

Christopher Freising
Dr. med.

Evaluation der *in vivo*- und *in vitro*-Diagnostik unter besonderer Berücksichtigung des semiquantitativen Western Blots bei Hymenopteren Giftallergie im Hinblick auf eine Hyposensibilisierungsbehandlung

Geboren am 07.02.1978 in Mutlangen
Staatsexamen am 04.05.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Dermatologie
Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. Uta Jappe, MSc

Hymenopteren Giftallergien sind häufige und potenziell lebensbedrohliche Erkrankungen, die mit einer Immuntherapie jedoch wirkungsvoll kausal behandelt werden können, deren Diagnostik bis heute jedoch hinsichtlich Sensitivität und Spezifität suboptimal ist.

In dieser Arbeit wurde die herkömmliche Diagnostik der Hymenopteren Giftallergie in Form von Anamnese (Schweregrad der klinischen Reaktion nach Stichereignis, eingestuft gemäß Müller-Grad), Hauttestschwelle und Nachweis Allergen-spezifischer IgE und IgG4 (CAP FEIA) nach einem Insektenstich mit systemischer Reaktion bei 582 Patienten einerseits re-evaluiert und andererseits mit dem semiquantitativen Western Blot, der einzigen Testmöglichkeit, Antikörper gegen Einzelallergene zu bestimmen, verglichen. Außerdem wurde der Verlauf von IgE- und IgG4-Antikörperkonzentrationen während und nach einer Immuntherapie im CAP FEIA sowie erstmalig im semiquantitativen Western Blot untersucht.

Die Sensitivität des Western Blots betrug 85,6%, die des Hauttests 94,1% und die des CAP FEIA 84,3%. Mit Ausnahme des CAP FEIAs war die Sensitivität der Methoden bei Wespengiftallergikern höher als bei Bienengiftallergikern. Mit zunehmendem Alter der Patienten nahm die Schwere der allergischen Reaktion nach einem Stich zu. Patienten mit Atopie waren unabhängig vom Reaktionsgrad durchschnittlich 7 Jahre jünger und hatten seltener schwere Reaktionen (Müller-Grad 3 und 4). Zwischen der Hauttestschwelle und den Schweregraden der klinischen Reaktion nach Müller (0 bis 4) fand sich keine Korrelation. Betrachtet man die Konzentration insektengiftspezifischer IgE im CAP FEIA, so ergab sich ein Anstieg der IgE-Werte bis Müller-Grad 3, bei Grad 4 ein Abfall. Ursächlich für letzteres könnten niedrigere IgE-Konzentrationen trotz schwererer klinischer Reaktionen im Alter sowie weitere IgE-unabhängige Immunreaktionen sein. Der Median des Quotienten aus IgE und IgG4 der Bienengiftallergiker lag bei Müller-Grad 1 - 3 deutlich über dem der Wespengiftallergiker. Hauttestschwelle und CAP FEIA-Ergebnisse beider Antikörper-Isotypen korrelierten eng positiv miteinander. Für die Quantifizierung der Banden auf den Western Blot-Streifen, deren Auswertung bisher subjektiv erfolgt war, wurde das Computerprogramm Quantiscan der Firma DPC Biermann angewendet und evaluiert. Ein Vorteil liegt in der damit möglichen Detektion auch sehr kleiner Konzentrationschwankungen der spezifischen Antikörper gegen Einzelallergene. Allerdings ließe sich eine größere Präzision bei der Ermittlung des Molekulargewichtes der Banden durch eine exaktere Markierung des Startpunktes vom Hersteller auf dem Streifen erreichen. Allergene mit hoher

