

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie, Immunologie und
Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

Das antigen-spezifische IgE-Repertoire im Nasensekret von Kindern
und Erwachsenen mit saisonaler allergischer Rhinitis: ein neuer
Ansatz zur allergologischen Labordiagnostik

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sveva Alice Castelli

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| I. Abstract..... | 3 |
| Englischer Abstract..... | 3 |
| Deutsche Übersetzung..... | 4 |
| II. Manteltext..... | 5 |
| 1. Einführung..... | 5 |
| 2. Methodik..... | 7 |
| 3. Neuartigkeit der Studie und wesentliche Ergebnisse..... | 10 |
| 4. Limitationen..... | 12 |
| 5. Zusammenfassung..... | 12 |
| 6. Bibliografie..... | 13 |
| III. Eidesstattliche Erklärung und Anteilserklärung..... | 16 |
| IV. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge) | 21 |
| V. Ausgewählte Publikation..... | 22 |
| Original Article..... | 22 |
| Electronic Repository..... | 30 |
| VI. Lebenslauf..... | 46 |
| VII. Publikationsliste..... | 48 |
| VIII. Danksagung..... | 49 |

I. Abstract

Background: The traditional diagnostic approach for type I allergies in clinical routine mainly investigates systemic IgE sensitisation and do not always portrays the allergic reaction at local level. A better picture of the allergic profile of patients affected by allergic rhinitis could be given with the analysis of immunoglobulin in nasal secretions (NS), which reflect sensitisation at the target organ. This is nowadays possible thanks to the development of micro-array technology, a highly sensitive immunological assay requiring only micro-volumes of sample to test IgE against a large panel of allergenic molecules. As a non-invasive Method, this approach could be especially advantageous in pediatrics.

Objectives: The present study aims to investigate the repertoire of specific IgE antibodies in nasal secretions of pediatric and adult patients with seasonal allergic rhinitis (SAR) using biochip technology.

Methods: NS and sera were obtained from 90 children and 71 adults with SAR and examined with a microarray (ISAC-112, Thermo Fischer Scientific (TFS), Uppsala, Sweden) containing 112 allergenic molecules to test specific IgE. Total IgE levels were also measured in both mediums with ImmunoCAP Fluorescence Enzyme Immuno-Assay (FEIA), (TFS, Uppsala, Sweden). NS were collected by the means of an absorbent device and processed according to a minimal dilution procedure. Total protein was measured as a marker of natural dilution (Pierce BCA assay, TFS).

Results: Nasal sIgE antibodies were detectable in 68.3 % of the patients, with cumulative levels ranging from 0.12 to 206.6 ISU, and showed a strong relationship with total IgE levels. Overall, the detected sIgE antibodies recognized airborne (88 %), vegetable (about 10 %) and animal food or other (both < 1 %) allergen molecules. The prevalence of sIgE to individual molecules in the serum and in the NS were highly interrelated at population level. A positive sIgE-antibody to a given molecule in NS predicted the detection of the same sIgE-antibody in the patient's serum with a specificity of 99.7 % and a sensitivity of 40 %.

Conclusions: Testing nasal IgE to allergen molecules with a micro-array technology predicted with high specificity but low sensitivity the serum sensitization profile of a large population of SAR patients. To validate the diagnostic value of NS as an alternative to serum for the diagnostic work-up of pollen allergic patients, minimal dilution procedures for NS sampling and array methods with high sensitivity are required. As a non-invasive method, IgE testing in NS could become very interesting in pediatric allergology.

Deutsche Übersetzung des Abstracts

Hintergrund: Der traditionelle diagnostische Ansatz für Typ-I-Allergien in der klinischen Routine untersucht hauptsächlich die systemische IgE-Sensibilisierung und zeigt nicht immer die allergische Reaktion auf lokaler Ebene. Ein besseres Bild des allergischen Profils von Patienten mit allergischer Rhinitis könnte durch die Analyse von Immunglobuline in Nasensekreten (NS) vermittelt werden, die die Sensibilisierung am Zielorgan widerspiegeln. Dies ist heutzutage dank der Entwicklung der Microarray-Technologie möglich, einem hochempfindlichen immunologischen Assay, bei dem nur Mikrovolumina der Probe benötigt werden, um IgE gegen eine große Anzahl Allergen-Moleküle zu testen. Als nicht-invasive Methode könnte dieser Ansatz in der Pädiatrie besonders vorteilhaft sein.

Ziele: Die vorliegende Studie zielt darauf ab, das Repertoire spezifischer IgE-Antikörper in Nasensekreten von pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis (SAR) unter Verwendung der Biochip-Technologie zu untersuchen.

Methoden: Von 90 Kindern und 71 Erwachsenen mit SAR wurden Nasensekrete und Seren entnommen. Diese wurden mit einem Allergen-Microarray (ISAC-112, Thermo Fischer Scientific, TFS, Uppsala, Schweden) untersucht, das 112 Allergenmoleküle enthielt, um spezifisches IgE zu testen. Des Weiteren wurden die Gesamt-IgE-Spiegel in beiden Medien mit dem ImmunoCAP-Fluoreszenzenzym-Immuno-Assay (FEIA) (TFS, Uppsala, Schweden) gemessen. Nasensekrete wurden mittels einer Absorptionsvorrichtung gesammelt und gemäß eines minimalen Verdünnungsverfahrens verarbeitet. Als Marker für die natürliche Verdünnung wurde das Gesamtprotein gemessen (Pierce BCA assay, TFS).

Ergebnisse: Nasale sIgE-Antikörper waren bei 68,3 % der Patienten mit kumulativen Konzentrationen im Bereich von 0,12 bis 206,6 ISU nachweisbar und zeigten eine starke Korrelation zu den Gesamt-IgE-Konzentrationen. Insgesamt richteten sich die nachgewiesenen sIgE-Antikörper gegen aerogene (88 %), pflanzliche (10 %) und tierische Lebensmittel (1 %) sowie weitere (< 1 %) Allergenmoleküle. Auf Bevölkerungsebene zeigte sich bezüglich der Prävalenz von sIgE gegen einzelne Moleküle eine starke Korrelation zwischen den Nasensekreten und den Seren. Ein positiver Nachweis von sIgE-Antikörpern gegen ein bestimmtes Molekül im Nasensekret sagte den Nachweis desselben Antikörpers im Patientenserum mit einer Spezifität von 99,7 % und einer Sensitivität von 40 % voraus.

Schlussfolgerungen: Die Testung nasaler IgE-Antikörper gegen Allergenmoleküle mittels Biochip-Technologie konnte mit einer hohen Spezifität das Serumsensibilisierungsprofil einer großen Population von SAR-Patienten vorhersagen. Einschränkend war jedoch die Sensitivität der Vorhersage gering. Zur Validierung des diagnostischen Nutzens von Nasensekret als Alternative zum Serum bei Patienten mit Pollenallergie sind eine minimale Verdünnung von Nasensekreten und die Anwendung von Biochip-Methoden mit hoher Sensitivität erforderlich. Insbesondere in der pädiatrischen Allergologie könnten IgE-Tests im Nasensekret als nicht-invasive Methode wertvoll sein.

II. Manteltext

II.1 Einführung

Die hohe Prävalenz der allergischen Rhinitis (AR) hat diese atopische Erkrankung zu einem globalen Gesundheitsproblem gemacht (1). Das Auftreten wird besonders im Kindes- und Jugendalter beobachtet, weshalb Rhinitis einen häufigen Vorstellungsgrund beim Kinderarzt darstellt und bedeutende sozioökonomische Auswirkungen nach sich zieht (2). Unbehandelte Erkrankungen gehen zwar nicht mit einer erhöhten Mortalität einher, können jedoch zu einer erheblichen Morbidität führen und die Lebensqualität einschränken (3). Besonders bei Kindern und Jugendlichen wirkt sich eine nicht kontrollierte Symptomatik häufig negativ auf die Aufmerksamkeit und auf den Schlaf aus, wodurch unter anderem die Schulleistung beeinflusst wird (4).

Die durch Immunglobulin E (IgE) vermittelte Entzündung der Nasenschleimhaut entsteht durch Exposition gegenüber Inhalationsallergenen. Sie manifestiert sich mit den Hauptsymptomen Niesen, Rhinorrhö, Pruritus sowie nasaler Obstruktion (5) (6). Häufig tritt die Entzündung zusammen mit einer allergischen Konjunktivitis auf, deren typische Symptome juckende, rote und tränende Augen sind (7). Eine frühzeitige Diagnose der allergischen Rhinitis sowie eine entsprechende Intervention sind entscheidend, um eine Sensibilisierung gegenüber weiteren Allergenen und eine Entwicklung von Komorbiditäten wie allergischem Asthma bronchiale zu vermeiden (8) (9).

In der klinischen Praxis etablierte diagnostische Tests für Typ-I-Allergien (z. B. Serum-IgE, Haut-Prick-Test, Provokationstests) konzentrieren sich auf die „systemische“ IgE-Sensibilisierung und repräsentieren die allergische Reaktion nicht immer auf lokaler Ebene (10). Ein Fortschritt in der Diagnostik von Typ-I-Allergien wie der allergischen Rhinitis könnte erreicht werden, indem der bereits in Provokationstests praktizierte Nachweis einer lokalen klinischen Reaktion mit der analytischen Präzision und Reproduzierbarkeit von IgE-Tests kombiniert wird. Diese bisher nicht standardmäßig angewandte Testkombination birgt das Potential einer nicht-invasiven, schnellen und kostengünstigen Methodik. Sie könnte insbesondere für pädiatrische Patienten geeignet sein, um invasive und belastende Verfahren wie Blutentnahmen zu ersetzen.

Hinweise auf eine lokale Produktion von Immunglobulin E (IgE), dem Hauptmediator allergischer Erkrankungen, in der Nasenschleimhaut sowie dessen Nachweisbarkeit im Nasensekret wurden erstmals in den 1970er Jahren beschrieben (11) (12) (13). Seitdem wurden im Hinblick auf das Verständnis und den Nachweis der Synthesemechanismen von IgE in der Mukosa von Patienten mit allergischer Rhinitis mehrere Fortschritte gemacht (14) (15). Unter anderem konnten die entscheidende Schritte im Reifungsprozess einer B-Zelle zu einer IgE-sekretierenden Plasmazelle, welche die somatische Hypermutation, die klonale Expansion und den Immunglobulin-Klassenwechsel nach Antigenkontakt umfassen, lokal in der Nasenschleimhaut nachgewiesen werden (16) (17).

Somit konnte gezeigt werden, dass die im Nasensekret nachzuweisenden IgEs nicht nur durch Transsudation aus dem Serum in die Nase gelangen, sondern teilweise auch in situ in der Nasenmukosa selbst produziert werden (18).

Die IgE-Analyse im Nasensekret ist als nicht-invasives Instrument zum Nachweis einer spezifischen IgE-Produktion gegen Allergene auch als vorteilhafter Ansatz bei kleinen Kindern mit Symptomen einer allergischen Rhinitis vorgeschlagen worden (19) (20).

In den vergangenen Jahren wurde eine neue eigenständige Entität der allergischen Rhinitis entdeckt, bei der die Patienten die klassische Symptomatik zeigen, ohne dass eine systemische IgE-Sensibilisierung nachweisbar ist (21). Bei diesen Patienten bleibt die IgE-Produktion, ausgelöst durch die Schleimhautexposition gegenüber dem kränkenden Allergen, lokalisiert und auf das

Zielorgan beschränkt (22). Bei einem Teil dieser Patienten ist allergenspezifisches IgE in den Nasensekreten unabhängig vom Serum-IgE-Spiegel und dem atopischen Status nachweisbar (23). Diese Form wurde „lokale allergische Rhinitis (LAR)“ benannt. Die Analyse des Nasensekrets könnte eine wegweisende Diagnostikmethode (24) sowie einen nützlichen, differentialdiagnostischen Ansatz darstellen, um eine LAR von einer nicht-allergischen Rhinitis (NAR) abzugrenzen (25).

Des Weiteren könnte diese Methode eine klinisch signifikante Rolle im Rahmen der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) spielen, indem nasales IgE als Kontrollparameter für die therapeutische Wirksamkeit eingesetzt wird (26).

Nasensekrete können leicht mit absorbierendem Material oder mit anderen nicht-invasiven Verfahren wie einer Nasenspülung oder mit Absauggeräten gesammelt werden (27). Die größte Herausforderung bei der Probenentnahme von Nasensekreten besteht darin, genug Material zu gewinnen sowie gleichzeitig Verdünnungsartefakte zu vermeiden und die Beschwerden des Patienten auf ein Minimum zu beschränken (27). Eine genaue Einschätzung des diagnostischen Wertes der lokalen IgE-Messung bei Patienten mit allergischer Rhinitis ist nur durch gültige und vergleichbare Ergebnisse möglich. Deshalb ist es unabdingbar, validierte Standards für die Sammlung, Verarbeitung und Bewertung von Nasensekreten festzulegen (28). Durch die Unterschiede in der angewandten Methodik ist die Vergleichbarkeit der Befunde bereits vorhandener Studien erschwert (28). Darüber hinaus haben die bisher durchgeführten Untersuchungen des nasalen IgEs bei AR häufig nur mit einer geringen Probandenzahl stattgefunden (29) (30) (31) (32). Außerdem wurden meist Extrakt-basierte Singleparameter-IgE-Tests verwendet (19) (22) (23) (24). Dies ist insofern ein Nachteil, als dass der damit verbundene hohe Bedarf an Probenvolumen zu einer höheren Verdünnung führt, wodurch das im Nasensekret ohnehin relativ gering konzentrierte IgE (18) oftmals unter die Nachweisgrenze klassischer immunenzymatischer IgE-Tests fällt (33). Diese Einschränkungen und die bereits fest etablierten Serum-IgE-Tests haben die Implementierung von IgE-Tests in Nasensekreten in die klinische Routine erschwert, sodass ihre Anwendung bisher auf die Forschung beschränkt ist. Die Entwicklung von Biochip-Technologien - wie beispielsweise einem hochempfindlichen immunologischen Multiparametertest für antigen-spezifische IgE - ermöglicht es heutzutage, mit minimalen Probenvolumina IgE-Spezifitäten gegen ein großes Repertoire an Allergenmolekülen zu testen (34). Diese Technologie, die zum Nachweis von allergen-spezifischen Immunglobulinen im Serum eingesetzt wird, wurde bisher jedoch nur in einer kleinen Pilotstudie erfolgreich zum semiquantitativen Nachweis von IgE in den Nasensekretionen angewendet (35).

Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe der neusten Biochip-Technologie das gesamte Repertoire antigenspezifischer IgE-Antikörper in Nasensekreten allergischer Kinder und Erwachsener zu untersuchen. Dazu sollten die lokalen IgE-Reaktivitätsprofile allergischer Patienten charakterisiert und mit den entsprechenden IgE-Sensibilisierungen im Serum verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Nasensekrete und die Seren von 161 Patienten, davon 90 Kindern und 71 Erwachsenen, untersucht, die von saisonaler allergischer Rhinitis (SAR) betroffen waren. Die Gewinnung von Nasensekreten erfolgte mittels einer validierten Methode, die durch die Zugabe individuell applizierter Verdünnungsfaktoren optimiert wurde. Dies hatte zum Ziel, das für alle Untersuchungen benötigte Volumen mit einer minimal notwendigen Verdünnung zu erreichen. Nach unserem Kenntnisstand ist das die erste Studie in einem so großen Patientenkollektiv mit Pollenallergie, in der mithilfe der Biochip-Technologie eine Untersuchung von Nasensekreten auf spezifische IgE-Antikörper gegen eine so große Anzahl an verschiedenen Allergenmolekülen durchgeführt wurde.

II.2 Methodik

Studiendesign und Population – In die Studie wurden Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis (SAR) aufgrund von Pollen eingeschlossen, die als Teilnehmer einer größeren klinischen Langzeitbeobachtungsstudie in zwei italienischen Kliniken rekrutiert worden waren (36). Teilnehmende Kinder (10-18 Jahre) wurden in der Abteilung für Pädiatrie des Krankenhauses „Sandro Pertini“ in Rom (Zentral-Italien) und teilnehmende Erwachsene (19-60 Jahre) im Krankenhaus „S. Maria degli Angeli“ in Pordenone (Nord-Osten-Italien) rekrutiert. Die klinische Vorgeschichte der rekrutierten Patienten wurde anhand standardisierter Fragebögen erhoben, die eine Erfassung der Komorbiditäten einschloss. Die atopische Sensibilisierung wurde mittels Skin-Prick-Test (SPT) getestet. Allergische Rhino-Konjunktivitis-Symptome wurden gemäß der validierten internationalen Studie über Asthma und Allergien im Kindesalter (ISAAC) bewertet (37). Der Schweregrad der allergischen Rhinitis wurde gemäß internationaler ARIA-Kriterien (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) definiert (38) (39). Bei Patienten mit Asthma bronchiale als Komorbidität wurde der Schweregrad anhand der diagnostischen Kriterien der Globalen Initiative für Asthma (GINA) bewertet (40). Darüber hinaus nahmen alle Teilnehmer während der ersten Untersuchung an einer Blutentnahme teil. Die Patienten zeichneten ihre Symptome und Medikamenteneinnahme während der für sie klinisch relevanten Pollensaison mittels eines elektronischen Symptom-Tagebuchs auf. (41) Des Weiteren wurde nach Ende der entsprechenden Pollensaison ein nasaler Provokationstest mit den jeweiligen, für den Patienten als klinisch relevant erachteten Allergenen durchgeführt. Nasensekrete wurden mittels eines absorbierenden Materials (Merocel 2000®, Medtronic) gesammelt. Eine Untergruppe von Patienten nahm darüber hinaus am Untersuchungstag der Nasensekret-Sammlung an einer weiteren Blutentnahme teil. Das Studiendesign und die Studienverfahren wurden seitens der lokalen Ethikkommissionen genehmigt. Alle Teilnehmer erteilten nach ausführlicher Aufklärung eine schriftliche Einwilligung in die Studienteilnahme.

