilenaktivierungstest hilfreich sein. Er ist analytisch extrem empfindlich, beruht auf zellulär gebundenen IgE-Antikörpern und spiegelt deren funktionelle Aktivität wider [10]. Dies ist insbesondere in Fällen sehr geringer Antikörperkonzentration (niedriges Gesamt-IgE <10 kU/L) von Vorteil, bei denen das spezifische IgE unterhalb der Nachweisgrenze (<0,1 kU<sub>A</sub>/L) liegt.

Ist eine klinisch bedeutsame Sensibilisierung gegen einen Allergenextrakt identifiziert worden, kann die IgE-Bestimmung gegen spezifische Allergenmoleküle im Singleplex- oder Multiplexverfahren [11] potentielle Kreuzreaktionen enttarnen und Risikoprofile für schwere Reaktionen aufzeigen [8]. So markiert die Sensibilisierung gegenüber den stabilen Erdnuss-Speicherproteinen (vor allem Ara h 2, aber auch Ara h 1, 3, 6) ein erhöhtes Risiko für anaphylaktische Reaktionen, während der IgE-Nachweis gegen das Erdnuss-Protein Ara h 8, strukturverwandt mit dem labilen Hauptallergen der Birkenpollen (Bet v 1), bestenfalls mit milden oralen Symptomen assoziiert ist. Die Relevanz einer quantitative Bestimmung der IgE-Antikörper gegen Moleküle ist letztlich individuell bei jedem Patienten im Rahmen der Ergebnisinterpretation zu klären.

Die funktionelle Aktivität des IgE, auch sehr geringer Konzentrationen, lässt sich in einem zellulären

Basophilenaktivierungstest darstellen [12]. Inwieweit letzterer besser als Haut- oder IgE-Tests die klinische Relevanz einer Sensibilisierung widerspiegelt, ist derzeit Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Nach wie vor gilt die In-vivo-Provokation als Goldstandard zur Sicherung einer klinischen Diagnose [13]. Hierzu werden Allergenextrakte oder natürliche Allergene auf die Schleimhaut gegeben (Konjunktiven, Nasenschleimhaut) oder in steigenden Konzentrationen oral verabreicht. So kann beispielsweise bei positiver Provokation eine in 5% der saisonalen Allergiker vermutete, lokal begrenzte allergische Rhinitis gegenüber aerogenen Allergenen identifiziert werden, bei der Haut- und IgE-Test negativ ausfallen. Insbesondere im Bereich der Nahrungsmittelallergien repräsentiert die doppelblinde Placebo-kontrollierte Provokation nach wie vor den diagnostischen Goldstandard, da nur sie das klinische Risiko verlässlich widerspiegelt. Es gibt Hinweise darauf, dass Parameter des BAT eine Einschätzung hinsichtlich der klinischen Reaktivität erlauben, sodass es in Zukunft möglich sein könnte, weniger Provokationstests durchführen zu müssen. Letztlich müssen keinesfalls alle Patienten die komplette Liste diagnostischer Optionen durchlaufen, sondern jeder diagnostische Test trägt einzeln zur Wahrscheinlichkeit der korrekten Allergiediagnose bei [12]. Eine umfangreiche Monographie (EAACI Molecular Allergology User's Guide) [8] bietet spezifische diagnostische Algorithmen für die wichtigsten bekannten Einzelallergene.

## Klassische Allergologie und neue molekulare allergologische Möglichkeiten

### Molekulare Diagnostik bei Nahrungsmittelallergie

Die häufigste Form der Nahrungsmittelallergie in Mitteleuropa basiert auf einer Kreuzreaktivität zwischen Proteinen in Aeroallergenen mit Proteinen in Nahrungsmitteln [14]. Ein Teil dieser Proteine werden auch als Panallergene bezeichnet, da sie in sehr vielen Pflanzen vorkommen. Heute lässt sich die Ursache des „Birke-Nüsse-Obst-Syndroms“ mittels molekularer Allergiediagnostik auf eine Sensibilisierung gegenüber dem Majorallergen von Birkenpollen (Bet v 1) zurückführen [8]. In der molekularen Allergiediagnostik stehen jetzt Bet v 1 – Homologe aus verschiedenen Nahrungsmitteln zur Diagnostik zur Verfügung. Da die Homologie dieser Proteine nie 100% beträgt und der