Immunogenität hatten alle ein Molekulargewicht von unter 48 kDa, IgE-Peaks im höhermolekularen Bereich waren vor einer Immuntherapie selten, traten jedoch häufiger erst im Verlauf der Therapie auf, was auf eine iatrogene Sensibilisierung im Rahmen der Immuntherapie hindeutet. Bei 23 von 47 Patienten traten zu Therapiebeginn nur ein oder zwei Peaks auf. Bei Bienengiftallergikern traten gelegentlich Banden mit sehr niedrigem Molekulargewicht (Mellitin) auf, die nur schlecht vom Startpunkt getrennt bzw. identifiziert werden konnten. Beim Vergleich des Western Blots mit der Schwere der klinischen Reaktion (Müller-Grad) zeigte sich zwar kein Anstieg des Medians, wohl aber das Auftreten jeweils höherer IgE-Peaks mit zunehmendem Müller-Grad bei einigen Patienten, während beim IgG4 ein entgegen gesetzter Trend zu beobachten war, woraus resultiert, dass ein Überhang an IgE gegenüber IgG4 das Risiko schwerer klinischer Reaktionen erhöht. Weder die Anzahl der IgE- oder IgG4-Banden noch deren Quotient korrelierten mit dem Schweregrad der klinischen Reaktion. Bei den stärksten IgE- wie auch IgG4-Banden fanden sich ebenso wie bei der absoluten Häufigkeit der Peaks in absteigender Reihenfolge folgende Allergene: Antigen 5, Phospholipase und Hyaluronidase beim Wespengift, Phospholipase und Hyaluronidase beim Bienengift. Zu einer systemischen Reaktion war es bei 11 von 47 Patienten gekommen, obwohl sich gegen alle IgE-Banden gleichzeitig mindestens ebensogroße IgG4-Banden nachweisen ließen, was die protektive Rolle des IgG4 in Frage stellt. Deutlich erhöhte IgE-Konzentrationen im Western Blot traten ab einer Hauttestschwelle von 10^{-3} µg/ml auf, wohingegen die IgG4-Konzentrationen bei allen Schwellen gleich verteilt waren. Dies zeigt eine Korrelation lediglich der Höhe der IgE-Peaks mit der Hauttestschwelle. Die Ergebnisse von CAP und Western Blot korrelierten nicht besonders eng, was an unterschiedlicher Gewinnung oder Verarbeitung der Allergene liegen kann. Bei der Überprüfung der Wertigkeit des semiquantitativen Western Blot im Falle negativer oder widersprüchlicher Ergebnisse in Hauttest und CAP FEIA zeigte sich, dass der Western Blot eine wertvolle Ergänzung ist.

Zu Beginn einer Immuntherapie stieg die Konzentration des IgE stärker an als die des IgG4 mit einem Höhepunkt nach 2 bis 5 Wochen und fiel dann ab. Während das IgG4 stetig bei fast allen Patienten anstieg, war beim IgE eine größere Streuung zu beobachten. Nach spätestens 3 Jahren änderte sich die Konzentration der Antikörper beider Isotypen nicht mehr. Zwei Jahre nach Beendigung der Therapie war das IgG4 hingegen stärker abgefallen als das IgE, das bei 20% sogar wieder angestiegen war, was die Frage nach der Notwendigkeit einer lebenslangen Therapie aufwirft.

Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf einer Immuntherapie durch die Injektionen von nativem Hymenopteregift zu einer deutlichen Sensibilisierung auch gegen Allergene (v.a. Antigen 5), gegen die sich vor der Therapie noch keine oder weniger Antikörper nachweisen ließen, gekommen war. Diese Beobachtung bestätigt Voruntersuchungen und unterstützt eine angestrebte, noch nicht durch klinische Studien abgesicherte, spezifischere Immuntherapie mit den auslösenden Allergenen als rekombinant hergestellte und aufgereinigte Komponenten.

Diese Arbeit zeigt, dass der Western Blot die Diagnostik der Hymenopteregiftallergien sowohl zu Beginn als auch im Verlauf nach Abschluss der Steigerungsphase, jährlich sowie jährlich nach Ende der Therapie durch semiquantitative Bestimmung von Antikörpern gegen Einzelallergene entscheidend verbessern und möglicherweise etwas zur Aussage über die protektive Wirkung der Immuntherapie beitragen kann.