Skin Prick Tests – Hauttests (Skin-Prick-Tests) wurden mit einem kommerziellen Standardpanel mit 16 Allergenextrakten (ALK-Abelló, Italien) durchgeführt (42). Folgende Extrakte wurden getestet: Lieschgras, Olive, Zypresse, Beifuß, Glaskraut, Birke, Hasel, Ambrosia, Alternaria, Platane, Salzkraut, deutsche Schabe, Hundszahngras, Hausstaubmilben, Katzen- und Hundehaar. Um die Allergene in die Haut einzubringen wurden Morrow-Brown-Nadeln verwendet. Als Positivkontrolle wurde Histamin 0,1 mg/ml, als Negativkontrolle Glycerin-Lösung verwendet. Das Ausmaß der Reaktion wurde nach 15 Minuten auf der Haut abgelesen. Dabei wurde ein durchschnittlicher Quaddel-Durchmesser ≥ 3 mm nach Abzug der Negativkontrolle als positiv bewertet.

Sammlung und Verarbeitung von Nasensekreten – Für die Sammlung der Nasensekrete wurde ein bereits in anderen Studien validiertes Verfahren genutzt, das auf der Verwendung eines Probenehmers mit absorbierenden Eigenschaften basiert, der in der Nasenhöhle eingeführt wird (35) (43). Diese Methode beruht auf der Absaugung der wässrigen Sol-Phase des zweischichtigen Schleimes, der das Flimmerepithel der Nase bedeckt. Kommerziell erhältliche Schwämme ("Merocel 2000®/Kennedy Laminated Sinustent", Verband 3,5 cm \times 0,6 cm \times 1,2 cm Medtronic Xomed, Inc Jacksonville FL USA 32216) wurden zunächst paarweise in 15 ml-Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) versiegelt und vor der Probenentnahme gewogen. Um jegliche Verunreinigungen an der Nasenschleimhaut zu entfernen, wurden die Teilnehmer gebeten, sich vor der Probenentnahme die Nase zu putzen. Unter direkter Sicht führte der Untersucher anschließend jeweils einen Schwamm über die Nasenlöcher in die Nasenhöhlen der Patienten ein und platzierte sie entlang des vorderen Drittels des Nasenseptums. Die Schwämme wurden für 5 Minuten in situ belassen und danach entfernt. Daraufhin wurden die mit Nasensekret imprägnierte Schwämme wieder in das Falcon-Röhrchen eingeführt und erneut gewogen. Durch den Vergleich des Gewichts der Schwämme in ihren jeweiligen 15 ml-Röhrchen vor und nach dem Sammeln konnte das Gewicht der Nasenflüssigkeit bestimmt werden. Das Volumen wurde unter Annahme eines spezifischen Flüssigkeitsgewichts von 1 g/ml abgeleitet. Die Variabilität der

gewonnenen Volumina innerhalb der Studienkohorte war hoch und lag zwischen 50 µl und 2233 µl. Das angewandte Verfahren erfordert die Zugabe von Kochsalzlösung, um die Flüssigkeit aus den Nasenschwämmen zu mobilisieren. In den meisten Fällen wird als Minimum das gleiche Volumen des gesammelten Nasenflüssigkeitsvolumens benötigt, um eine unzureichende Proben-Rückgewinnung zu vermeiden. Darüber hinaus kommt es während der Prozedur der Proben zu einem Volumenverlust, weshalb die für die Analyse verfügbare Flüssigkeit nicht dem gesammelten Volumen der Nasensekretion entspricht. Diese Verdünnung von Nasensekreten beeinflusst allerdings die Nachweisbarkeit von immunologischen Mediatoren wie IgE. Deshalb besteht ein Hauptanliegen der Probeentnahmetechnik darin, einen Kompromiss zwischen der Erzielung eines ausreichenden Probenvolumens und der Vermeidung von Artefakten durch übermäßige Verdünnung zu finden.

Um eine individuell optimierte Verdünnung zu erreichen, wurde eine „Methode der minimalen Verdünnung“ entwickelt. Sie basiert auf der Anwendung eines personalisierten Verdünnungsfaktors, der umgekehrt proportional zum Volumen des gesammelten Nasensekrets ist. Die Menge der hinzugeführten physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) wurde je nach Sammlungsvolumen gemäß eines spezifisch für die Studie definierten Protokolls bestimmt. Auf diese Weise konnte genug Probenvolumen für die vorgesehenen Analysen gewonnen und gleichzeitig die Verdünnung so minimal wie möglich gehalten werden, um eine maximale Testempfindlichkeit zu garantieren. Die Verdünnungsfaktoren lagen im Bereich von Faktor zwei (wenn das Volumen ≥ 700 Microliter war) bis Faktor zehn (wenn das Volumen ≤ 140 Microliter war). Nach Zugabe der physiologischen Kochsalzlösung wurden die Schwämme in eine 5 ml-Spritze (Becton-Dickinson S.A.) eingeführt und die Flüssigkeit unter Verwendung des Spritzenkolbens in ein Eppendorf-Gefäß gedrückt. Zuletzt wurden diese Gefäße für 10 Minuten bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden wiederum in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die „originale“ Konzentration von Proteinen und IgE in den gesammelten Proben vor der Dilution wurde durch Multiplikation der in den verdünnten Proben gemessenen Werte mit ihrem jeweiligen Verdünnungsfaktor berechnet.

Analyse von Seren und Nasensekreten – Die Gesamtproteinkonzentrationen im Nasensekret wurden mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode (Pierce™, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gemessen (44). Für die Durchführung des Tests wurde die Anleitung des Pierce™ BCA Protein Assay Kit befolgt. Die Methode erlaubt die quantitative photometrische Bestimmung von Proteinen. Die Nachweißreaktion beruht auf der Tatsache, dass die in alkalischer Lösung durch die Proteine reduzierten Kupferionen mit BCA einen Farbkomplex ausbilden, der einen empfindlichen kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm ermöglicht. Proteinkonzentrationen werden unter Bezugnahme auf ein Standardprotein angegeben; wofür in dieser Studie Bovines Serumalbumin (BSA) als Standard verwendet wurde. Für dieses Referenzprotein wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Die Proben wurden 30 Minuten bei 37 °C mit BCA-Reagenz auf 96 Well-Platten inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Photometer abgelesen und die Ergebnisse in µg/ml ausgedruckt. Der Arbeitsbereich des Tests betrug 20 - 2000 µg/ml.

Das Gesamt-IgE (tIgE) wurde in den Seren und den Nasensekreten mit dem ImmunoCAP-Fluoreszenzenzym-Immuno-Assay (FEIA) (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden) gemessen (45). Bei diesem Test handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, der die quantitative Messung von Gesamt-IgE ermöglicht. Anti-IgE-Antikörper, kovalent gebunden an die feste Phase, reagieren mit dem Gesamt-IgE im Serum bzw. der Nasensekret-Probe des Patienten. Hinzugefügte enzymmarkierte Detektor-Antikörper gegen IgE bilden einen Komplex. Das gebundene Enzym ist in der Lage, einen hinzugefügten Farbstoff durch Spaltung zu aktivieren, sodass die Enzymaktivität photometrisch erfasst werden kann. Sie ist dabei proportional zur IgE-Konzentration in der Probe. Die Durchführung der Tests erfolgte mit dem automatisierten System Phadia 250® (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden) unter Befolgung der Gebrauchsanweisungen. Die Ergebnisse wurden in kU/l ausgedruckt. Der Nachweisbereich des Tests betrug 2 - 2000 kU/l.

Spezifisches IgE gegen 112 Allergenmoleküle wurde mittels eines Biochip-basierten, semi-quantitativen Immunoassays (ISAC-112 TM, Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Schweden) in den Nasensekreten und den Seren gemessen (46). Dieser Allergen-Chip enthält hochreine natürliche oder rekombinante Allergenkomponenten, die auf einem festen Substrat in einem Microarray-Format immobilisiert wurden. Nach Inkubation mit 20 µl des jeweiligen Probenmaterials erfolgt der Nachweis gebundener IgE-Antikörper mittels Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen humanes IgE (Sekundärantikörper). Die Bildverarbeitung erfolgt mit Hilfe eines geeigneten Microarray-Scanners, dessen Auswertungen mit einer speziellen Analyse-Software (MIA - Microarray Image Analysis Software) erstellt werden. Die Ergebnisse dieser semi-quantitativen Methode werden in ISAC Standardized Units (ISU) angegeben und entstehen durch den Vergleich der bei der Testung des Serums oder des Nasensekrets gemessenen Werte mit denen der Kalibrierungskurve. Allergene werden in einem Falschfarben-Anzeigemodus sichtbar. Das Testverfahren wurde im Rahmen dieser Studie gemäß den Herstellerangaben mit Nasensekreten und Seren durchgeführt, nachdem die Anwendung für Nasensekrete zuvor in einer Pilotstudie meiner Arbeitsgruppe validiert worden war. Im Detail besteht das Verfahren aus mehreren, zeitlich definierten Schritten. Als Puffer-Lösung wurde TBS-T-Lösung (*Tris-buffered saline* mit Tween) mit einem pH-Wert von 8,0 angewendet, die sich aus 10 mM Tris-Base als Puffer, 150 mM Natriumchlorid und 0,5 % Tween 20 zusammensetzt. Nach dem ersten Waschschrift wurde das Serum oder die Nasenflüssigkeit des Patienten direkt auf die einzelnen Reaktionsstellen des Microarrays aufgetragen. Nach 120-minütiger Inkubation in einer feuchten Kammer wurde überschüssiges Serum oder Nasenflüssigkeit durch einen erneuten Waschschrift mit Puffer-Lösung entfernt und 20 µl fluoreszenzmarkierter Anti-Human-IgE-Nachweisantikörper aufgetragen. Während einer 60-minütigen Inkubation erfolgte die Färbereaktion. Mit einem weiteren Waschschrift wurden ungebundene Nachweisantikörper entfernt. Anschließend wurden die Objektträger in einem Microarray-Scanner (CapitalBio LuxScan-10K/A) gescannt.

Ein Ergebnis von $\geq 0,1$ ISU im Serum sowie $\geq 0,06$ ISU im Nasensekret wurde als positiv bewertet (35).

Schließlich wurden die ursprüngliche Konzentrationen des Gesamtproteins, des Gesamt-IgEs und des antigenspezifischen IgEs in den gesammelten, noch unverdünnten Nasensekreten berechnet, indem die tatsächlich gemessenen Werte in den verdünnten, verfügbaren Proben mit dem individuell angewendeten Verdünnungsfaktor multipliziert wurden.

Statistische Analyse – Zur Erstellung der Grafiken sowie für die statistischen Auswertungen wurden die Programme Microsoft Excel (Excel, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) und STATA 14 (StataCorp, College Station, Tex) verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant gewertet. In dieser Arbeit wurden kontinuierliche Daten als Mittelwerte (mit Standardabweichungen) und/oder Mediane (mit Interquartilsbereiche oder Minimum-Maximum-Bereiche) sowie kategoriale Daten als absolute Zahlen und Prozentsätze dargestellt. Zusammenhänge zwischen zwei kontinuierlichen Variablen wurden unter Verwendung des Korrelationskoeffizienten nach Pearsons oder gegebenenfalls durch den nicht-parametrischen Spearman-Rho-Koeffizienten analysiert und abgebildet.

Um die Stabilität des Serum-Gesamt-IgE-Spiegels über die Zeit anhand der Blutproben zu bewerten, die von einer Patienten-Untergruppe zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Studie entnommen wurden, wurde der Intraclass-Korrelationskoeffizient (ICC) mit dem entsprechenden 95 %-Konfidenzintervall (CI) berechnet.

Die Leistung der allergenspezifischen IgE-Testung im Nasensekret hinsichtlich Sensitivität und Spezifität bei der Identifizierung positiver Patienten wurde analysiert, indem die Serum-Sensibilisierung als Standard herangezogen wurde. Diese Leistung wurde bei gleichbleibendem Grenzwert im Nasensekret von 0,06 ISU mit unterschiedlichen Serum-Grenzwerten (0,05; 0,1; 0,3; 0,6; 1; 2 und 3 ISU) geprüft.

Um die Verteilung der Sensibilisierungen gegen die unterschiedlichen Allergiequellen der drei Allergen-Kategorien (tierische, pflanzliche und luftgetragene Allergene) innerhalb unserer Population zu bewerten, wurden die mittleren Prävalenzen und Standardabweichungen von IgE-

Reaktionen auf die Allergenmoleküle ermittelt, sowohl im Nasensekret als auch im Serum. Diese Mittelwerte wurden anschließend verglichen und ein jeweiliger p-Wert wurde unter Verwendung eines gemischten logistischen Mehrebenenmodells ermittelt. Die IgE-Reaktivität auf eine bestimmte Allergenquelle wurde durch das Vorhandensein von sIgE-Antikörpern gegen eines oder mehrere ihrer untersuchten, speziesspezifischen Moleküle definiert. Stark kreuzreaktive Moleküle (PR-10-Moleküle, Profilin, Serumalbumin) wurden dabei ausgeschlossen. Darüber hinaus gab es einige Ausnahmen, wenn die kreuzreaktiven Moleküle auch für die originelle Sensibilisierung relevant waren, wie zum Beispiel Bet v 1, welches ein wichtiger Marker für die Sensibilisierung gegen Birkenpollen ist. Insgesamt umfassten die Analysen auf Quellenebene 86 Moleküle und 45 Quellen (Speichermilben und Hausstaubmilben wurden als eine Quelle betrachtet). Die IgE-Konzentration jeder Allergenquelle wurde berechnet, indem die positiven IgE-Konzentrationen zu jeder der nicht kreuzreaktiven Moleküle, die zu dieser Quelle gehören, addiert wurden. Anschließend wurde das geometrische Mittel sowie das 95 %-Konfidenzintervall (CI) dieser Werte berechnet.

Um die natürlichen Verdünnungseffekte des Nasensekrets, die in situ in der Nase aufgrund der bei der allergischen Rhinitis vorkommenden Rhinorrhö stattfinden, zu beobachten, wurde die Beziehung der Gesamtproteinkonzentration und der Gesamt-IgE-Konzentration zum gesammelten Volumen der Nasensekrete analysiert. Diese zeigte sich als umgekehrtes Verhältnis und wurde mittels einer linearen Spline-Funktion dargestellt, dessen Knoten auf 500 µl fixiert wurde. Dieser wurde festgelegt, nachdem das Streudiagramm zwischen dem analysierten Protein und dem Volumen analysiert wurde. Beide Modelle wurden nach der Eliminierung der jeweiligen Ausreißer aufgestellt.

II.3 Neuartigkeit der Studie und wesentliche Ergebnisse

In unserer Studie haben wir mittels neuester Allergen-Microarray-Technologie das allergenspezifische IgE-Repertoire in Nasensekreten von Kindern und Erwachsenen mit saisonaler allergischer Rhinitis untersucht. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, die das nasale IgE-Repertoire für ein derartig breites Spektrum von Allergenmolekülen bei einer so großen Patientenpopulation mit saisonaler allergischer Rhinitis beschreibt. Dieser nicht-invasive Ansatz ist insbesondere für pädiatrische Patienten vielversprechend und könnte womöglich die etablierte Blutentnahme in der klinischen Routine zukünftig ersetzen.

Inkludiert in die Studienpopulation waren 90 pädiatrische Patienten im Alter von 10 bis 18 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 14 Jahren sowie 71 Erwachsene von 18 bis 65 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 35 Jahren. 70 % der Kinder und 66,7 % der Erwachsenen wiesen eine mäßig-schwere, persistierende saisonale allergische Rhinitis auf. Anhand der Skin-Prick-Tests (SPT) wurde festgestellt, dass vor allem bei den pädiatrischen Patienten, die alle in Rom leben, eine starke Polysensibilisierung gegenüber mehrere, unterschiedliche inhalative Allergene bestand. Dies ist bei Patienten aus südeuropäischen Ländern wie Italien aufgrund der Exposition zu einer großen Varietät an pollinierende Pflanzen häufig zu beobachten. Die Anamnese allein ist bei diesen Patienten zur Erkennung des symptomauslösenden Allergens nicht ausreichend, da die Bestäubung mehrerer Pflanzen zum selben Zeitpunkt stattfindet (36). In diesen Ländern hat die Allergenkomponenten-basierte Diagnostik einen besonderen Stellenwert beim Nachweis von primären Sensibilisierungen über die Analyse der speziesspezifischen Marker-Moleküle verschiedener Allergenquellen. Ebenso ist sie bedeutsam für die Aufdeckung von Kreuzreaktionen über die Umfassung von kreuzreaktiven Komponenten (Panallergenen wie zum Beispiel B. PR-10-Proteine und Profilin) (47) (48).

Die Befunde der SPT-Testung zeigten, dass 97,6 % der Kinder in Rom gegen Wiesen-Lieschgras, 90 % gegen Olive und 87,8 % gegen Zypresse sensibilisiert waren. Die Prävalenz der Sensibilisierung gegenüber Innenraumallergenen war innerhalb der pädiatrischen Population ebenfalls hoch (72,2 % für Hausstaubmilben, 72,2 % für Katzenhaar und 78,9 % für Hundehaar). Bei den in Nord-Osten-Italien rekrutierten erwachsenen Patienten waren die Sensibilisierungen ebenso am häufigsten gegen Wiesen-Lieschgras (83,1 %) sowie gegen Birke (56,3 %) und Zypresse (38 %).

In unserer Arbeit wurde eine bereits in vorherigen Studien validierte Nasensekret-Sammlung-Absorptionsmethode (35) mittels einer entwickelten „Methode der minimalen Verdünnung“ optimiert, um unnötige Verdünnungsartefakte zu vermeiden und zugleich eine ausreichende Probenmenge für die vorgesehenen Tests zu garantieren. Diese Methode beruht auf der Applizierung eines personalisierten, dem Sammlungsvolumen angepassten Verdünnungsfaktors. Die Ergebnisse der Studie konnten zeigen, dass Nasensekrete, wenn sie mit der geringstmöglichen Verdünnung gesammelt und verarbeitet werden, ein geeignetes Medium für IgE-Messungen darstellen. Gesamt-IgE und Gesamtproteinkonzentrationen konnten in allen 161 Nasensekret-Proben gemessen werden. Die Variabilität der im Nasensekret gemessenen Gesamt-IgE-Konzentration war innerhalb unserer Kohorte hoch und lag zwischen 8,1 kU/l und 211,8 kU/l, mit einem Durchschnittswert von 26,9 kU/l.