Bereich (Epitope), der durch individuelle IgE-Antikörper auf einem Protein erkannt wird, unterschiedlich ist, reagieren individuelle Birkenpollen-Allergiker in unterschiedlichem Umfang mit Bet v 1-homologen Proteinen von Nahrungsmitteln „überkreuz“ [14]. Von noch größerer Bedeutung ist die molekulare Allergiediagnostik bei der Abklärung von Anaphylaxien gegenüber Nahrungsmitteln. So kann eine Diagnostik mit dem *Gesamtallergenextrakt Erdnuss* in vitro nicht zwischen einer Kreuzerkennung des Bet v 1-homologen Erdnussproteins Ara h 8 und risikoreichen, mit systemischen Reaktionen assoziierten Sensibilisierungen gegenüber stabilen Speicherproteinen Ara h 1-3 oder dem ebenfalls stabilen Lipidtransferprotein Ara h 9 differenzieren. Durch eine fortschreitende Differenzierung der molekularen Diagnostik lassen sich teilweise Assoziationen zwischen Sensibilisierungsprofilen und der Wahrscheinlichkeit für schwere klinische Reaktionen nach Genuss dieser Nahrungsmittel nachweisen. Ähnlich wie bei der Erdnuss (Hülsenfrucht) verhält es sich bei echten Nüssen (z. B. Haselnuss): Cor a 1, ein Bet v 1-homologes Protein ist als Quelle einer Haselnuss-Kreuzreaktion in der Regel nur für orale Allergiesymptome (Juckreiz, Brennen der Schleimhaut) beim Patienten verantwortlich. Sensibilisierungen gegenüber den Haselnussproteinen Cor a 8, Cor a 9 oder Cor a 14 sind dagegen aufgrund ihres höheren Anteils in der Nuss und ihrer Stabilität durchaus mit Systemreaktionen verknüpft.

Der Fortschritt in der Allergiediagnostik mit Hilfe von Einzelallergenen hat die Identifizierung neuer Entitäten erleichtert. So lässt sich mittlerweile eine anstrengungsabhängige Weizenanaphylaxie durch Einsatz von Proteinen aus dem Glutenanteil von Weizen gezielt diagnostizieren (Tri a 19 und  $\alpha\beta\gamma$  Gluten). Das Krankheitsbild der verzögerten Soforttypallergie gegen rotes Fleisch und Innereien kann durch den Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen die Kohlenhydratkette Galaktose-alpha-1,3-Galaktose (kurz  $\alpha$ Gal) erfasst werden. Diese Patienten reagieren häufig verzögert auf den Genuss von rotem Fleisch mit einer kutanen Soforttypreaktion, die sich bis zur Anaphylaxie steigern kann [15].

### Molekulare Diagnostik bei Insektengiftallergie

Im Falle einer generalisierten allergischen Reaktion nach Insektenstich(en) sind Hauttestungen mit Hymenopterengiften indiziert. Aufgrund fehlender therapeutischer Konsequenz wird bei reinen Lokalreaktionen, obwohl häufig IgE-vermittelt, grundsätzlich auf eine Allergiediagnostik verzichtet. Eine besondere Herausforderung stellt die Doppelsensibilisierung auf Wespen- und Bienengift