Die originale Gesamtproteinkonzentration (d. h. vor der Dilution) in den Nasenflüssigkeiten zeigte sich umgekehrt proportional zu der Menge an gesammelter Probe. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass eine natürliche Dilution schon in der Nase durch die wässrige Rhinorrhö erfolgt, die typischerweise bei Patienten mit allergischer Rhinitis auftritt.

Nasale allergen-spezifische IgE-Antikörper waren bei 68,3 % der Patienten nachweisbar, während alle bis auf einen Patienten sIgE-Antikörper im Serum zeigten. Die kumulativen Konzentrationen nasaler sIgE-Antikörper lagen im Bereich von 0,12 bis 206,6 ISU.

Das in einer südeuropäischen Kohorte zu erwartender Bild häufiger Polysensibilisierungen zeigte sich auch bei den Probanden dieser Studie. Die nachgewiesenen sIgE-Antikörper im Nasensekret richteten sich vorwiegend gegen aerogene (88 %) Allergenmoleküle. Die Prävalenz positiver IgE-Antworten war besonders hoch für die Lieschgraskomponenten Phl p 1 (47 %) und Phl p 5 (33 %) sowie das Hauptallergen der Zypresse Cup a 1 (27 %), das Hundszahngras-Molekül Cyn d 1 (25,5 %) und das Hausstaubmilbenallergen Der p 2 (25,5 %). Interessanterweise konnten in circa 10 % der Nasensekrete auch sIgE gegenüber Molekülen pflanzlicher Lebensmittel sowie bei einem Patienten gegenüber Komponenten tierischer Lebensmittel nachgewiesen werden. Der Befund, dass das IgE-Repertoire der Nasensekrete nicht auf aerogene Moleküle beschränkt ist, gibt Grund zur Annahme, dass die nachgewiesenen Antikörper nicht nur lokal in der Nasenschleimhaut produziert wurden, sondern auch aus dem Blut übergetreten sind. Der jeweilige Anteil der beiden Quellen variiert in der Literatur je nach Allergenexposition, nach individueller Empfindlichkeit sowie individuell über die Zeit (18). Obwohl ein genereller Nachweis von IgE-Antikörpern gegen Nahrungsmittelallergene im Nasensekret bereits in einer früheren Studie erfolgte (49), ist die immunologische Grundlage dieses Phänomens noch weitgehend unerforscht.

Die in den molekularen Tests beobachteten Trends zeichneten sich entsprechend auch in der Analyse der IgE-Antworten auf Allergenextrakte ab, welche folgende Häufigkeiten aufwiesen: Lieschgras (51,5 %), Hausstaubmilben (31,1 %), Zypresse (27,3 %), Hundszahngras (25,4 %) und Birke (22,9 %).

Die im Nasensekret beschriebenen Sensibilisierungsmuster spiegelten sich weitgehend auch im Serum der jeweiligen Patienten wider. Im Hinblick auf die Prävalenz der Sensibilisierung gegen einzelne Allergenmoleküle in der Studienbevölkerung zeigte sich eine Korrelation zwischen die Ergebnisse im Serum und die im Nasensekret (Pearson's Rho-Koeffizient = 0,906; p-Wert < 0,001). Auch die mittlere IgE-Konzentration gegen einzelne Moleküle gemessen im Serum und im Nasensekret zeigte eine Korrelation (Pearson's Rho-Koeffizient = 0,729; p-Wert < 0,001).

Im Gegensatz hierzu wurden bei fast einem Drittel (31,3 %) der Patienten dieser Studie mit positivem IgE-Nachweis im Serum keine entsprechenden nasalen sIgE-Antikörper nachgewiesen. Dementsprechend fielen die Sensitivität sowie der negative prädiktive Wert des IgE-Tests im Nasensekret eher niedrig aus. Das Vorhandensein von IgE gegen ein bestimmtes Allergenmolekül im Serum wurde durch den Nachweis desselben sIgE-Antikörpers im Nasensekret mit einer Sensitivität von nur 40 % vorausgesagt. Hingegen waren die Spezifität sowie der positive prädiktive Wert hoch. Der Nachweis spezifischen IgEs gegen ein Allergenmolekül im Nasensekret konnte mit großer Sicherheit (Spezifität: 99,7 %) das Vorhandensein des entsprechenden Antikörpers im

Serum vorhersagen. Mit anderen Worten zeigten die Ergebnisse, dass bei 161 Kindern und Erwachsenen mit saisonaler allergischer Rhinitis ein positives Ergebnis des ISAC-112 IgE-Tests im Nasensekret in 99,7 % der Fälle einen entsprechenden IgE-Nachweis im Serum vorhersagen konnte. Bei einem negativen Ergebnis im Nasensekret konnte hingegen eine Sensibilisierung im Serum nicht ausgeschlossen werden. Die geringe Sensitivität des nasalen IgE-Tests in der Studienpopulation ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Konzentration von sIgE im Nasensekret selbst bei minimaler Verdünnung zu gering ist, um von den verwendeten immunologischen Nachweisverfahren detektiert zu werden.

II.4 Limitationen

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf. Erstens wurden die Serumproben und Nasensekrete der Patienten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt. Bei 21 Patienten wurde allerdings zweimal Serum abgenommen, einmal standardmäßig während der Rekrutierungsuntersuchung und einmal zum Zeitpunkt der Nasensekret-Sammlung. Die Ergebnisse des Gesamt-IgEs (tIgE) und antigen-spezifischen IgEs (sIgE), gemessen in den zwei Seren dieser 21 Patienten, korrelierten jeweils stark miteinander (Pearson's Rho-Koeffizient = 0,92, $p < 0,001$ für tIgE und Intraclass-Korrelationskoeffizient = 0,79, 95 %-Konfidenzintervall = 0,77 - 0,81 für sIgE). Zweitens muss damit gerechnet werden, dass der lokale IgE-Nachweis im Nasensekret durch die jeweils herrschenden Umweltbedingungen vor und während des Entnahmezeitpunkts beeinflusst wurde. Drittens wurde nur eine einzige kommerzielle Microarray-Methode zum Testen von sIgE-Antikörpern verwendet, weshalb die Schlussfolgerungen nicht auf alle anderen derzeit verfügbaren Technologien übertragbar sind.

II.5 Zusammenfassung

Zusammengefasst konnte diese Arbeit darlegen, dass ein nicht-invasives Nachweisverfahren lokaler IgE-Antikörper zur Erfassung allergischer Sensibilisierung bei Kindern und Erwachsenen ein sinnvoller Ansatz sein könnte. Es wurde gezeigt, dass Nasensekrete ein geeignetes Probenmaterial für diesen Nachweis darstellen. Die Daten deuten jedoch darauf hin, dass die derzeit verfügbare Microarray-Technologie mit verdünntem Probenmaterial noch nicht sensitiv genug ist, um die Nasensekret-IgE-Testung als einen gültigen und zuverlässigen Ersatz für Serum-IgE-Messungen in Erwägung zu ziehen. Die Bestimmung von sIgE-Antikörpern in Nasensekreten bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis mittels Biochip-Technologie zeigte sich zwar hochspezifisch, jedoch nicht sensitiv genug, um das Vorhandensein oder Fehlen der entsprechenden Antikörper im Serum vorherzusagen. Zukünftige Entwicklungen zur Verbesserung der Array-Methoden sollten eine höhere Leistung bezüglich der Sensitivität bei gleichbleibend niedrigem Probenvolumen-Bedarf anstreben. Somit könnte die Validierung von Nasensekret als eine gültige Alternative zum Serum für die molekulare Testung des sIgE-Repertoires bei Patienten mit Pollenallergie möglich werden. Dies würde ein nicht-invasives Verfahren für die Diagnostik der allergischen Rhinitis liefern, welches insbesondere für pädiatrische Patienten wünschenswert wäre und einen Fortschritt für den klinischen Alltag der Allergiediagnostik bedeuten würde.

II.6 Bibliografie

1. Small P, Keith PK, Kim H. Allergic rhinitis. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(2):51.
2. Blaiss MS, Hammerby E, Robinson S, Kennedy-Martin T, Buchs S. The burden of allergic rhinitis and allergic rhinoconjunctivitis on adolescents: A literature review. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;121(1):43-52.
3. Meltzer EO, Farrar JR, Sennett C. Findings from an Online Survey Assessing the Burden and Management of Seasonal Allergic Rhinoconjunctivitis in US Patients. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(3):779-789.
4. Schuler Iv CF, Montejo JM. Allergic Rhinitis in Children and Adolescents. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(5):981-993.
5. Naclerio RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 1991;325(12):860-869.
6. Durham SR. The inflammatory nature of allergic disease. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(6):20-24.
7. Bonini S. Allergic conjunctivitis: the forgotten disease. *Chem Immunol Allergy.* 2006;91:110-120.
8. Greiner AN, Hellings PW, Rotiroti G, Scadding GK. Allergic rhinitis. *Lancet.* 2011;378(9809):2112-22.
9. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Host A, Koivikko A, Norberg LA, Valovirta E, Wahn U, Möller C. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy.* 2007;62(8):943-8.
10. Rondon C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG, Mullol J, Blanca M. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(6):1460-7.
11. Tse KS, Wicher K, Arbesman CE. IgE antibodies in nasal secretions of ragweed-allergic subjects. *J Allergy.* 1970;46(6):352-7.
12. Huggins KG, Brostoff J. Local production of specific IgE antibodies in allergic-rhinitis patients with negative skin tests. *Lancet.* 1975;2(7926):148-50.
13. Platts-Mills TA. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. *J Immunol.* 1979;122(6):2218-25.
14. Smurthwaite L, Walker SN, Wilson DR, Birch DS, Merrett TG, Durham SR, Gould HJ. Persistent IgE synthesis in the nasal mucosa of hay fever patients. *Eur J Immunol.* 2001;31(12):3422-31.
15. KleinJan A, Godthelp T, van Toornenenbergen AW, Fokkens WJ. Allergen binding to specific IgE in the nasal mucosa of allergic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Apr;99(4):515-21.
16. Coker HA, Durham SR, Gould HJ. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J Immunol.* 2003;171(10):5602-10.
17. Takhar P, Smurthwaite L, Coker HA, Fear DJ, Banfield GK, Carr VA, Durham SR, Gould HJ. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J Immunol.* 2005 Apr 15;174(8):5024-32.
18. Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Gevaert P, Lambrecht BN. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(3):635-45.
19. Ahn JY, Hong SJ, Choi BS. Clinical Evaluation of Techniques for Measuring Nasal-Specific Immunoglobulin E in Pediatric Patients. *J Korean Med Sci.* 2017;32(12):2005-2008.
20. Colavita L, Catalano N, Sposito G, Loddo S, Galletti B, Salpietro C, Galletti F, Cuppari C. Local Allergic Rhinitis in Pediatric Patients: Is IgE Dosage in Nasal Lavage Fluid a Useful Diagnostic Method in Children? *Int J Mol Cell Med.* 2017;6(3):174-182.
21. Powe DG, Jagger C, Kleinjan A, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. 'Entropy': localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(10):1374-9.

22. Rondón C, Romero JJ, López S, Antúnez C, Martín-Casañez E, Torres MJ, Mayorga C, R-Pena R, Blanca M. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(4):899-905.
23. Rondón C, Doña I, López S, Campo P, Romero JJ, Torres MJ, Mayorga C, Blanca M. Seasonal idiopathic rhinitis with local inflammatory response and specific IgE in absence of systemic response. *Allergy*. 2008;63(10):1352-8.
24. Meng Y, Lou H, Wang Y, Wang C, Zhang L. The use of specific immunoglobulin E in nasal secretions for the diagnosis of allergic rhinitis. *Laryngoscope*. 2018;128(9):E311-E5.
25. Becker S, Rasp J, Eder K, Berghaus A, Kramer MF, Groger M. Non-allergic rhinitis with eosinophilia syndrome is not associated with local production of specific IgE in nasal mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(6):1469-75.
26. Shamji MH, Kappen JH, Akdis M, Jensen-Jarolim E, Knol EF, Kleine-Tebbe J, Bohle B, Chaker AM, Till SJ, Valenta R, Poulsen LK, Calderon MA, Demoly P, Pfaar O, Jacobsen L, Durham SR, Schmidt-Weber CB. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*. 2017;72(8):1156-73.
27. Castelli S, Arasi S, Pawankar R, Matricardi PM. Collection of nasal secretions and tears and their use in allergology. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018;18(1):1-9.
28. Wise SK, Lin SY, Toskala E, Orlandi RR, Akdis CA, Alt JA, Azar A, Barody FM, Bachert C, Canonica GW, Chacko T, Cingi C, Ciprandi G, Corey J, Cox LS, Creticos PS, Custovic A, Damask C, DeConde A, DelGaudio JM, Ebert CS, Eloy JA, Flanagan CE, Fokkens WJ, Franzese C, Gosepath J, Halderman A, Hamilton RG, Hoffman HJ, Hohlfeld JM, Houser SM, Hwang PH, Incorvaia C, Jarvis D, Khalid AN, Kilpeläinen M, Kingdom TT, Krouse H, Larenas-Linnemann D, Laury AM, Lee SE, Levy JM, Luong AU, Marple BF, McCoul ED, McMains KC, Melén E, Mims JW, Moscato G, Mullol J, Nelson HS, Patadia M, Pawankar R, Pfaar O, Platt MP, Reisacher W, Rondón C, Rudmik L, Ryan M, Sastre J, Schlosser RJ, Settiple RA, Sharma HP, Sheikh A, Smith TL, Tantilipikorn P, Tversky JR, Veling MC, Wang Y, Westman M, Wickman M, Zacharek M. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Allergic Rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018;8(2):108-352.
29. Fuiano N, Fusilli S, Incorvaia C. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of *Alternaria*-induced rhinitis in children. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012;40:71–74.
30. Kim JH, Yoon MG, Seo DH, Kim BS, Ban GY, Ye YM, Shin YS, Park HS. Detection of allergen specific antibodies from nasal secretion of allergic rhinitis patients. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8:329–337.
31. Lee KS, Yu J, Shim D, Choi H, Jang MY, Kim KR, Choi JH, Cho SH. Local immune responses in children and adults with allergic and nonallergic rhinitis. *PLoS One*. 2016;11:e0156979.
32. Sakaida H, Masuda S, Takeuchi K. Measurement of Japanese cedar pollen-specific IgE in nasal secretions. *Allergol Int*. 2014;63:467–473.
33. Rondon C, Eguluz-Gracia I, Shamji MH, Layhadi JA, Salas M, Torres MJ, Campo P. IgE Test in Secretions of Patients with Respiratory Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018;18(12):67.
34. Lupinek C, Wollmann E, Baar A, Banerjee S, Breiteneder H, Broecker BM, Bublin M, Curin M, Flicker S, Garmatiuk T, Hochwallner H, Mittermann I, Pahr S, Resch Y, Roux KH, Srinivasan B, Stentzel S, Vrtala S, Willison LN, Wickman M, Lødrup-Carlson KC, Antó JM, Bousquet J, Bachert C, Ebner D, Schleiderer T, Harwanegg C, Valenta R. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods*. 2014;66(1):106-19.
35. Berings M, Arasi S, De Ruyck N, Perna S, Resch Y, Lupinek C, Chen KW, Vrtala S, Pajno GB, Bachert C, Lambrecht BN, Dullaers M, Valenta R, Matricardi PM, Gevaert P. Reliable mite-specific IgE testing in nasal secretions by means of allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):301-303.

36. Di Fraia M, Arasi S, Castelli S, Dramburg S, Potapova E, Villalta D, Tripodi S, Sfika I, Zicari AM, Villella V, Perna S, Travaglini A, Verardo PL, Matricardi PM. A new molecular multiplex IgE assay for the diagnosis of pollen allergy in Mediterranean countries: A validation study. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(3):341-9.
37. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368(9537):733-43.
38. Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, van Wijk RG, Ohta K, Zuberbier T, Schünemann HJ; Global Allergy and Asthma European Network; Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation Working Group. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(3):466-76.
39. Jauregui I, Davila I, Sastre J, Bartra J, del Cuvillo A, Ferrer M, Montoro J, Mullol J, Molina X, Valero A. Validation of ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) classification in a pediatric population: the PEDRIAL study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(4):388-92.
40. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008;31(1):143-78.
41. Di Fraia M, Tripodi S, Arasi S, Dramburg S, Castelli S, Villalta D, Buzzulini F, Sfika I, Villella V, Potapova E, Perna S, Brighetti MA, Travaglini A, Verardo P, Pelosi S, Zicari AM, Matricardi PM. Adherence to Prescribed E-Diary Recording by Patients With Seasonal Allergic Rhinitis: Observational Study. *J Med Internet Res*. 2020;22(3):e16642.
42. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, Canonica GW, Carlsen KH, Cox L, Haahtela T, Lodrup Carlsen KC, Price D, Samolinski B, Simons FE, Wickman M, Annesi-Maesano I, Baena-Cagnani CE, Bergmann KC, Bindslev-Jensen C, Casale TB, Chiriac A, Cruz AA, Dubakiene R, Durham SR, Fokkens WJ, Gerth-van-Wijk R, Kalayci O, Kowalski ML, Mari A, Mullol J, Nazamova-Baranova L, O'Hehir RE, Ohta K, Panzner P, Passalacqua G, Ring J, Rogala B, Romano A, Ryan D, Schmid-Grendelmeier P, Todo-Bom A, Valenta R, Woehrl S, Yusuf OM, Zuberbier T, Demoly P; Global Allergy and Asthma European Network; Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*. 2012;67(1):18-24.
43. Watelet JB, Gevaert P, Holtappels G, Van Cauwenberge P, Bachert C. Collection of nasal secretions for immunological analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2004;261(5):242-6.
44. Heikkinen T, Shenoy M, Goldblum RM, Chonmaitree T. Quantification of cytokines and inflammatory mediators in samples of nasopharyngeal secretions with unknown dilution. *Pediatr Res*. 1999;45(2):230-4.
45. Matricardi PM, Bockelbrink A, Gruber C, Keil T, Hamelmann E, Wahn U, Lau S. Longitudinal trends of total and allergen-specific IgE throughout childhood. *Allergy*. 2009;64(7):1093-8.
46. Van Hage M, Schmid-Grendelmeier P, Skevaki C, Plebani M, Canonica W, Kleine-Tebbe J, Nystrand M, Jafari-Mamaghani M, Jakob T. Performance evaluation of ImmunoCAP(R) ISAC 112: a multi-site study. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(4):571-7.
47. Dramburg S, Matricardi PM. Molecular Diagnosis of Allergy: The Pediatric Perspective. *Front Pediatr*. 2019;7:369.
48. Matricardi PM, Dramburg S, Potapova E, Skevaki C, Renz H. Molecular diagnosis for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(3):831-843.
49. Reisacher WR. Detecting local immunoglobulin E from mucosal brush biopsy of the inferior turbinates using microarray analysis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(5):399-403.

III. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sveva Castelli, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das antigen-spezifische IgE-Repertoire im Nasensekret von Kindern und Erwachsenen mit saisonaler allergischer Rhinitis: ein neuer Ansatz zur allergologischen Labordiagnostik“ („Antigen specific IgE antibody repertoire in nasal secretions of children and adults with seasonal allergic rhinitis: a new approach to allergy diagnostic “) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

„IgE antibody repertoire in nasal secretions of children and adults with seasonal allergic rhinitis: A molecular analysis.“ *Castelli S, Arasi S, Tripodi S, Villalta D, Martelli P, Conte M, Panetta V, Simonelli I, Rohrbach A, Di Fraia M, Sfika I, Vilella V, Di Rienzo Businco A, Perna S, Dramburg S, Potapova E, Matricardi PM.* *Pediatr Allergy Immunol.* 2020 Apr;31(3):273-280. doi: 10.1111/pai.13148. Epub 2020 Jan 22.

Beitrag zu dem Projekt:

Die für meine Promotion ausgewählte Publikation entstand im Rahmen des Projektes „Das Repertoire antigen-spezifischen IgEs im Nasensekret: ein neuer Ansatz zur allergologischen Labordiagnostik“ unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. Paolo Matricardi. Das Projekt ist als Bestandteil der großen klinischen Beobachtungsstudie „@IT2020 – Precision Allergology: m-Health & molecular tests for specific immunotherapy“ entstanden. Für die Studie wurden Kinder und Erwachsene mit saisonaler allergischer Rhinitis zwischen November 2016 und Februar in zwei klinischen Zentren in Nord- und Mittelitalien (Pordenone und Rom) rekrutiert.

Mein Aufgabenbereich bestand vor allem in der Untersuchung des Repertoires allergenspezifischer IgE-Antikörper im Nasensekret und Serum von Kindern und Erwachsenen mit allergischer Rhinitis. Hierfür analysierte ich mittels der beschriebenen in-vitro-Tests die Konzentrationen von Gesamt-IgE sowie spezifischem IgE gegen 112 Allergenmoleküle im Nasensekret und Serum der 161 Probanden. Die durch die Messungen erhaltenen Ergebnisse führte ich in einer umfassenden Datenbank zusammen. Diese Datenbank kombinierte ich mit den anonymisierten klinischen Daten der entsprechenden Patienten und führte mehrere Qualitätskontrollen durch. Nach Abschluss des Datenmanagements begann ich mit der statistischen Analyse und erstellte alle Tabellen sowie Abbildungen für die beschriebene Publikation. Nachdem ich mit Herrn Dr. Matricardi die generelle Struktur der Ergebnisdarstellung besprochen hatte, begann ich den Fließtext des Artikels auszuformulieren. Der gesamte Text wurde inhaltlich von meinem Betreuer sowie sprachlich von englischsprachigen Kollegen geprüft.

Herr Dr. Matricardi leitete mich zu Beginn unserer Zusammenarbeit in die Thematik ein und hat mich im gesamten Entstehungsprozess der Arbeit engmaschig betreut. Während dieses Prozesses hatte ich die Möglichkeit, mit meinem Betreuer inhaltlichen und methodischen Problemen zu diskutieren sowie eigene Ideen und Lösungsansätze einzubringen. Herr Dr. Matricardi und ich tauschten uns stets über die wesentlichen Schritte des Prozederes zur Entstehung dieser Arbeit aus, welche ich anschließend eigenverantwortlich umsetzte und kritisch reflektierte.

Beitrag im Einzelnen:

1. Vorbereitung

Zu Beginn der Arbeit führte ich eine sorgfältige Literaturrecherche zum Stand der Forschung im Bereich der Molekularallergologie sowie im speziellen zur Rolle der Untersuchungen von IgE-Antikörpern und weiteren Biomarkern im Nasensekret und Tränen in der Allergologie durch. Des Weiteren recherchierte ich über die unterschiedlichen Nachweißverfahren für IgE und legte einen besonderen Fokus auf die Methodik des Allergen-Microarrays. Die Ergebnisse fasste ich unter anderem in einem Review zusammen (Castelli S, Arasi S, Pawankar R, Matricardi PM. *Collection of nasal secretions and tears and their use in allergology. Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2018;18:1-9.). Im Rahmen des wöchentlichen Journal Clubs der Abteilung für pädiatrische Pneumologie, Immunologie und Intensivmedizin präsentierte ich unser Arbeitsprojekt sowie die Ergebnisse des Reviews den Kollegen aus der Klinik. Durch den Kontakt und die Mitarbeit in den klinischen Zentren in Italien unterstützte ich die Organisation des Probenversands nach Berlin, wo die Proben im Allergieforschungslabor der Charité aufbewahrt wurden. Nach dem Eintreffen der einzelnen Serum- und Nasensekretproben kontrollierte ich deren Zustand und Volumen.

2. Methodik

Die laborchemisch erhobenen Daten dieser Arbeit wurden mit unterschiedlichen Methoden gemessen. Die Konzentrationen des Gesamt-IgE im Nasensekret und Serum wurden mittels Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay Methode ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific) detektiert. Die allergenspezifischen IgE-Antikörper-Konzentrationen wurden im Nasensekret und Serum durch die Methodik des Allergenmicroarray ISAC® (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Gesamtproteinkonzentration im Nasensekret wurde mittels Bicinchoninsäure-Assay (Pierce BCA Assay, Thermo Scientific) erfasst. Unter der Supervision des medizinisch-technischen Assistenten, Herrn Alexander Rohrbach, arbeitete ich mich zunächst intensiv in die Methodik ein. Herr Rohrbach machte mich mit der Handhabung der Materialien vertraut und lehrte mir die Durchführung der Tests sowie die Auswertung der Ergebnisse. Regelmäßig stellte ich die generierten Ergebnisse in entsprechenden Tabellen sowie Grafiken zusammen und präsentierte diese meinem Betreuer. Die Laborexperimente wurden schrittweise innerhalb eines Jahres von mir und Herrn Rohrbach durchgeführt. Die korrekte Durchführung der Labortests sowie die Auswertung der Ergebnisse lagen in meiner Verantwortung und wurden von mir stets kritisch geprüft sowie hinterfragt. Während dieses Zeitraums habe ich des Weiteren die allergenspezifischen IgE-Antikörper-Konzentrationen gegen ausgewählte Pollenmoleküle und -extrakte in den 200 Seren der Studie mittels ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Diese Laborarbeit sowie die aktive Mitarbeit an der Erstellung der Veröffentlichung ermöglichten mir den Platz als dritte Ko-Autorin des Artikels „Di Fraia M, Arasi S, Castelli S, Dramburg S, Potapova E, Villalta D, et al. *A new molecular multiplex IgE assay for the diagnosis of pollen allergy in Mediterranean countries: A validation study. Clin Exp Allergy* 2019; 49:341-9“.

3. Studiendesign

Im Rahmen des festgelegten Studiendesigns gestaltete ich meinen Projekt-Anteil selbstständig. In regelmäßigen Treffen mit meinem Betreuer diskutierten wir die Formulierung der Fragestellungen sowie Hypothesen. Ich brachte Vorschläge bezüglich der Umsetzung der hierfür notwendigen Analysen ein und übernahm anschließend die Organisation sowie Durchführung der nötigen Arbeitsschritte.

4. Datenbank

Ich erstellte eine Sekundärdatenbank, die eine Sammlung aller relevanter Daten für das Projekt enthielt (klinische Daten und daraus von mir erstellte neue Variablen, Serum- und Nasensekret-Gesamt-IgE, Serum- und Nasensekret-IgE gegen Allergenmoleküle, Gesamtprotein im Nasensekret.) Es war meine Aufgabe, die Datenbank im Verlauf der Studie zu pflegen und zu aktualisieren. Die Datenbank diente als Grundlage für die Analysen, die ich selbstständig unter der Supervision von Herrn Dr. Matricardi durchführte. Die Analysen wurden anschließend von der Statistikerin Frau Panetta gegengeprüft.

5. Auswertung der Ergebnisse

Während des gesamten Projektzeitraums lagen die Auswertung der Rohdaten, die Erstellung und Aktualisierung der Primär- und Sekundärdatenbank sowie die darauf basierenden deskriptiven Berechnungen in meiner Verantwortung. Für die durchzuführenden Analysen überlegte ich mir den passenden Ansatz, führte sie selbstständig aus und erstellte daraus Tabellen sowie Graphen, die ich Herrn Dr. Matricardi regelmäßig präsentierte. Durch die Anregungen, Korrekturen und Verbesserungsvorschläge modifizierte ich einige Analysen und stellte sie erneut vor. Alle im Paper publizierten Graphen wurden von mir erstellt und anschließend durch Herrn Dr. Matricardi und Frau Panetta überprüft und genehmigt. In der letzten Phase der Arbeit arbeitete ich engmaschig mit Frau Panetta zusammen. Ich besprach mit ihr die statistische Vorgehensweise, diskutierte anschließend die Ergebnisse und ließ meine Berechnungen überprüfen.

6. Kongresse

Im Verlauf der Arbeit stellte ich die Ergebnisse unseres Projektes in Form einer mündlichen Präsentation im Rahmen des Jahreskongresses der European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2019 in Lissabon vor. Ich erstellte darüber hinaus ein Poster über das Projekt, welches im Rahmen des 14. Deutschen Allergiekongresses 2019 in Hannover präsentiert wurde. Des Weiteren erstellte ich für die Vorstellung unserer Ergebnisse diverse Folien und Grafiken, die im Rahmen von Präsentationen durch Herrn Dr. Matricardi auf weiteren nationalen sowie internationalen Kongressen vorgestellt wurden.

7. Publikation der Ergebnisse

In enger Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Herrn Dr. Matricardi selektierte ich aus der Fülle der Ergebnisse den Inhalt für die Publikation. Die Tabellen und Abbildungen erstellte ich in Absprache mit Herrn Dr. Matricardi sowie den Statistikerinnen. Ich befasste mich mit der Literatur über das Thema und erstellte schrittweise das gesamte Manuskript. Mein Betreuer überprüfte und korrigierte den Text engmaschig. Zudem besprachen wir Änderungen und Verbesserungsvorschläge. Die englische Sprache wurde von einer englischsprachigen Kollegin überprüft. Ich übernahm die gesamte Quellenrecherche sowie die Kontrolle der Formalia zur Einreichung des Manuskripts bei einem wissenschaftlichen Journal mit Peer-Review-Prozess. Im Juli 2019 reichten wir das

Manuskript schließlich beim internationalen Fachjournal „Pediatric Allergy and Immunology“ ein. In Rücksprache mit meinem Doktorvater nahm ich die von den Reviewern gewünschten Änderungen und Ergänzungen vor. Im Zuge dessen fertigte ich einen ausführlichen „point-by-point reply“ an.

Im Oktober 2019 wurde unser Artikel zur Veröffentlichung angenommen. Der Artikel „IgE antibody repertoire in nasal secretions of children and adults with seasonal allergic rhinitis: a molecular analysis.“ erschien am 02.11.2019 zunächst als Online-Publikation der Zeitschrift „Pediatric Allergy and Immunology“. Die ausgedruckte Publikation erschien im April 2020 in der Zeitschrift „Pediatric Allergy and Immunology“, Volume 31, Issue 3.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

IV. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2018 Selected Editions: SCIE,SSCI
Selected Categories: "PEDIATRICS" Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 123 Journale

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|--|-------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | JAMA Pediatrics | 8,016 | 12.004 | 0.044320 |
| 2 | JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY | 19,942 | 6.391 | 0.019370 |
| 3 | PEDIATRICS | 80,070 | 5.401 | 0.109340 |
| 4 | PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY | 4,360 | 4.654 | 0.008520 |
| 5 | JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH | 15,535 | 3.957 | 0.029260 |
| 6 | Seminars in Fetal & Neonatal Medicine | 2,428 | 3.846 | 0.004670 |
| 7 | Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition | 4,193 | 3.776 | 0.008410 |
| 8 | EUROPEAN CHILD & ADOLESCENT PSYCHIATRY | 5,186 | 3.740 | 0.009270 |
| 9 | JOURNAL OF PEDIATRICS | 32,002 | 3.739 | 0.045030 |
| 10 | Pediatric Obesity | 1,944 | 3.713 | 0.005650 |
| 11 | DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY | 12,256 | 3.532 | 0.013840 |
| 12 | PEDIATRIC DIABETES | 4,182 | 3.347 | 0.008070 |
| 13 | PEDIATRIC DENTISTRY | 3,000 | 3.312 | 0.001950 |
| 14 | Maternal and Child Nutrition | 2,829 | 3.305 | 0.008390 |
| 15 | ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD | 16,646 | 3.158 | 0.014630 |
| 16 | JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION | 12,812 | 3.015 | 0.016910 |
| 17 | SEMINARS IN PERINATOLOGY | 3,334 | 2.883 | 0.005240 |
| 18 | PEDIATRIC RESEARCH | 13,760 | 2.880 | 0.014760 |
| 19 | PEDIATRIC NEPHROLOGY | 8,796 | 2.816 | 0.010470 |
| 20 | PEDIATRIC PULMONOLOGY | 6,746 | 2.801 | 0.010550 |

V. Ausgewählte Publikation

Received: 2 July 2019 | Revised: 24 October 2019 | Accepted: 25 October 2019

DOI: 10.1111/pai.13148

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

IgE antibody repertoire in nasal secretions of children and adults with seasonal allergic rhinitis: A molecular analysis

Sveva Castelli¹ | Stefania Arasi² | Salvatore Tripodi³ | Danilo Villalta⁴ | Paola Martelli⁴ | Mariaelisabetta Conte⁴ | Valentina Panetta⁵ | Iaria Simonelli⁵ | Alexander Rohrbach¹ | Marco Di Fraia¹ | Ifigenia Sfika³ | Valeria Villella³ | Andrea Di Rienzo Businco³ | Serena Perna¹ | Stephanie Dramburg¹ | Ekaterina Potapova¹ | Paolo Maria Matricardi¹

¹Department of Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care Medicine, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Division of Allergy, University Department of Pediatrics, Pediatric Hospital Bambino Gesù (IRCCS), Rome, Italy

³Department of Pediatrics and Pediatric Allergy Unit, Sandro Pertini Hospital, Rome, Italy

⁴Immunology and Allergy Unit, "S. Maria degli Angeli" Hospital, Pordenone, Italy

⁵L'altrastatistica srl, Consultancy & Training, Biostatistics Office, Rome, Italy

Correspondence

Paolo Maria Matricardi, Department of Paediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care Medicine, Charité Universitätsmedizin Berlin, Augustenburgerplatz, 1, 13353 Berlin, Germany.
Email: paolo.matricardi@charite.de

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Grant/Award Number: MA-4740/1-1

Editor: Ömer Kalaycı

Abstract

Background: There is growing interest both in testing IgE in nasal secretions (NS) and in molecular diagnosis of seasonal allergic rhinitis (SAR). Yet, the reliability of nasal IgE detection with the newest molecular assays has never been assessed in a large cohort of pollen allergic patients.

Objective: To investigate with microarray technology and compare the repertoires of specific IgE (sIgE) antibodies in NS and sera of a large population of children and adults with SAR.

Methods: Nasal secretions were collected with an absorbent device (Merocel 2000[®], Medtronic) and a minimal dilution procedure from 90 children and 71 adults with SAR. Total IgE (tIgE) (ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific (TFS)) and sIgE antibodies against 112 allergen molecules (ISAC-112, TFS) were measured in NS and serum.

Results: Nasal sIgE was detectable in 68.3% of the patients. The detected nasal sIgE antibodies recognized airborne (88%), vegetable (10%), and animal food or other (<1%) allergen molecules. The prevalence and average levels of sIgE in NS and serum were highly interrelated at population level. A positive nasal sIgE antibody to a given molecule predicted the detection of the same antibody in the patient's serum with a specificity of 99.7% and a sensitivity of 40%.

Conclusions: The concentration of sIgE is much lower in nasal secretions than in the serum. sIgE assays with very high analytical sensitivity and sampling methods with minimal dilution will be therefore needed to validate nasal secretions as alternative to serum in testing the sIgE repertoire.

Abbreviations: AR, Allergic rhinitis; ARIA, Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma; CI, Confidence interval; FEIA, Fluorescent enzyme immunoassay; GINA, Global Initiative for Asthma; HDM, House dust mite; ICC, Intraclass correlation; IgE, Immunoglobulin E; ImmunoCAP, Immunoassay capture test; ISAC, ImmunoCAP Solid-Phase Allergen Chip; ISU, ISAC Standardized Units; kUA/L, Kilounits/liter; NS, Nasal secretions; N-sIgE, Nasal specific IgE; Pe, Pooled estimated; SAR, Seasonal allergic rhinitis; SD, Standard deviation; sIgE, Specific Immunoglobulin E; SPT, skin prick test; tIgE, Total IgE; TPC, Total protein concentration; WNS, Weight of collected nasal secretions.

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/pai.13148>

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2019 The Authors. *Pediatric Allergy and Immunology* published by John Wiley & Sons Ltd.