bei unklarem auslösenden Insekt dar. Die Häufigkeit dieser Konstellation beträgt bis zu 60%. Grundsätzlich kann die Sensibilisierung auf Bienen- und Wespengift folgende Ursachen haben: a) Sensibilisierung gegen beide Insektenstoffe, b) Kreuzreaktivität aufgrund von Sequenzhomologien zwischen Bienen- und Wespengiftproteinen (z.B. Hyaluronidase und Dipeptidylpeptidase) sowie c) klinisch irrelevante Antikörperbindung an kreuzreagierenden Kohlenhydratketten (cross-reactive carbohydrate determinants, CCD). Eine Komponenten-basierte molekulare Diagnostik hilft zuverlässig, diese Konstellationen zu unterscheiden [16]. Für den Nachweis einer Sensibilisierung auf Wespengift ist eine Bestimmung von sIgE gegen rVes v 1 und rVes v 5 mit einer diagnostischen Sensitivität von 96% ausreichend. Für eine ähnlich hohe Sensitivität bei Bienengiftallergikern ist neben der Bestimmung von sIgE gegen Api m 1 (80%) noch die Analyse von sIgE gegen Api m 2, 3, 5 und 10 erforderlich, die seit kurzem verfügbar ist. Die klinische Relevanz von sIgE gegen Api m 4 ist dagegen fraglich und als Allergen aktuell auch nicht verfügbar [17] (s. [http://www.immunocapexplorer.com/uploads/cms/asset\\_brick/asset/11766/Insektenstoff\\_Flyer\\_2016-12.pdf](http://www.immunocapexplorer.com/uploads/cms/asset_brick/asset/11766/Insektenstoff_Flyer_2016-12.pdf)). Durch Vergleich der Dosiswirkungskurven (basophilen Sensitivität) mit Bienen- und Wespengift im BAT lassen sich bei Doppelsensibilisierung auf beide Insektenstoffe Hinweise auf das klinisch relevante Insektenstoff gewinnen [16].

## Rolle der molekularen Diagnostik bei Allergie gegen Aeroallergene

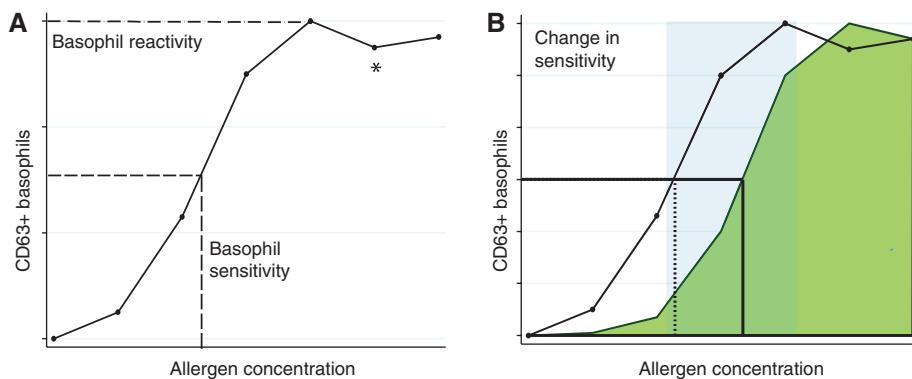
Isolierte und aufgereinigte natürliche Einzelallergene und rekombinante Allergene sind für diagnostische und therapeutische Zwecke entwickelt worden, bisher aber lediglich in der Diagnostik im Einsatz. Daneben werden modifizierte Versionen von Allergenen mit dem Ziel reduzierter IgE-vermittelter Nebenwirkungen während einer *Immuntherapie* entwickelt. Mit Hilfe definierter Einzelallergene in der Diagnostik könnte theoretisch auch eine Immuntherapie aus rekombinanten Allergenmischungen exakt auf die Sensibilisierungsprofile der Patienten zugeschnitten werden. Die Entwicklung derartig personalisierter Allergietherapien ist allerdings angesichts der aufwendigen und teuren Zulassung in naher Zukunft nicht zu erwarten. Somit werden Einzelallergene aufgrund ihrer Präzision zur Verbesserung der allergologischen Diagnostik eingesetzt, beispielsweise, um Fehler bei der Extraktauswahl Hyposensibilisierung zu vermeiden. Ein Beispiel ist der Nachweis von Kreuzsensibilisierungen gegenüber Pflanzenpanallergenen wie Profilinen, z.B. Bet v 2 und Phl p 12 [18] oder Polyclinen,