Pediatr Allergy Immunol. 2020;00:1–8.

wileyonlinelibrary.com/journal/pai | 1

KEYWORDS

allergen molecules, allergic rhinitis, diagnosis, immunoglobulin E, microarray, nasal secretions, pollen allergy

1 | INTRODUCTION

There is growing interest in the examination of nasal secretions (NS) in patients affected by allergic rhinitis (AR).¹ Evidence of a local production of immunoglobulin E (IgE), the key mediator in allergic diseases, in the nasal mucosa, was first discovered in the 1970s²⁻⁴ and further investigated since then.⁵⁻⁸ More recently, the analysis of NS has been proposed as a useful non-invasive approach to AR diagnosis,⁹⁻¹¹ for definition and diagnosis of allergic rhinitis in children¹² and adults^{13,14} with no systemic IgE sensitization ("local allergic rhinitis [LAR]"), and to establish an endotype for non-allergic rhinitis (NAR).^{15,16} Moreover, nasal specific IgE (N-sIgE) has been proposed as a control parameter for the efficacy of allergen-specific immunotherapy (AIT).¹⁷⁻¹⁹ IgE testing in NS has been also suggested as a potentially beneficial non-invasive tool to identify the local onset of IgE production in small children.^{20,21}

Many efforts have been made to standardize the methodology of NS collection.¹ The list includes the collection of secretions from the nasal cavity through aspiration devices,⁹ nasal washing,⁴ and absorbent materials.^{3,10,22,23} Major targets in NS sampling are preventing dilution artefacts and minimize the patient's discomfort.¹ However, there is still no international consensus on optimal validated standards for collection, procession, and evaluation of NS.¹ Studies testing N-sIgE in AR often differ in procedures and have small population numbers. The most used extract-based singleplex IgE assays have the disadvantageous need of high sample volumes, leading to higher dilution. IgE in NS is present at quite low concentrations,²⁴ so that sample dilution often pushes them below the detection limits of classic IgE assays.²⁵

The development of microarray technologies provided a highly sensitive immunologic assay requiring only microliters of sample to test IgE specificities against large panels of allergenic molecules.²⁶ In a preliminary work, we have successfully applied this technology on NS for sIgE detection against mite molecules in patients with AR.¹⁰

We aimed the present study to investigate the repertoire of antigen-specific IgE antibodies in NS with biochip technology. We intended to characterize the local IgE reactivity profiles of allergic patients on larger scale and compare them to their serum IgE responses. To these ends, we have examined NS and sera of 161 pediatric and adult patients affected by seasonal allergic rhinitis (SAR), participating in a broader study on pollen allergy in Italy.²⁷ In more detail, we tested specific IgE reactivity to 112 allergenic molecules present on a microarray (ISAC-112TM; TFS) in their NS and sera. To our knowledge, this is the first time that local allergen-specific IgE antibodies have been assessed in NS of such a large population of AR patients using biochip technology.

Key Message

We investigated the allergen specific IgE repertoire in nasal secretions (NS) of children and adults with seasonal allergic rhinitis (SAR) with biochip technology. As a non-invasive method, IgE testing in NS could become very interesting in the diagnostic work-up of SAR, especially in pediatrics. Nasal secretions are a suitable medium for IgE-testing and reflect at population level the systemic sensitization profiles. Testing nasal IgE to allergen molecules predicted with a high specificity but low sensitivity the serum sensitization profile of a large population of SAR patients. Development of biochips with higher sensitivity could validate NS as an alternative to serum in the diagnostic of pollen allergy.

2 | METHODS

2.1 | Study design and population

Subjects were participants of an observational longitudinal clinical study, recruited in 2016 among patients affected by SAR due to pollen. Children (10-18 years) were enrolled in the Department of Pediatrics of "Sandro Pertini" Hospital in Rome (Italy), and adults (19-60 years) were enrolled in the Hospital "S.Maria degli Angeli" of Pordenone (Italy).²⁷ The recruited patients underwent interviews with standardized questionnaires, skin prick test (SPT), and blood drawing, followed by a second visit, including NS collection. A subset of patients underwent a second blood drawing, performed the same day as the NS sampling (for further details, see Methods in Appendix S1). The local ethic committees have approved the study design and procedures.

2.2 | Collection and processing of NS

Nasal secretions were collected with a sponge ("Merocel 2000[®] Kennedy Laminated Sinustent", 3.5 cm × 0.6 cm × 1.2 cm, Medtronic Xomed) (for further details, see Methods in Appendix S1).¹⁰ A novelty of this study consists in the dilution process of the NS samples. We designed a "minimal dilution method," based on the application of a different, personalized dilution factor inversely proportional to the volume of the NS collected in the individual patient, thereby getting enough sample volume for the envisaged analyses and to create a large biobank of nasal secretions from well-phenotyped AR

patients, while keeping the dilution at a minimum and maximizing test sensitivity. The dilution factors ranged from 2× (WNS \geq 700 μ L) to 10× (WNS \leq 140 μ L). We derived the concentration of proteins and IgE in the collected samples by multiplying the values measured in the diluted samples available for testing by their respective dilution factor.

2.3 | Total and specific IgE

Total IgE (tIgE) levels were measured in serum and NS with single ImmunoCAP fluorescent enzyme immunoassay (FEIA) (TFS). Specific IgE to 112 allergenic molecules was measured with a multiplex microarray (ISAC-112™, TFS) in NS and serum (for further details, see Methods in Appendix S1).

2.4 | Statistics

Statistical analyses were performed using STATA v 14 (StataCorp). A *P*-value < .05 was considered as statistically significant. Data were presented as mean (standard deviation, SD), as median (interquartile range, IQR; or min-max range, range) when continuous, and as numbers and percentage when categorical. The association between two continuous variables was established by Pearson's linear correlation coefficient or, when appropriate, by non-parametric Spearman's rho coefficient. IgE responses and levels to a given allergenic source were defined by the presence of nasal sIgE antibodies against one or more of its examined species-specific molecules (see Methods in Appendix S1).

3 | RESULTS

3.1 | Study population

We examined 161 patients with SAR: 90 children (aged 10 years-18 years) recruited in Rome and 71 adults (aged 18 years-65 years) recruited in Pordenone. About 2/3 of the patients were affected by a moderate/severe, persistent SAR in both age groups (70% and 66.7% for children and adults, respectively). Most children and a considerable proportion of adults were highly polysensitized. Timothy grass (96.7%), olive tree (90.0%), and cypress (87.8%) in Rome, and timothy grass (83.1%), Birch (56.3%), and cypress (38.0%) in Pordenone were the most frequently sensitizing pollens, tested by SPT. Since the pediatric and the adult population were recruited in two different areas, one in the center and one in the northeast of Italy, with different variety of plants and pollination seasons and concentrations, this may have affected some differences between the two population groups. Most of the children and about half of the adults were also sensitized to indoor airborne allergens (see Table S1 in Appendix S1).

TABLE 1 Characteristics of nasal secretion samples (n = 161)

| | Mean | SD | Median | Range |
|------------------------------------|-------------------|-------|--------|-----------|
| Volume (μ L) | 643 | 344.9 | 600 | 50-2233 |
| Dilution factor | 3.2 | 2.0 | 2.3 | 2-10 |
| Total protein (mg/mL) ^b | 9.2 ^a | 1.7 | 8.8 | 0.5-91.7 |
| Total IgE (kU/L) | 26.9 ^a | 2.1 | 24.1 | 8.1-211.8 |

^aGeometric mean.

^b5% of missing values.

3.2 | Characteristics of NS samples

The collected samples of NS broadly varied with regard to their volume. Based on our "minimal dilution method," the applied dilution factor changed accordingly (see Figure S1A in Appendix S1). The concentration of total protein and tIgE in NS was highly heterogeneous (Table 1). Total protein concentration (TPC) and tIgE showed both an inverse relationship with the collected volume (see Figure S1B,C and Results in Appendix S1).

3.3 | Specific IgE in NS and sera

sIgE was detected in the NS of 110/161 patients (68.3%), with a broad range of recognized molecules (1-26). By contrast, sIgE was found in the serum of all the patients except one (99.4%). The number of recognized molecules in the serum ranged from 2 to 59. Most of the detected N-sIgE antibodies were directed to airborne molecules, the most frequent being Phl p 1 (47%), Phl p 5 (33%), Cup a 1 (27%), Cyn d 1 (25.5%), and Der p 2 (25.5%), while N-sIgE antibodies to food animal molecules were detected in only one patient (Figure 1, left). The average levels of N-sIgE toward each molecule ranged between 0.2 ISU (Api m 4) and 11.5 ISU (Bet v 1) and were unrelated to the prevalence of detected responses to the respective molecule (Figure 1, right). Reflecting the trends at the molecular level, the IgE responses to airborne sources were the most frequently detected in the population, with timothy grass ranking first (51.55%), followed by house dust mites (31.06%), cypress (27.33%), bermuda grass (25.47%), and birch (22.98%) (Figure 2). The prevalence of N-sIgE against vegetable foods was below 10% for all tested molecules, N-sIgE against animal foods was sporadic (Figure 2). The overall prevalence of IgE reactivity was highest to airborne, intermediate to vegetable food, and lowest to animal food allergens, both in NS and in serum (see Table S2 in Appendix S1).

3.4 | Relationship of local vs systemic sensitization

At *population* level, the prevalence (Spearman's rho = 0.906, *P* < .001) (Figure 3A) and average levels (Spearman's rho = 0.726, *P* < .001) (Figure 3B) of the IgE responses to each of the examined 112 molecules in the 161 NS samples were highly correlated with the IgE responses observed in the 161 sera, but lower. We examined the relationship of local vs systemic sensitization *at source level*, by using

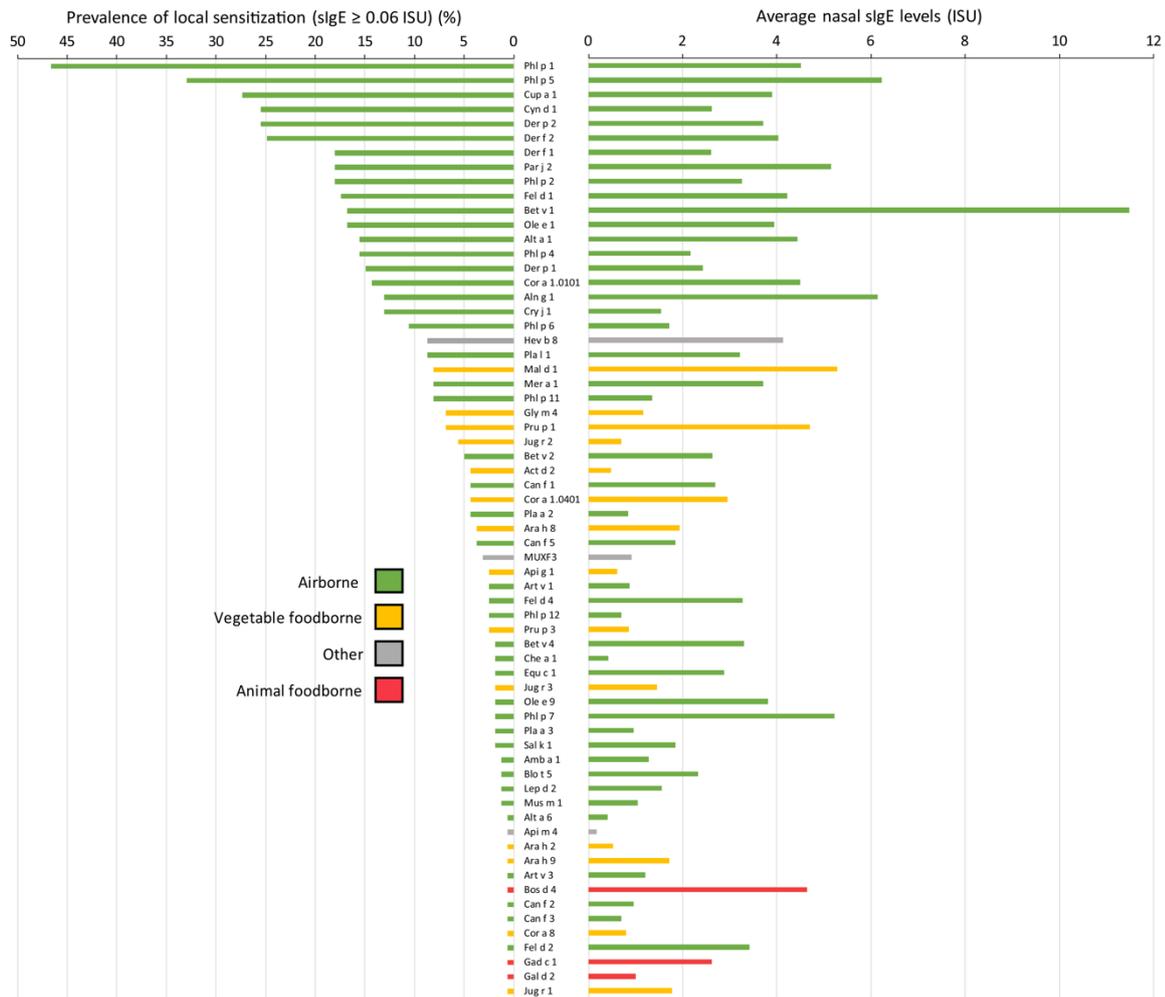


FIGURE 1 Prevalence (left) and average levels (right) of sIgE to allergen molecules in nasal secretions of 161 SAR patients. The results of molecules with at least 1 positive IgE value (≥ 0.06 ISU) are shown. Colors show the most relevant exposure route for each molecule (airborne [green], vegetable food [orange], animal food [red], other [gray])

SPT outcomes to compare NS and sera sIgE testing (see Results and Figure S2 in Appendix S1).

3.5 | Prediction of sIgE in the serum by testing sIgE in NS

When examined at *individual* level, the presence of sIgE to major allergenic molecules in NS predicted with extremely high specificity (pooled estimated (pe) = 99.7%) but with low sensitivity (pe = 40.0%) the presence in the serum of sIgE to the same molecule (Table 2). When this analysis was repeated after increasing the cutoff of serum sIgE positivity from 0.1 ISU to 3 ISU, the sensitivity of N-sIgE determination increased (pe = 53.2%), while its specificity remained extremely high (pe = 96.1%) (see Table S3 in Appendix S1). The best

performance, in terms of combination of sensitivity and specificity, of testing N-sIgE was observed at the cutoff point for serum sIgE positivity of 3 ISU (see Figure S5 in Appendix S1).

4 | DISCUSSION

We used the state of the art allergen chip technology to investigate the allergen-specific IgE repertoire in NS of adults and children with SAR. This approach could be particularly beneficial in children because of its non-invasive procedure. We found that NS, if collected and processed with the lowest possible dilution, are a suitable medium for IgE testing and reflect at population level the systemic sensitization profiles. We also found that the detection of N-sIgE antibodies to an allergen molecule predicts with absolute confidence

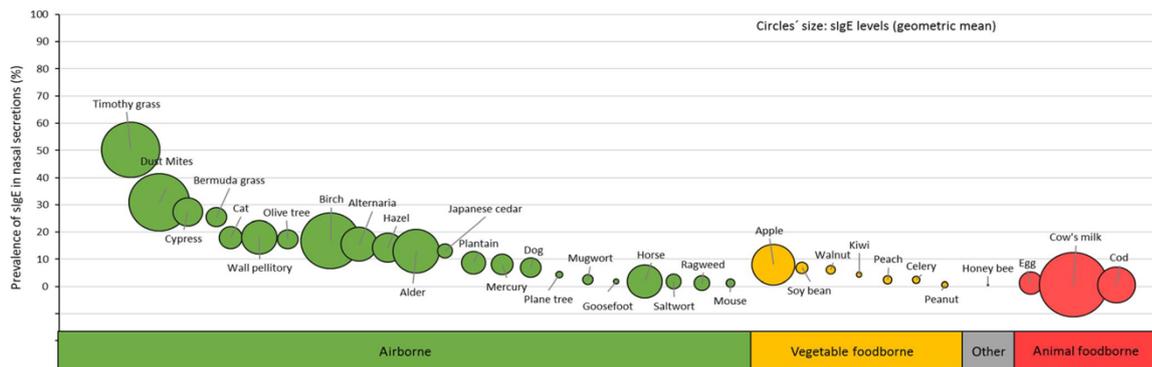


FIGURE 2 Prevalence and levels of sIgE responses to allergenic sources in the NS of 161 SAR patients. Circles show the prevalence (y-axis) and levels (diameter) of detectable sIgE responses (≥ 0.06 ISU) to allergenic sources (see Methods for definition). The exposure category to which the allergenic sources of individual molecules belong is specified: airborne (green), vegetable food (orange), animal food (red), other (gray). The values are ordered from left to right according to the prevalence in each exposure category

the presence of those antibodies in the serum. Notwithstanding, our data also suggest that sIgE detection in diluted nasal secretions with the current biochip technology is not sensitive enough to provide us with a valid and reliable substitute to the serum sIgE measurements. To our knowledge, this is the first study describing the nasal IgE repertoire to a broad range of allergenic molecules in such a large population of patients suffering from SAR.

4.1 | NS for IgE testing

Nasal IgE originate mainly from the spillover from blood, but evidence has been given that the nasal mucosa itself is a capable primary site for sIgE production.²⁴ Therefore, methods to measure allergen-specific IgE at a nasal level in patients with AR are of great interest.¹ An effective local IgE assessment could provide a non-invasive diagnostic tool for AR that would be especially advantageous in pediatrics.^{20,21} The NS collection with sinus sponges has already been successfully assessed on younger children²⁰; however, the systematic assessment of the tolerance of the procedure and the compliance of children compared to other techniques has never been done. Local sIgE detection in NS could also be an important non-invasive way to differentiate between non-allergic rhinitis and allergic rhinitis,^{15,16} especially in the absence of systemic sensitization.¹²⁻¹⁴ In our study, NS were collected from children and adults easily and without complications using an absorptive device already tested and validated.²³ We succeeded in measuring tIgE and TPC in each of the 161 samples. This outcome was facilitated by avoiding excessive dilution, which could reduce the concentration of IgE below the detection limits of immunoassays.²³ Because of the rhinorrhea characteristic of the inflammatory disease, a natural dilution is already occurring and sample dilution is not limited to the one applied by the operator during procession.²² Accordingly, the original TPC in our samples was inversely related to the amount of secretion collected, and so was the tIgE concentration (see Figure S1 in Appendix S1).

4.2 | IgE repertoire in NS and in serum

In southern Europe, patients are exposed to the simultaneous pollination of a rich variety of allergenic plants.²⁷ Hence, polysensitization to many different pollen sources is typical in patients with SAR living in these areas.²⁷ This characteristic emerged also in our study population. The repertoire of allergens recognized by IgE in the patients' secretions at a molecular (Figure 1) and source level (Figure 2) confirmed a predominance of airborne-specific molecules. This scenario was almost identical when the sera of our study population were examined (see Figures S3 and S4 in Appendix S1). The overall prevalence values (Figure 3A) and average levels (Figure 3B) of N-sIgE, respectively, showed a very good correlation with those found in the sera, although both were consistently lower in the NS. Similarly, the prevalence of IgE antibodies to allergen sources in the NS was highly related, although at lower values, to that of positive SPT to the same sources (see Figure S2 in Appendix S1). Interestingly, a few patients showed moderate to high levels of IgE to milk, egg, or cod fish molecules, indicating that the IgE repertoire of the NS is not limited to airborne molecules. We are prompted to speculate that the IgE repertoire of NS of young infants with cow milk, egg, or other food allergies is mostly dominated by those animal food allergens. The presence of IgE to animal foods has been already described in the nasal mucosa,²⁸ but this aspect remains quite open for further investigations.

4.3 | Testing sIgE in NS

No sIgE was detected with the ISAC test in nasal secretions of almost 1/3 (31.3%) of our pollen allergic patients, while their sera were positive to the same ISAC test. Accordingly, the sensitivity of testing IgE in the NS in predicting the presence of IgE to the respective molecule in the serum was quite low for all the examined molecules (overall estimate of sensitivity = 40%). However, the specificity and the positive predictive value were extremely high. Data about the N-sIgE presence among patients

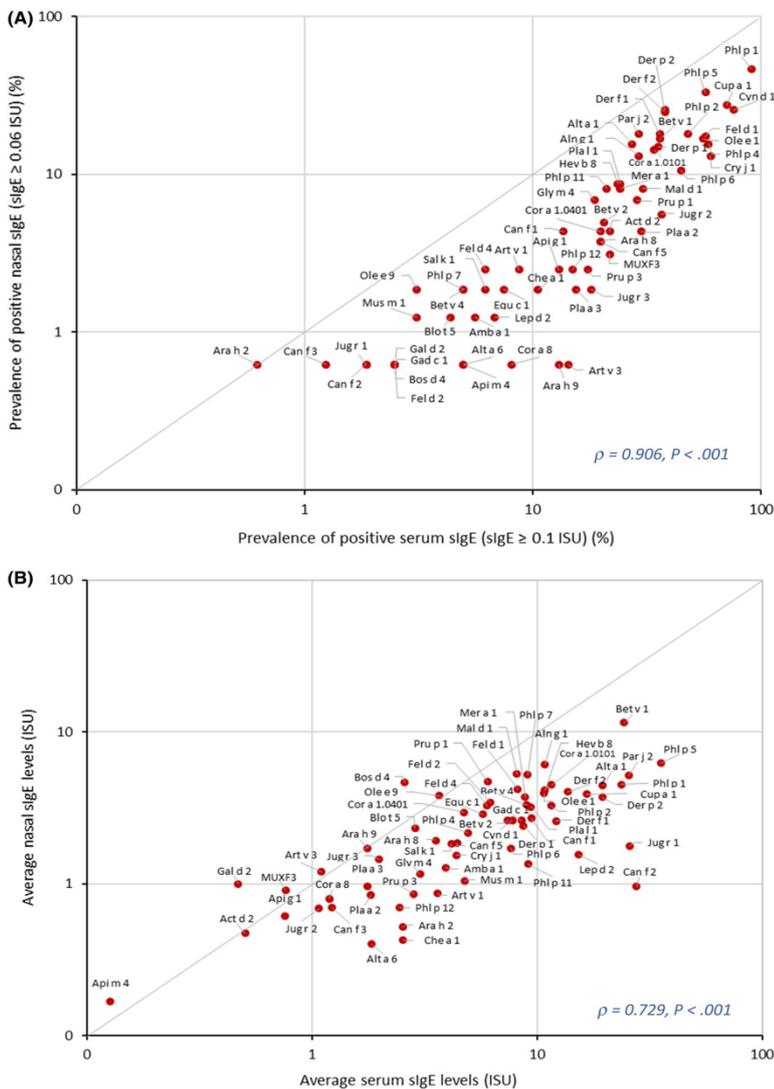


FIGURE 3 Relationship between prevalence (A) and average levels (B) of sIgE antibodies to allergen molecules in 161 patients with SAR. Of the 112 tested molecules, only the molecules with at least 1 positive value (sIgE \geq 0.06 ISU in nasal secretions and \geq 0.1 ISU in serum) are shown. The Spearman rank correlation coefficients and the respective *P* values are shown. The identity line is shown in both panels

with positive serum sIgE are extremely variable between one study and another, with reported sensitivity values from 0% to 100%. This could partly be due to the relatively small study population size,¹¹ to the diversity in collection and procession methods,¹ or the sensitivity of the IgE assays. We hypothesize that the low sensitivity of testing IgE in NS is, in our study population, mostly because, even in a condition of minimal dilution, the concentration of sIgE in NS is too low to be detected by the test we have used. Moreover, the presence and levels of local specific IgE could have been affected by the period and area of sampling, since allergen exposure stimulates the production of sIgE at nasal level. In a previous study, which pioneered the use of the allergen biochip on NS of 30 patients severely allergic to house dust mites (HDM) and 29 healthy, non-atopic controls, N-sIgE to selected major HDM molecules was detected with a good sensitivity compared to the serum sIgE reactivity.¹⁰

Here, we examined the sIgE to a large panel of allergen molecules in a population of AR patients only, with different levels of atopic sensitization. Therefore, the two studies had different targets, study designs, and reagents. Testing IgE to 112 different allergen molecules in the NS of 161 AR patients predicted with high specificity but low sensitivity the serum sIgE responses (Table 2). In our population, testing nasal specific IgE could not be satisfactorily applied as a diagnostic test for allergen sensitization.

4.4 | Limitations

We have to acknowledge some limitations of our study. First, the serum and NS of the patients were collected at two different time points. However, the tIgE and sIgE outcomes in sera obtained the very same day

TABLE 2 Prediction of serum IgE responses by testing IgE in nasal secretions in 161 patients with SAR with a serum cutoff of 0.1 ISU

| | Sensitivity | Specificity | Accuracy | PPV | NPV |
|---------------------------------|-------------|-------------|----------|-----|-----|
| | % | % | % | % | % |
| Allergen molecules ^a | | | | | |
| Phl p 1 | 51 | 100 | 55 | 100 | 15 |
| Phl p 5 | 58 | 100 | 76 | 100 | 64 |
| Cup a 1 | 38 | 100 | 55 | 100 | 38 |
| Cyn d 1 | 33 | 100 | 49 | 100 | 32 |
| Der p 2 | 66 | 99 | 86 | 98 | 82 |
| Der f 2 | 62 | 98 | 84 | 95 | 81 |
| Par j 2 | 58 | 100 | 87 | 100 | 84 |
| Fel d 1 | 30 | 100 | 60 | 100 | 51 |
| Phl p 2 | 36 | 99 | 68 | 97 | 62 |
| Der f 1 | 49 | 100 | 81 | 100 | 77 |
| Ole e 1 | 30 | 100 | 60 | 100 | 52 |
| Bet v 1 | 30 | 83 | 53 | 100 | 43 |
| Alt a 1 | 55 | 99 | 87 | 96 | 85 |
| Phl p 4 | 25 | 98 | 55 | 96 | 47 |
| Der p 1 | 42 | 100 | 80 | 100 | 76 |
| Cor a 1.0101 | 41 | 100 | 80 | 100 | 76 |
| Cry j 1 | 22 | 100 | 52 | 100 | 44 |
| Aln g 1 | 45 | 100 | 84 | 100 | 81 |
| Phl p 6 | 23 | 100 | 65 | 100 | 61 |
| Pla l 1 | 35 | 100 | 84 | 100 | 82 |
| Hev b 8 | 37 | 100 | 85 | 100 | 84 |
| Mal d 1 | 26 | 100 | 77 | 100 | 75 |
| Mer a 1 | 33 | 100 | 84 | 100 | 82 |
| Phl p 11 | 34 | 99 | 85 | 92 | 84 |
| Gly m 4 | 28 | 98 | 84 | 82 | 85 |
| Pru p 1 | 21 | 99 | 76 | 91 | 75 |
| Pooled estimate | 40 | 99.7 | | | |

^aOnly molecules with at least 10 subjects who had a molecule-specific IgE response were considered for this analysis.

of NS collection in a nested study of 21 patients were highly related to those obtained at the recruitment visit (Pearson's $r = .92$, $P < .001$; and ICC = 0.79, 95% CI = 0.77-0.81, respectively) and had a similar predictive capacity in relation to the serum sIgE outcomes (see Table S4 in Appendix S1). Second, since the local IgE detection can be highly influenced by environmental condition, and the moment of the NS collection did not always cover all the pollination seasons or peaks of the allergens the patients where sensitized to, this could have affected the results. Third, we used one single microarray commercial method to test sIgE antibodies and cannot extend our conclusions to all other techniques currently available.

4.5 | Conclusions

Our study shows that the concentration of sIgE is much lower in nasal secretions than in the serum. Consequently, sIgE assays with

very high analytical sensitivity and sampling methods with minimal dilution will be therefore needed before nasal secretions can be validated as alternative to serum in testing the sIgE repertoire in patients with seasonal allergic rhinitis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Theresa Lipp for revising the English language. We thank Floriana Tulli, Giuseppina Di Francia, and all the study nurses for their contribution to the study.

CONFLICT OF INTEREST

P. M. Matricardi is a consultant for Hycor, Euroimmun, and Novartis; has received research funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (grant no. MA-4740/1-1), Hycor Biomedical, and Euroimmun and reagents for research from Thermo Fisher; and receives speaker's fees from Euroimmun, Thermo Fisher

Scientific, Stallergenes-Greer, and HAL Allergy. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

ORCID

Sveva Castelli  <https://orcid.org/0000-0001-7660-5354>
 Stefania Arasi  <https://orcid.org/0000-0002-8135-0568>
 Salvatore Tripodi  <https://orcid.org/0000-0003-2517-3285>
 Danilo Villalta  <https://orcid.org/0000-0003-4085-9218>
 Valentina Panetta  <https://orcid.org/0000-0001-6058-5045>
 Alexander Rohrbach  <https://orcid.org/0000-0002-5089-4909>
 Serena Perna  <https://orcid.org/0000-0002-8892-3955>
 Stephanie Dramburg  <https://orcid.org/0000-0002-9303-3260>
 Ekaterina Potapova  <https://orcid.org/0000-0003-4427-6335>
 Paolo Maria Matricardi  <https://orcid.org/0000-0001-5485-0324>

REFERENCES

- Castelli S, Arasi S, Pawankar R, Matricardi PM. Collection of nasal secretions and tears and their use in allergology. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018;18:1-9.
- Tse KS, Wicher K, Arbesman CE. IgE antibodies in nasal secretions of ragweed-allergic subjects. *J Allergy*. 1970;46:352-357.
- Huggins KG, Brostoff J. Local production of specific IgE antibodies in allergic-rhinitis patients with negative skin tests. *Lancet*. 1975;2:148-150.
- Platts-Mills TA. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. *J Immunol*. 1979;122:2218-2225.
- Smurthwaite L, Walker SN, Wilson DR, et al. Persistent IgE synthesis in the nasal mucosa of hay fever patients. *Eur J Immunol*. 2001;31:3422-3431.
- Coker HA, Durham SR, Gould HJ. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J Immunol*. 2003;171:5602-5610.
- Rondon C, Romero JJ, Lopez S, et al. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:899-905.
- Takhar P, Smurthwaite L, Coker HA, et al. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J Immunol*. 2005;174:5024-5032.
- Sakaida H, Masuda S, Takeuchi K. Measurement of Japanese cedar pollen-specific IgE in nasal secretions. *Allergol Int*. 2014;63:467-473.
- Berings M, Arasi S, De Ruyck N, et al. Reliable mite-specific IgE testing in nasal secretions by means of allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):301.e8-303.e8.
- Meng Y, Lou H, Wang Y, Wang C, Zhang L. The use of specific immunoglobulin E in nasal secretions for the diagnosis of allergic rhinitis. *Laryngoscope*. 2018;128:E311-E315.
- Zicari AM, Occasi F, Di Fraia M, et al. Local allergic rhinitis in children: novel diagnostic features and potential biomarkers. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30:329-334.
- Campo P, Del Carmen Plaza-Seron M, Eguluz-Gracia I, et al. Direct intranasal application of the solid phase of ImmunoCAP(R) increases nasal specific immunoglobulin E detection in local allergic rhinitis patients. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018;8:15-19.
- Fuiano N, Fusilli S, Incorvaia C. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of *Alternaria*-induced rhinitis in children. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012;40:71-74.
- Becker S, Rasp J, Eder K, Berghaus A, Kramer MF, Groger M. Non-allergic rhinitis with eosinophilia syndrome is not associated with local production of specific IgE in nasal mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273:1469-1475.
- Segboer CL, Fokkens WJ, Terreehorst I, van Drunen CM. Endotyping of non-allergic, allergic and mixed rhinitis patients using a broad panel of biomarkers in nasal secretions. *PLoS ONE*. 2018;13:e0200366.
- Bozek A, Kolodziejczyk K, Jarzab J. Efficacy and safety of birch pollen immunotherapy for local allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;120:53-58.
- Shamji MH, Kappen J, Abubakar-Waziri H, et al. Nasal allergen-neutralizing IgG4 antibodies block IgE-mediated responses: novel biomarker of subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143:1067-1076.
- Shamji MH, Kappen JH, Akdis M, et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*. 2017;72:1156-1173.
- Ahn JY, Hong SJ, Choi BS. Clinical evaluation of techniques for measuring nasal-specific immunoglobulin e in pediatric patients. *J Korean Med Sci*. 2017;32:2005-2008.
- Colavita L, Catalano N, Sposito G, et al. Local allergic rhinitis in pediatric patients: is IgE dosage in nasal lavage fluid a useful diagnostic method in children? *Int J Mol Cell Med*. 2017;6:174-182.
- Riechelmann H, Deutschle T, Friemel E, Gross HJ, Bachem M. Biological markers in nasal secretions. *Eur Respir J*. 2003;21:600-605.
- Watelet JB, Gevaert P, Holtappels G, Van Cauwenberge P, Bachert C. Collection of nasal secretions for immunological analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2004;261:242-246.
- Dullaers M, De Bruyne R, Ramadan F, Gould HJ, Gevaert P, Lambrecht BN. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:635-645.
- Rondon C, Dona I, Lopez S, et al. Seasonal idiopathic rhinitis with local inflammatory response and specific IgE in absence of systemic response. *Allergy*. 2008;63:1352-1358.
- Lupinek C, Wollmann E, Baar A, et al. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods*. 2014;66:106-119.
- Di Fraia M, Arasi S, Castelli S, et al. A new molecular multiplex IgE assay for the diagnosis of pollen allergy in Mediterranean countries: a validation study. *Clin Exp Allergy*. 2019;49:341-349.
- Reisacher WR. Detecting local immunoglobulin E from mucosal brush biopsy of the inferior turbinates using microarray analysis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3:399-403.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Castelli S, Arasi S, Tripodi S, et al. IgE antibody repertoire in nasal secretions of children and adults with seasonal allergic rhinitis: A molecular analysis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020;00:1-8. <https://doi.org/10.1111/pai.13148>

IgE repertoire in nasal secretions of children and adults with seasonal allergic rhinitis: a molecular analysis.

Sveva Castelli,^a Stefania Arasi, MD,^b Salvatore Tripodi, MD,^c Danilo Villalta,^d MD, Paola Martelli, MD,^d Mariaelisabetta Conte, MD,^d Valentina Panetta, MSc,^e Ilaria Simonelli,^e Alexander Rohrbach,^a Marco Di Fraia, MD,^a Ifigenia Sfika, MD,^c Valeria Vilella, MD,^c Andrea Di Rienzo Businco, MD,^c Serena Perna, MSc,^a Stephanie Dramburg, MD,^a Ekaterina Potapova, MS,^a and Paolo Maria Matricardi, MD^{a*}

From the:

^a Department of Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care Medicine, Charité Medical University, Berlin, Germany

^b Division of Allergy, University Department of Pediatrics, Pediatric Hospital Bambino Gesù (IRCSS), Rome, Italy

^c Department of Pediatrics and Pediatric Allergy Unit, Sandro Pertini Hospital, Rome, Italy

^d Immunology and Allergy Unit, "S.Maria degli Angeli" Hospital, Pordenone, Italy

^e L'altrastatistica srl, Consultancy & Training, Biostatistics Office, Rome, Italy

Word count: 1818

Tables: 6

Figures: 5

***Corresponding author:**

Paolo M. Matricardi

Dept. of Paediatric Pneumology and Immunology and Intensive Care Medicine

Charité Medical University

Augustenburgerplatz, 1

13353 Berlin, Germany

+49 30 450 566 406

+49 30 450 566 931

paolo.matricardi@charite.de

Methods

Study design and population - Allergic rhino-conjunctivitis symptoms were assessed according to the validated International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) protocol.^{E1} The severity of the allergic rhinitis was defined according to ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) international criteria.^{E2} ^{E3} Co-morbidities were evaluated and the severity of asthma was assessed with the diagnostic criteria of the Global Initiative for Asthma (GINA).^{E4}

Skin-prick tests - SPT were performed with a standard panel of 16 commercial extracts (ALK-Abelló, Italy) including timothy grass, olive, cypress, mugwort, pellitory, birch, hazel, ragweed, alternaria, plane tree, Russian thistle, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blatta germanica*, Bermuda grass, cat, and dog epithelium. Positive control was Histamine 0.1 mg/ml; negative control was glycerol solution. Morrow-Brown needles were used to prick the skin and the dimension of the wheal reactions was measured after 15 min. An average wheal diameter >3 mm after subtraction of the negative control was considered positive.^{E5}

Collection and processing of nasal secretions: NS were collected with a sponge ("Merocel 2000® Kennedy Laminated Sinustent", dressing 3.5 cm * 0.6 cm * 1.2 cm Medtronic Xomed, Inc Jacksonville FL USA 32216), as previously described.^{E6} The sponges were sealed in pairs in 15 ml tubes (Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) and weighted before the sampling process.^{E7} The patient was asked to blow his/her nose beforehand to remove any mucus and impurities adhering to the nasal mucosa. Under direct vision, the examiner inserted one sponge into each of the nasal cavities via the patient's nostrils and placed them along the anterior third of the nasal septum, where they were left for 5 minutes. After removal, both sponges were placed back in the Falcon tube and weighed again. The weight of collected NS (WNS) was determined by comparison of the weights of the sponges in their respective tubes before and after collection, the volume was derived by assuming a specific liquid weight of 1 g/ml. To mobilize the nasal fluid out of the sponge, a case-specific amount of physiologic saline solution (0,9% NaCl) was added, following our '*minimal dilution method*', based on the application of a personalized dilution factor inversely proportional to the volume of the NS collected in the individual patient. This method was designed in order to get enough sample volume for the envisaged analyses without using excessive dilution that lowers test sensitivity. The dilution factors ranged from 2x (WNS \geq 700 μ l) to 10x (WNS \leq 140 μ l). The procedure required the application of a minimum dilution of 1:2 in order to mobilize the fluid from the sponges and avoid insufficient fluid recovery. After the addition of saline solution, the devices were placed in the shaft of a 5ml syringe (Becton-Dickinson S.A.), and the liquid was squeezed into the tube using the piston of the syringe. At last, tubes were centrifuged at 3000 rpm and 4°C for 10min and the supernatants collected and stored in aliquots at -20°C until analysis. We assumed that no selective loss of mediators (total proteins, IgE) occurred in the collection procedure. Therefore, we derived the concentration of proteins and IgE in the collected samples by

multiplying the values measured in the diluted samples available for testing by their respective dilution factor.