z.B. Bet v 4 oder Phl p 7, die in sämtlichen Pollen und bei den Profilinen zusätzlich in zahlreichen pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen. Die Trennschärfe (=analytische Spezifität) von Allergenextrakten geht unter diesen Bedingungen in sämtlichen Tests (Hauttest, IgE-Tests) verloren, sodass sich nur mit primären Markerallergenen (z.B. Bet v 1 für die Baumpollen, Phl p 1 für die Gräserpollen, Art v 1 für die Beifußpollen) die zugrundeliegende Sensibilisierungsquelle serologisch aufdecken lässt. Ein Mehrwert für die diagnostische Routine ergibt sich für Patienten mit allergischen Symptomen gegenüber Aeroallergenen daher bei Polysensibilisierungen, unklarer Symptomatik oder unzureichendem Therapieansprechen. In der Pneumologie ist die Differentialdiagnostik zwischen allergischem Asthma bronchiale und allergischer bronchopulmonaler Aspergillose (ABPA) von besonderem Interesse. Dies gelingt mittels molekularer Diagnostik und Nachweis von spezifischem IgE gegen rAsp f4 und rAsp f6. Diese Allergenkomponenten erlauben bei Asthmapatienten die Abgrenzung einer ABPA von einer Typ-I-*Aspergillus*-Sensibilisierung ohne ABPA mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 100% [19].

## Zelluläre Möglichkeiten zur Bewertung der klinischen Relevanz einer Allergie und Überwachung der Allergietherapie

Zur spezifischen Allergiediagnostik von Typ-I-Allergien können zelluläre ex-vivo-Testsysteme eingesetzt werden, die vorwiegend auf dem indirekten Sensibilisierungsnachweis von basophilen Granulozyten (aufgrund ihrer leichteren Verfügbarkeit im Blut gegenüber Mastzellen im Gewebe) beruhen [7]. Sie nutzen den Nachweis von Mediatoren oder zellulären Antigenen, die bei erfolgreicher Aktivierung messbar sind. Angereicherte Blutleukozyten oder Vollblut werden mit Allergenen oder anderen Auslösern inkubiert. Die nach Allergenstimulation exprimierten Oberflächenmarker bzw. die freigesetzten Mediatoren der basophilen Granulozyten dienen als indirektes Maß für zellulär gebundenes spezifisches IgE, das dem IgE im Plasma entspricht.

Sie werden zur Diagnostik eingesetzt, wenn bei den konventionellen Allergietests Probleme auftreten, sei es bei der Interpretation (z.B. bei widersprüchlichen Resultaten) oder Durchführung, wenn z.B. Hauttests bei Ekzemen oder Urticaria factitia nicht durchführbar oder auswertbar sind oder im Falle von seltenen Allergenen



**Abbildung 2:** (A) Ableitung der Basophilensensitivität (Höhe der maximalen Aktivierung) und der Basophilensensitivität (EC50 bzw CD-sens, =Allergenkonzentration zur halbmaximalen Stimulation). (B) Eine Änderung der Sensitivität kann auch mit wenigen Allergenkonzentrationen nachgewiesen werden (aus [10]).

(z. B. Medikamenten) die Bestimmung sIgE-Antikörper nicht zur Verfügung steht [10]. Darüber hinaus ist ihr Einsatz möglich, wenn Provokationstestungen aufgrund pharmakologischer Eigenschaften von Medikamenten, aufgrund der Schwere der anamnestisch angegebenen Reaktion oder aus ethischen Bedenken (Gefahr der Neu-Sensibilisierung) nicht durchgeführt werden.