Total protein - Total protein concentrations in NS were measured by the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce™, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), as previously described.^{E8} Briefly, the samples were incubated with BCA reagent at 37° for 30min, then cooled to room temperature. The absorbance was read at the wavelength of 562 nm. The working range of the assay was 20-2000 µg/ mL. BSA (bovine serum albumin) was used as the standard.

Total IgE - Total IgE (tIgE) levels were measured in the serum and nasal secretions with ImmunoCAP Fluorescence Enzyme Immuno-Assay (FEIA) (TFS, Uppsala, Sweden).^{E9} The results were expressed in kU/L and the detection range was 2–2000 kU/l.

Determination of sIgE in nasal secretions and sera - The allergen-chip (ISAC-112™, TFS, Uppsala, Sweden) contains either highly purified natural or recombinant allergen components. The test was performed following the manufacturer's recommendations, as previously described.^{E10} The microarray slides were washed in TBS-T buffer (150 mM sodium chloride, 10 mM Tris base, and 0.5% Tween 20, pH 8.0) and then 20 µl of undiluted patient's serum or of patient nasal fluid was applied directly to the individual reaction sites of the microarray. After incubation in a humid chamber for 120min, excess serum or nasal fluid was removed by a washing step in TBS-T buffer and 20 µl of fluorescence-labelled anti-human IgE detection antibody were applied. After a 60min staining reaction and a second washing step to remove unbound detection antibody, the slides were scanned in an appropriate microarray scanner (CapitalBio LuxScan-10K/A). Allergens become visible in a false color display mode. Results were evaluated using Phadia Microarray Image Analysis software and expressed in semi-quantitative ISAC Standardized Units (ISU) obtained by comparing the patient outcomes with those of calibrations curve, with a cutoff of 0.06 ISU in nasal secretions and 0.1 ISU in serum as already validated in our previous study.^{E6} Finally, the original concentration of proteins, tIgE and sIgE in the collected, still undiluted secretions, was obtained by multiplying the actual measured levels by the individually applied dilution factor.

Statistics - To better analyze the dependence of the Total Protein Concentration (TPC) and tIgE on the collected volume of nasal secretions, a linear regression spline was applied. The knot was detected by the inspection of the scatter plot between the analyzed protein and volume and fixed at 500 µl. Each model was realized after the elimination of the respective outliers, individuated on the basis of a DF BETA [for further details see **Results**]. To evaluate the reliability in the test-retest of the total IgE levels in sera at T0 and at T1, the Intraclass correlation coefficient (ICC) was calculated with the corresponded Confidence Interval at 95% (CI). The overall concentration of IgE antibodies to airborne, vegetable foodborne, and animal foodborne allergens were calculated in each participant by adding-up the positive levels of IgE antibodies for each of

the molecules belonging to the respective category, both in nasal secretions and serum. Results obtained at a molecular level were also used to analyze outcomes at the source level. Highly cross-reacting molecules (PR-10 molecules, profilin, serum albumin) have been excluded, with some exception (Bet v 1, marker of sensitization to birch pollen, and others). Overall, analyses at the source level included 86 molecules and 45 sources (storage mites and House dust mites were considered as one source) [Table E5]. The IgE concentration to each allergenic source was calculated by adding-up the positive levels of IgE antibodies to each of the non-cross-reactive molecules belonging to that allergenic source. The geometric mean (95% Confidence interval, CI) of these values was obtained. To compare the prevalence of IgE responses to 3 allergenic categories (animal foodborne, vegetable foodborne, and airborne allergens) in both nasal secretions and serum, the mean prevalence (and its SD) of IgE responses to the allergenic molecules within the 3 allergenic categories were calculated. These mean values were then compared, and a P value was estimated by using a mixed logistic model in which subjects accounted for the random effects. A linear mixed regression model was used to evaluate the trend of IgE levels across the three categories of exposure, in both nasal secretions and serum. Considering each molecule as a binary diagnostic test based on sIgE cut-off in the nasal secretions (≥ 0.06 ISU), its performance in identifying positive patients for sIgE in the serum was calculated, in terms of sensitivity and specificity, varying the sIgE cut-off in the serum at 0.05, 0.1, 0.3, 0.6, 1, 2 and 3 ISU. To obtain a pooled sensitivity and specificity from each molecule, hierarchical logistic regression model was used for meta-analysis of diagnostic test accuracy.

Results

Minimal dilution method – Following the protocol of ‘minimal dilution method’, we applied a case-specific amount of saline solution to each NS sample accordingly to its collected volume [Figure E1A]. Overall, 7/161 (4.3%) of our samples were diluted with saline with the maximal allowed dilution (10x), 69/161 (42.8%) with minimal allowed dilution (2x) and 112/161 (52.9%) with dilution factors ranging from 2 to 10.

Inverse association of TPC and collected volume - A linear regression spline model was applied to describe the dependence of TPC on NS volume. The model applied to all 161 patients shows that for a volume < 500 μl , the estimated mean of TPC significantly decreases by -0.0021 (95% Confidence Interval, CI $= -0.0028$ to -0.0014 ; $p < 0.001$) for each 1 μl increase in volume of the nasal secretion. For a volume > 500 μl , the estimated mean of TPC significantly decreases by -0.0003 (95% CI $= -0.0006$ to -0.00004 ; $p = 0.027$) and for a volume equal of 500 μl the predicted TPC was equal to 8.52 mg/ml (95% CI 7.64 - 9.50 mg/ml). Considering all patients the model explained 34% of variability of TPC ($R^2 = 0.34$). On the basis of DF BETA, we individuated 5 outliers that showed a DF BETA higher than $2/\sqrt{\text{total sample}}$. We excluded these patients in the model in Figure E1B. This model explained 62% of the variability of TPC ($R^2 = 0.62$).

Inverse association of tIgE and collected volume – A linear regression spline model was applied to describe the dependence of nasal tIgE on NS volume. The model applied to all 161 subjects showed a coefficient of determination (R^2) =0.12, indicating that 12% of the variability of tIgE was explained by this model. On the basis of DF BETA, we individuated 13 influencing patients that showed a DF BETA higher than $2/\sqrt{\text{total sample}}$. We excluded these patients in the model in **Figure E1C**. The R^2 improved and was equal to 0.23. These excluded subjects showed higher nasal specific IgE activity compared to the included patients [**Table E6**].

Relationship of local vs systemic sensitization: The prevalence of systemic sensitization to 15 airborne allergenic sources, as shown by SPTs, was highly correlated to the prevalence of sIgE antibodies in both NS (Spearman's $\rho = 0.871$, $p < 0.001$) [**Figure E2A**] and sera (Spearman's $\rho = 0.946$, $p < 0.001$) [**Figure E2B**]. However, the prevalence of positive SPT was underestimated by N-sIgE testing, while it was fairly well predicted by Serum-sIgE testing.

Reproducibility of total IgE and sIgE determination over time - Serum total IgE levels and the repertoire of sIgE were tested twice, once at the time of the initial examination and once at the time of the collection of the nasal secretions, in 21 patients. An excellent correlation was found between the serum sIgE levels to the 112 molecules in the two blood samples, with an intraclass correlation coefficient (ICC) of 0.79 (95% CI = 0.77-0.81). In addition, the correlation between tIgE levels was excellent (Pearson's $r=0.92$, $p<0.001$). The values of pooled estimated sensitivity (z test $p=0.916$) and specificity (z test $p=0.449$) obtained in testing the nasal secretions and concomitant collected sera of the 21 patients did not significantly differ from the values of obtained in the total population [**Table E4**]. Based on these results we considered that this limitation could not significantly affect our results.

References

- E1 – Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006; 368:733-43.
- E2 - Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:466-76.
- E3 - Jauregui I, Davila I, Sastre J, Bartra J, del Cuvillo A, Ferrer M, et al. Validation of ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) classification in a pediatric population: the PEDRIAL study. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22:388-92.
- E4 - Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31:143-78.
- E5 - Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012; 67:18-24.
- E6 - Berings M, Arasi S, De Ruyck N, Perna S, Resch Y, Lupinek C, et al. Reliable mite-specific IgE testing in nasal secretions by means of allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol* 2017.
- E7 - Watelet JB, Gevaert P, Holtappels G, Van Cauwenberge P, Bachert C. Collection of nasal secretions for immunological analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261:242-6.
- E8 - Heikkinen T, Shenoy M, Goldblum RM, Chonmaitree T. Quantification of cytokines and inflammatory mediators in samples of nasopharyngeal secretions with unknown dilution. *Pediatr Res* 1999; 45:230-4.
- E9 - Matricardi PM, Bockelbrink A, Gruber C, Keil T, Hamelmann E, Wahn U, et al. Longitudinal trends of total and allergen-specific IgE throughout childhood. *Allergy* 2009; 64:1093-8.
- E10 - Van Hage M, Schmid-Grendelmeier P, Skevaki C, Plebani M, Canonica W, Kleine-Tebbe J, et al. Performance evaluation of ImmunoCAP(R) ISAC 112: a multi-site study. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55:571-7.

TABLE E1. Characteristics of study populations

| | ROME (n= 90)[†] | | PORDENONE (n=71)[†] | |
|---|---------------------------------|--------|-------------------------------------|------------|
| Male | 57 | 63.3 | 42 | 59.1 |
| Age (y) (mean, SD) | 14 | 2.9 | 35 | 14.5 |
| Allergic rhinitis | | | | |
| Age at onset (y) (median, IQR) | 6 | (4-8) | 17 | (9.5-25.5) |
| ARIA classification (n,%) | | | | |
| Mild Intermittent | 6 | 6.7 | 2 | 2.9 |
| Mild Persistent | 17 | 18.9 | 9 | 13.0 |
| Mod./Severe Intermittent | 4 | 4.4 | 12 | 17.4 |
| Mod./Severe Persistent | 63 | 70.0 | 46 | 66.7 |
| Allergic asthma | | | | |
| Age at onset (median, IQR) | 8 | (3-10) | 15 | (12-29) |
| Other allergic comorbidities (n,%) | | | | |
| Oral Allergic Syndrome | 29 | 32.2 | 18 | 25.3 |
| Urticaria/Angioedema | 16 | 17.7 | 6 | 8.5 |
| Atopic Dermatitis | 25 | 27.8 | 10 | 14.1 |
| Gastro-intestinal disorders | 3 | 3.3 | 0 | 0.0 |
| Anaphylaxis episode | 8 | 8.9 | 1 | 1.4 |
| Skin Prick Test positivity (≥3 mm) | | | | |
| Outdoor airborne allergens (n,%) | | | | |
| Timothy grass | 87 | 96.7 | 59 | 83.1 |
| Bermuda grass | 81 | 90.0 | 29 | 40.8 |
| Olive tree | 79 | 87.8 | 26 | 36.6 |
| Cypress | 75 | 83.3 | 27 | 38.2 |
| Birch | 42 | 46.7 | 40 | 56.3 |
| Hazel | 41 | 45.6 | 27 | 38.0 |
| Wall pellitory | 62 | 68.8 | 3 | 4.2 |
| Plane tree | 54 | 60.0 | 6 | 8.5 |
| Alternaria | 44 | 48.9 | 10 | 14.1 |
| Russian thistle | 40 | 44.4 | 2 | 2.8 |
| Mugwort | 32 | 35.6 | 10 | 14.1 |
| Ragweed | 32 | 35.6 | 6 | 8.5 |
| Indoor airborne allergens (n,%) | | | | |
| House Dust Mite | 65 | 72.2 | 29 | 40.8 |
| Cat dander | 65 | 72.2 | 24 | 33.8 |
| Dog dander | 71 | 78.9 | 5 | 7.0 |

[†] Sporadic missing values for each of the variable examined.

TABLE E2. Average prevalences of nasal and serum IgE responses to allergens per category in 161 SAR patients

| | | oral vs inhaled route | amount | n of molecules [†] | Prevalence of IgE * | | | | | |
|---|---------------------|-----------------------|--------------|-----------------------------|---------------------|------|----------------------|----------|------|----------------------|
| | | | | | Nasal secretions | | p value [^] | Serum | | p value [^] |
| | | | | | mean (%) | SD | | mean (%) | SD | |
| 1 | airborne | inhaled | high | 45 | 9.8 | 10.8 | <0.001 | 26.3 | 23.9 | <0.001 |
| 2 | vegetable foodborne | oral | intermediate | 22 | 1.1 | 2.2 | reference category | 7.4 | 10.9 | reference category |
| 3 | animal foodborne | oral | low | 10 | 0.2 | 0.3 | 0.003 | 2.2 | 1.3 | <0.001 |

* average (\pm SD) prevalence of detected IgE (≥ 0.06 ISU in nasal secretions; ≥ 0.1 ISU in serum) to each of the molecules in the category

[^] calculated by two level mixed logistic regression

[†] Selected molecules for each category:

1. *Phl p 1, Phl p 11, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6; Der f1, Der f2, Der p 1, Der p 2, Blo t 5, Lep d 2; Cup a 1; Cyn d 1; Bet v 1; Fel d 1, Fel d 4; Par j 2; Ole e 1, Ole e 9; Alt a 1, Alt a 6; Cor a 1.0101; Aln g 1; Cry j 1; Pla l 1; Mer a 1; Can f1, Can f2, Can f5; Pla a 1, Pla a 2; Art v 1;*

2. *Mal d 1; Ber e 1; Ana o 2; Pru p 3; Gly m 5, Gly m 6; Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6; Cor a 9; Jug r 1, Jug r 2; Act d 1, Act d 2, Act d 5; Api g 1; Ses i 1;*

3. *Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3; Bos d 4, Bos d 5, Bos d 8, Bos d Lactoferrin; Gad c 1; Pen m 2, Pen m 4*

TABLE E3. Prediction of serum IgE responses by testing IgE in nasal secretions in 161 patients with SAR with a serum cut-off of 3 ISU

| | Sensitivity | Specificity | Accuracy | PPV | NPV |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------|------------|
| | % | % | % | % | % |
| Allergen molecules ~ | | | | | |
| Phl p 1 | 63 | 88 | 71 | 92 | 52 |
| Phl p 5 | 64 | 95 | 80 | 92 | 74 |
| Cup a 1 | 49 | 95 | 72 | 91 | 65 |
| Cyn d 1 | 48 | 88 | 73 | 71 | 73 |
| Der p 2 | 84 | 97 | 94 | 93 | 94 |
| Der f 2 | 83 | 95 | 92 | 85 | 94 |
| Par j 2 | 68 | 98 | 91 | 90 | 91 |
| Fel d 1 | 48 | 96 | 81 | 86 | 80 |
| Phl p 2 | 43 | 94 | 78 | 76 | 78 |
| Der f 1 | 63 | 98 | 89 | 93 | 88 |
| Ole e 1 | 44 | 95 | 80 | 78 | 80 |
| Bet v 1 | 53 | 98 | 85 | 93 | 84 |
| Alt a 1 | 59 | 98 | 89 | 92 | 88 |
| Phl p 4 | 44 | 95 | 81 | 76 | 82 |
| Der p 1 | 50 | 96 | 85 | 79 | 86 |
| Cor a 1.0101 | 54 | 98 | 88 | 87 | 88 |
| Cry j 1 | 37 | 95 | 80 | 71 | 81 |
| Aln g 1 | 64 | 98 | 92 | 86 | 93 |
| Phl p 6 | 32 | 96 | 81 | 71 | 83 |
| Pla l 1 | 53 | 97 | 92 | 64 | 95 |
| Hev b 8 | 50 | 97 | 91 | 64 | 94 |
| Mal d 1 | 38 | 98 | 88 | 77 | 89 |
| Mer a 1 | 44 | 97 | 91 | 62 | 93 |
| Phl p 11 | 48 | 98 | 91 | 77 | 93 |
| Gly m 4 | 45 | 96 | 93 | 45 | 96 |
| Pru p 1 | 25 | 96 | 87 | 45 | 90 |
| Pooled estimate | 53.2 | 96.1 | | | |

~ Only molecules with at least 10 subjects who had a molecule-specific IgE response were considered for this analysis.