Neben diesen Einsatzfeldern gibt es Hinweise dafür, dass es insbesondere mittels des Basophilensensitivitäts-Tests (BAT) möglich ist, zum einen klinisch manifeste Allergien von reinen Sensibilisierungen zu unterscheiden und zum anderen das Ansprechen von Therapien (spezifische Immuntherapie, Therapie mit Omalizumab) zu überprüfen. Während es bei der Diagnostik vorrangig um eine Aktivierung der Zellen (Angaben in % Aktivierung) durch das Allergen jenseits eines definierten Cut-offs geht („Basophilensensitivität“), müssen zur differenzierteren Betrachtung Dosis-Wirkungskurven mit mindestens 6-8 Konzentrationen des Allergens erstellt werden, aus denen man die sog. „Basophilensensitivität“ ablesen kann (Berechnung von EC50 oder CD-sens, Abbildung 2). Hierbei wird die EC50 bestimmt, also diejenige Allergenkonzentration, auf die 50% der Basophilen antworten. Aus diesem Wert kann die CD-sens berechnet werden, indem der reziproke Wert mit 100 multipliziert wird [10].

Im Bereich der Insektengiftallergie konnte zwischen der Höhe der Basophilensensitivität und der Schwere der anamnestisch angegebenen Stichreaktion allerdings keine Korrelation gefunden werden. Das Auftreten von Nebenwirkungen während der spezifischen Immuntherapie wurde von einigen Autoren mit Relationen von konzentrationsabhängigen Werten beim BAT in Zusammenhang gebracht; andere konnten dies nicht zeigen. Der Erfolg der spezifischen Immuntherapie spiegelt sich erst

nach mehrjähriger Therapie mit signifikant reduzierter Aktivierung bei submaximalen Stimulationsbedingungen wider. Dies konnte auch in Gruppen, bei denen mittels Stichprovokation am Ende der Immuntherapie der Erfolg überprüft wurde, gezeigt werden [20, 21].

Auch bei den Inhalationsallergien gibt es Daten, dass es zu einer Reduktion der Basophilensensitivität nach mehrjähriger spezifischer Immuntherapie kommt [22]. Darüber hinaus konnte der therapeutische Effekt von Omalizumab mittels des BAT überprüft werden [23, 24]. Bis zu einem gewissen Grad kann der BAT bei Nahrungsmittelallergien möglicherweise dazu beitragen zwischen einer asymptotischen Sensibilisierung und einer klinisch relevanten Allergie zu unterscheiden. Dies wurde für die Erdnuss-, Ei- und Milchallergie bei Kindern sowie bei Haselnuss-sensibilisierten und -allergischen Individuen in Pilotstudien gezeigt. Für Kinder schien der BAT darüber hinaus zusammen mit anderen Parametern (sIgE, Prick-Test) eindeutige Hinweise zu geben, zu welchem Zeitpunkt eine orale Provokationstestung mit Ei oder Milch erfolgen sollte, um schwere klinische Reaktionen zu vermeiden. Bei Immuntherapien, z.B. mit Erdnüssen, konnte eine signifikante Abnahme der Aktivierung im BAT nachgewiesen werden [12, 25]. Sofortreaktionen im Rahmen von rasch gesteigerten Desensibilisierungsprotokollen bei Allergien auf Chemotherapeutika (z.B. Platinkomponenten) gingen mit positiven Ergebnissen im BAT und erhöhten Tryptasewerten einher.

Die vorgestellten Daten beruhen vorwiegend auf dem Vergleich von Gruppen und sind für eine individuelle Voraussage bisher noch nicht ausreichend. Im Einzelfall muss daher das Ergebnis des BAT im Hinblick auf die klinische Relevanz oder den Erfolg einer Therapie immer kritisch hinterfragt und in Zusammenschau von Anamnese und den Resultaten anderer Typ-I-Allergietests bewertet werden.

## Perspektiven der Allergiediagnostik

Quantitative Bestimmungen des spezifischen IgE mit Methoden verschiedener Diagnostikshersteller sind leider schlecht vergleichbar. In deutschen Ringversuchen werden daher spezifische IgE-Resultate herstellerabhängig ausgewertet; sie zeigen darüberhinaus zwischen den durchführenden Labors je nach Methode erhebliche Abweichungen [26]. Für Basophilen-Aktivierungstests sind externe Ringversuche geplant - bei INSTAND e.V. für deutsche Labors, und durch die EAACI für europäische und eventuell weltweite Interessenten.

Der Hauttest (Pricktest) ist in Deutschland und den meisten anderen Ländern der Europäischen Union auf Grund seiner Verbreitung, der leichten Durchführung und dem kurzen Zeitbedarf der häufigste Allergietest (Cardona et al, in Vorbereitung). Durch die hohen Zulassungsanforderungen der EU an In-vivo-Testallergene und die Rücknahme vieler Testallergene vom Markt, wird die Allergiediagnostik derzeit erschwert. Da bei dem Hauttest Allergene in den Körper eingebracht werden, betrachtet man die dazu verwendeten Allergenpräparate seit der EU Direktive 89/342/ECC bzw. 2001/83/EC als Arzneimittel, und unterwirft sie den gleichen Produktions- und Zulassungsbedingungen wie therapeutische Allergene und andere Medikamente. In Deutschland gewährleistet das Paul-Ehrlich-Institut als zuständige Bundesbehörde die Umsetzung der EU-Direktiven. Im Zeitraum 2004 bis 2012 sind fast 50% der registrierten Hauttestallergene (insbesondere für den Intrakutantest) vom Markt genommen worden [27, 28]. In den 70er Jahren forderte der Allergologe Jack Pepys am Brompton Hospital in London, dass der Patient die vermeintlichen Allergieauslöser für die Diagnostik selbst mitbringen sollte. Obwohl dieses bei manchen Nahrungsmitteln tatsächlich noch notwendig ist, weil entweder die fraglichen Allergenquellen für die klinische Diagnostik nicht kommerziell zur Verfügung stehen, oder weil nur ein frisches, natives (zugegebenermaßen nicht-standardisiertes) Allergen die wirklich relevanten Allergene in ausreichender Menge und Stabilität enthält, sind heute viele Allergene als standardisierte Produkte verfügbar. Die Forderungen der Deutschen und Europäischen Behörden an die Hersteller sollten diese Entwicklung unterstützen.

Etwa 15% der deutschen Bevölkerung haben eine klinisch manifeste allergische Rhinitis und weitere 7% ein klinisch manifestes allergisches Asthma [29]. Eine zuverlässige Allergiediagnostik ist daher von erheblicher Bedeutung. Da derzeit zunehmend weniger diagnostische Allergene für Haut- und Provokationstests zur Verfügung stehen, werden zukünftig in-vitro/

ex-vivo-Testverfahren wie die molekulare Allergiediagnostik und die zelluläre in-vitro/ex-vivo-Allergiediagnostik wahrscheinlich eine immer größere Bedeutung bekommen.

**Autorenbeteiligung:** Alle Autoren tragen Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Artikels und haben der Einreichung des Manuskripts zugestimmt.

**Forschungsförderung:** Keine.

**Interessenkonflikt:** Die Autoren erklären, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

## Literatur

1. Wedi B. Fragebogen Medikamentenüberempfindlichkeit. *Allergo Journal* 2005;14:611–7.
2. Demoly P, Kropf R, Pichler WJ, Bircher A. Drug hypersensitivity: questionnaire. *Allergy* 1999;54:999–1003.
3. Ring J. Angewandte Allergologie, 3rd ed. München, Deutschland: Urban und Vogel, 2003:392.
4. Kleine-Tebbe J, Jakob T, editors. Molekulare Allergiediagnostik [Internet]. Springer-Verlag; [cited 2017 Mar 14]. Available from: <http://www.springer.com/de/book/9783662452202>.
5. Gómez E, Campo P, Rondón C, Barrionuevo E, Blanca-López N, Torres MJ, et al. Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:975–6.e1–5.
6. Barbaud A, Collet E, Milpied B, Assier H, Staumont D, Avenel-Audran M, et al. A multicentre study to determine the value and safety of drug patch tests for the three main classes of severe cutaneous adverse drug reactions: Drug patch tests for SCAR. *Br J Dermatol* 2013;168:555–62.
7. Eberlein B, Thomas P. Zelluläre Diagnostik in der Allergologie. In: Biedermann T, Hepp W, Renz H, Röcken M, editors. Allergologie. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2016:565–671.
8. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, et al. EAACI molecular allergology user's guide. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;27:1–250.
9. Hamilton RG, Matsson PN, Chan S, van Cleve M, Hovanec-Burns D, Magnusson C. Analytical performance characteristics, quality assurance, and clinical utility of immunological assays for human immunoglobulin E antibodies of defined allergen specificities [Internet]. [cited 2017 Mar 15]. Available from: <http://shop.clsi.org/immunology-documents/ILA20.html>.
10. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, et al. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy* 2015;70:1393–405.
11. Huss-Marx J, Gutermuth J, Schäffner I, Darsow U, Pfab F, Brockow K, et al. Comparison of molecular and extract-based allergy diagnostics with multiplex and singleplex analysis. *Allergo J Int* 2015;24:46–53.
12. Santos AF, Douiri A, Bécares N, Wu S-Y, Stephens A, Radulovic S, et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:645–52.

13. Agache I, Bilò M, Braunstahl G-J, Delgado L, Demoly P, Eigenmann P, et al. In vivo diagnosis of allergic diseases – allergen provocation tests. *Allergy* 2015;70:355–65.
14. Darsow U, Biedermann T. Molekulare Allergiediagnostik: Was für die Praxis wichtig zu wissen ist. *Deutsches Aerzteblatt Online* 2016;113:20.
15. Fischer J, Hebsaker J, Caponetto P, Platts-Mills TA, Biedermann T. Galactose-alpha-1,3-galactose sensitization is a prerequisite for pork-kidney allergy and cofactor-related mammalian meat anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:755–9.e1.
16. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: Improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:155–61.
17. Müller U, Schmid-Grendelmeier P, Hausmann O, Helbling A. IgE to recombinant allergens Api m 1, Ves v 1, and Ves v 5 distinguish double sensitization from crossreaction in venom allergy. *Allergy* 2012;67:1069–73.
18. Darsow U, Brockow K, Pfab F, Jakob T, Petersson CJ, Borres MP, et al. Allergens. Heterogeneity of molecular sensitization profiles in grass pollen allergy – implications for immunotherapy? *Clin Exp Allergy* 2014;44:778–86.
19. Crameri R, Hemmann S, Ismail C, Menz G, Blaser K. Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Immunopharmacol* 1998;10:1211–6.
20. Erzen R, Košnik M, Šilar M, Korošec P. Basophil response and the induction of a tolerance in venom immunotherapy: a long-term sting challenge study. *Allergy* 2012;67:822–30.
21. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, et al. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:196–203.
22. Schmid JM, Würtzen PA, Dahl R, Hoffmann HJ. Early improvement in basophil sensitivity predicts symptom relief with grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:741–4.e5.
23. Zidarn M, Košnik M, Šilar M, Bajrović N, Korošec P. Sustained effect of grass pollen subcutaneous immunotherapy on suppression of allergen-specific basophil response; a real-life, nonrandomized controlled study. *Allergy* 2015;70:547–55.
24. Nopp A, Johansson SG, Ankerst J, Bylin G, Cardell LO, Grönneberg R, et al. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy* 2006;61:298–302.
25. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1234–45.
26. Wojtalewicz N, Goseberg S, Kabrodt K, Schellenberg I. Six years of INSTAND e. V. sIgE proficiency testing: An evaluation of in vitro allergy diagnostics. *Allergo J Int* 2017;26:43–52.
27. Klimek L. Zulassungen von Testallergenen: Diagnostika in Not. *Allergo Journal* 2013;22:522.
28. Klimek L, Hoffmann HJ, Renz H, Demoly P, Werfel T, Matricardi PM, et al. Diagnostic test allergens used for in vivo diagnosis of allergic diseases are at risk: a European perspective. *Allergy* 2015;70:1329–31.
29. Biermann J, Merk HF, Wehrmann W, Klimek L, Wasem J. Allergische Erkrankungen der Atemwege – Ergebnisse einer umfassenden Patienten Kohorte in der deutschen gesetzlichen Krankenversicherung. *Allergo Journal* 2013;22:366–73.