TABLE E4. Prediction of serum IgE responses by testing IgE in nasal secretions in 21 patients with SAR with a serum cut-off of 0.1 ISU

| | Sensitivity | Specificity | Accuracy | PPV | NPV |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------|------------|
| | % | % | % | % | % |
| Allergen molecules | | | | | |
| Phl p 1 | 53 | 100 | 62 | 100 | 33 |
| Phl p 5 | 45 | 90 | 67 | 83 | 60 |
| Cup a 1 | 20 | 100 | 62 | 100 | 58 |
| Cyn d 1 | 25 | 89 | 52 | 75 | 47 |
| Der p 2 | 50 | 93 | 81 | 75 | 82 |
| Der f 2 | 50 | 93 | 81 | 75 | 82 |
| Par j 2 | 0 | 100 | 90 | ∞ | 90 |
| Fel d 1 | 40 | 100 | 71 | 100 | 65 |
| Phl p 2 | 20 | 91 | 57 | 67 | 56 |
| Der f 1 | 67 | 100 | 90 | 100 | 88 |
| Ole e 1 | 23 | 100 | 52 | 100 | 44 |
| Bet v 1 | 56 | 100 | 81 | 100 | 75 |
| Alt a 1 | 50 | 100 | 90 | 100 | 89 |
| Phl p 4 | 25 | 92 | 67 | 67 | 67 |
| Der p 1 | 60 | 100 | 90 | 100 | 89 |
| Cor a 1.0101 | 50 | 100 | 81 | 100 | 76 |
| Cry j 1 | 30 | 100 | 67 | 100 | 61 |
| Aln g 1 | 44 | 100 | 76 | 100 | 71 |
| Phl p 6 | 0 | 92 | 57 | 0 | 60 |
| Pla l 1 | 43 | 100 | 81 | 100 | 78 |
| Hev b 8 | 40 | 100 | 86 | 100 | 84 |
| Mal d 1 | 38 | 100 | 76 | 100 | 72 |
| Mer a 1 | 40 | 100 | 86 | 100 | 84 |
| Phl p 11 | 25 | 100 | 86 | 100 | 85 |
| Gly m 4 | 20 | 94 | 76 | 50 | 79 |
| Pru p 1 | 43 | 100 | 81 | 100 | 78 |
| Pooled Estimate | 38 | 98 | | | |

TABLE E5. Selection of the molecules at source and category level

| Category | Molecules | Inclusion | Reason for exclusion | Category | Molecules | Inclusion | Reason for exclusion |
|---------------------------------|---------------------------------------|------------------|----------------------|------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| airborne | Alder | | | vegetable foodborne | Apple | | |
| | rAln g 1 | yes | | | rMal d 1 | yes | |
| | Alternaria | | | | Brazilnut | | |
| | rAlt a 1 | yes | | | rBer e 1 | yes | |
| | rAlt a 6 | yes | | | Cashewnut | | |
| | Aspergillus | | | | rAna o 2 | yes | |
| | rAsp f 1 | yes | | | Hazelnut | | |
| | rAsp f 3 | yes | | | nCor a 9 | yes | |
| | rAsp f 6 | yes | | | rCor a 8 | no | LTP, CR |
| | Bermuda | | | | rCor a 1.0401 | no | PR.10, CR |
| | nCyn d 1 | yes | | | Kiwi | | |
| | Birch | | | | nAct d 1 | yes | |
| | rBet v 1 | yes | | | nAct d 2 | yes | |
| | rBet v 2 | no | Profilin, CR | | nAct d 5 | yes | |
| | rBet v 4 | no | Polcalcin, CR | | nAct d 8 | no | PR.10, CR |
| | Blomia tropicalis | | | | Peach | | |
| | rBlo t 5 | yes | | | rPru p 1 | no | PR.10, CR |
| | Cat | | | | nPru p 3 | yes | |
| | rFel d 1 | yes | | | Peanut | | |
| | nFel d 2 | no | Serumalbumin, CR | | nAra h 1 | yes | |
| | rFel d 4 | yes | | | nAra h 2 | yes | |
| | Cladosporium | | | | nAra h 3 | yes | |
| | rCla h 8 | yes | | | nAra h 6 | yes | |
| | Cockroach | | | | rAra h 8 | no | PR.10, CR |
| | rBla g 1 | yes | | | rAra h 9 | no | LTP, CR |
| | rBla g 2 | yes | | | Sellery | | |
| | rBla g 5 | yes | | | rApi g 1 | yes | |
| | nBla g 7 | no | Tropomyosin, CR | | Sesame | | |
| | Cypress | | | | nSes i 1 | yes | |
| | nCup a 1 | yes | | | Soy | | |
| | Dermatophagoides farinae | | | | rGly m 4 | no | PR.10, CR |
| | nDer f 1 | yes | | | nGly m 5 | yes | |
| | nDer f 2 | yes | | | nGly m 6 | yes | |
| | Dermatophagoides pteronyssinus | | | | Walnut | | |
| | nDer p 1 | yes | | | rJurg r 1 | yes | |
| | nDer p 2 | yes | | | nJurg r 2 | yes | |
| | rDer p 10 | no | Tropomyosin, CR | | nJurg r 3 | no | LTP, CR |
| | Dog | | | | Wheat | | |
| | rCan f 1 | yes | | | nFag e 2 | yes | |
| | rCan f 2 | yes | | | nTri a aA_TI | yes | |
| | nCan f 3 | no | Serumalbumin, CR | | rTri a 19.0101 | yes | |
| | rCan f 5 | yes | | | rTri a 14 | yes | |
| | Goosefoot | | | | other | Anisakis | |
| rChe a 1 | yes | | rAni s 1 | yes | | | |
| Hazel | | | rAni s 3 | no | | Tropomyosin, CR | |
| rCor a 1.0101 | yes | | Bee | | | | |
| Horse | | | nApi m 1 | yes | | | |
| nEqu c 3 | no | Serumalbumin, CR | nApi m 4 | yes | | | |
| rEqu c 1 | yes | | Bromelain | | | | |
| Japanese cedar | | | nMUXF3 | no | | CCD | |
| nCry j 1 | yes | | Common wasp | | | | |
| Lepidoglyphus destructor | | | rVes v 5 | yes | | | |
| rLep d2 | yes | | Paper wasp | | | | |
| Mercury | | | rPol d 5 | yes | | | |
| rMer a 1 | yes | | Latex | | | | |
| Mouse | | | rHev b 1 | yes | | | |
| nMus m 1 | yes | | rHev b 3 | yes | | | |
| Mugwort | | | rHev b 5 | yes | | | |
| nArt v 1 | yes | | rHev b 6 | yes | | | |
| nArt v 3 | no | LTP, CR | rHev b 8 | no | | Profilin, CR | |
| Olive pollen | | | Cod | | | | |
| nOle e 1 | yes | | rGad c 1 | yes | | | |
| nOle e 7 | no | LTP | Milk | | | | |
| rOle e 9 | yes | | nBos d 4 | yes | | | |
| Plane tree | | | nBos d 5 | yes | | | |
| rPla a 1 | yes | | nBos d 6 | no | | Serumalbumin, CR | |
| nPla a 2 | yes | | nBos d 8 | yes | | | |
| rPla a 3 | no | | nBos d lactoferrin | yes | | | |
| Plantain | | | Egg | | | | |
| rPla l 1 | yes | | nGal d 1 | yes | | | |
| Ragweed | | | nGal d 2 | yes | | | |
| nAmb a 1 | yes | | nGal d 3 | yes | | | |
| Saltwort | | | nGal d 5 | no | | Serumalbumin, CR | |
| nSal k 1 | yes | | Shrimps | | | | |
| Timothy | | | nPen m 1 | no | | Tropomyosin, CR | |
| rPhl p 1 | yes | | nPen m 2 | yes | | | |
| rPhl p 2 | yes | | nPen m 4 | yes | | | |
| nPhl p 4 | yes | | | | | | |
| rPhl p 5 | yes | | | | | | |
| rPhl p 6 | yes | | | | | | |
| rPhl p 7 | no | Polcalcin, CR | | | | | |
| rPhl p 11 | yes | | | | | | |
| rPhl p 12 | no | Profilin, CR | | | | | |
| Wall pellitory | | | | | | | |
| rPar j 2 | yes | | | | | | |

CCD - Cross-reactive carbohydrate determinants

CR - Crossreaction

LTP - Lipid transfer protein

PR.10 - Pathogenesis-related protein 10

Table E6. Included and excluded patients for Figure E1C

| | n | Specific IgE activity (sIgE/t-IgE ratio) | | |
|-------------------|-----|---|-----------|---------------------|
| | | Median | Range | p-value |
| Included patients | 148 | 0.19 | 0-6.80 | 0.0015 [†] |
| Excluded patients | 13 | 0.82 | 0.02-1.99 | |

* Geometric mean

[†] non parametric Mann-Whitney test

Figure E1:

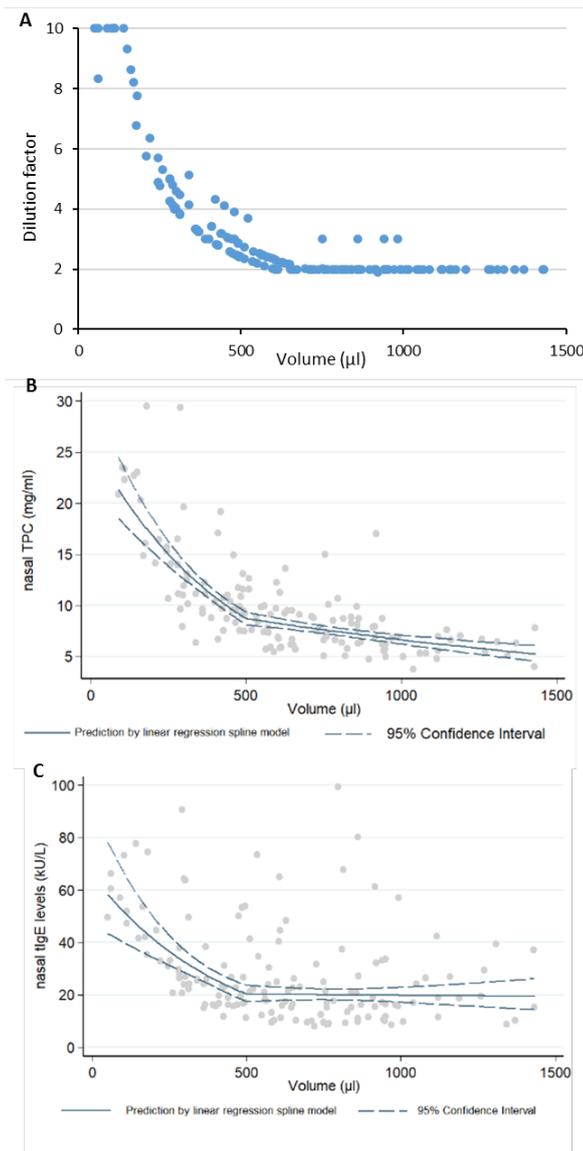


Figure E1. Characteristics of nasal secretion samples of patients with SAR. **A)** Relationship between the applied dilution factor and the volume of collected nasal secretions in 161 SAR patients. **B)** Relationship between TPC and volume in NS of 156 subjects described by a linear regression spline model with a knot at 500 μl. **C)** Relationship between nasal tIgE and volume of NS of 148 subjects described through a linear regression spline model with a knot at 500 μl.

Figure E2:

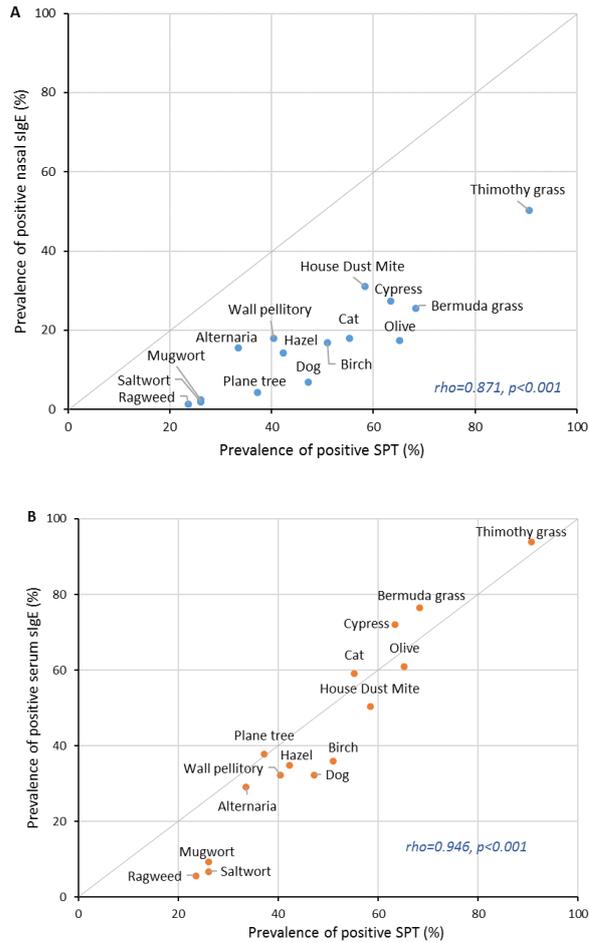


Figure E2. Relationship between the prevalence of SPT positivity to allergen extracts (x-axis) and sIgE antibodies to allergen sources (y-axis) in the nasal secretions (**A**) and serum (**B**) of 161 patients with SAR. The Spearman rank correlation coefficients and the respective P values are shown. The identity line is shown. The molecules used in the microarray for each allergen source were the following: Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 11 (timothy grass); Cyn d 1 (Bermuda grass) Ole e 1, Ole e9 (olive tree); Cup a 1 (cypress); Bet v 1 (birch); Cor a 1.0101 (hazelnuss); Par j 2 (pellitory); Pla a 1, Pla a 2 (plane tree); Alt a 1, Alt a 6 (Alternaria); Sal k 1 (Russian thistle); Art v 1 (Mugwort); Amb a 1 (Ragweed); Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 1, Der p 2 (house dust mites); Can f 1, Can f 2, Can f 5 (dog); Fel d 1, Fel d 4 (cat).

Figure E3:

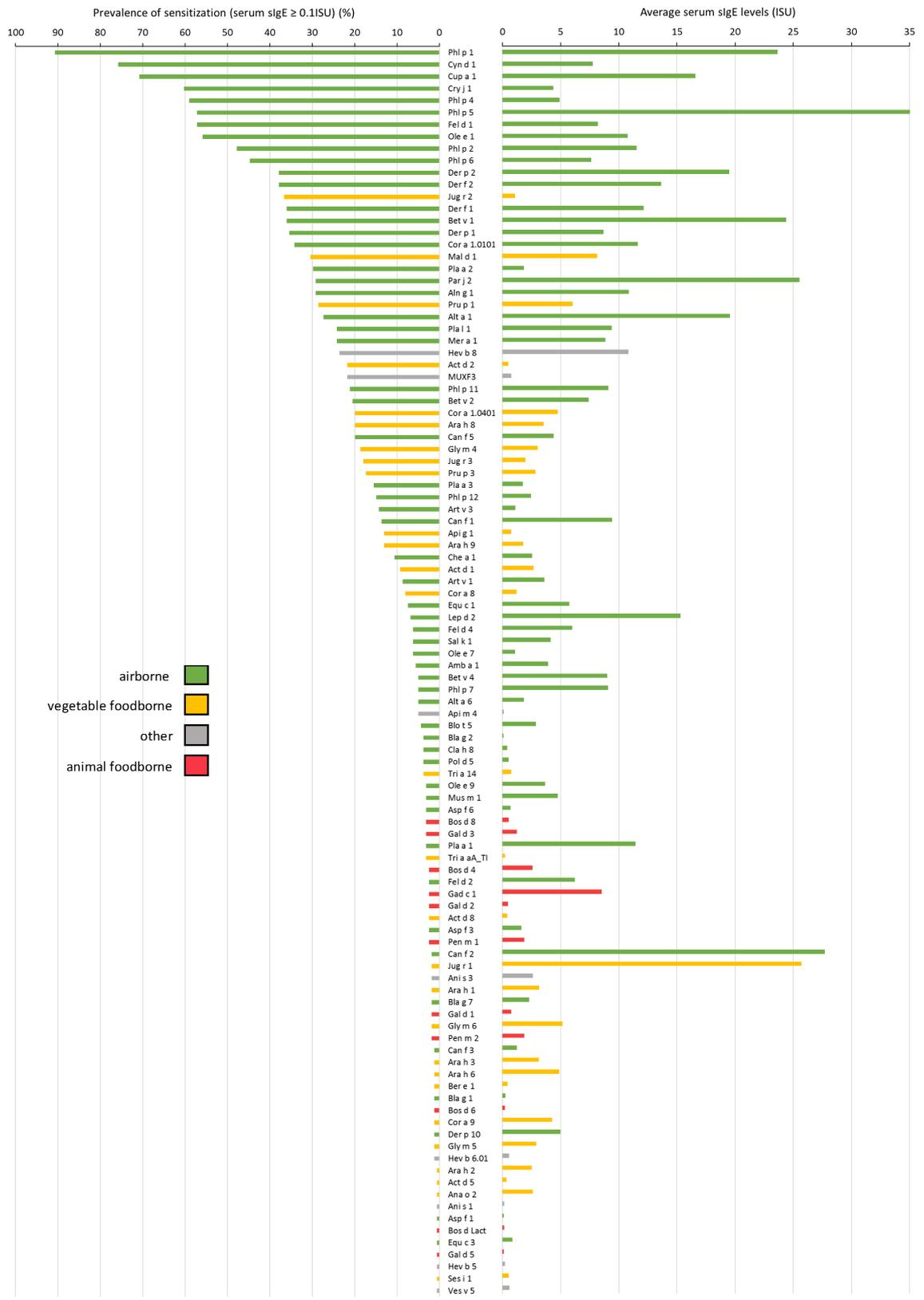


Figure E3. Prevalence (left) and average levels (right) of sIgE to allergen molecules in serum of 161 SAR patients. The results of molecules with at least 1 positive IgE value (≥ 0.1 ISU) are shown. The colors show the exposure route for each molecule (inhaled [green], vegetable food [orange], animal food [red], other [grey]).

Figure E4:

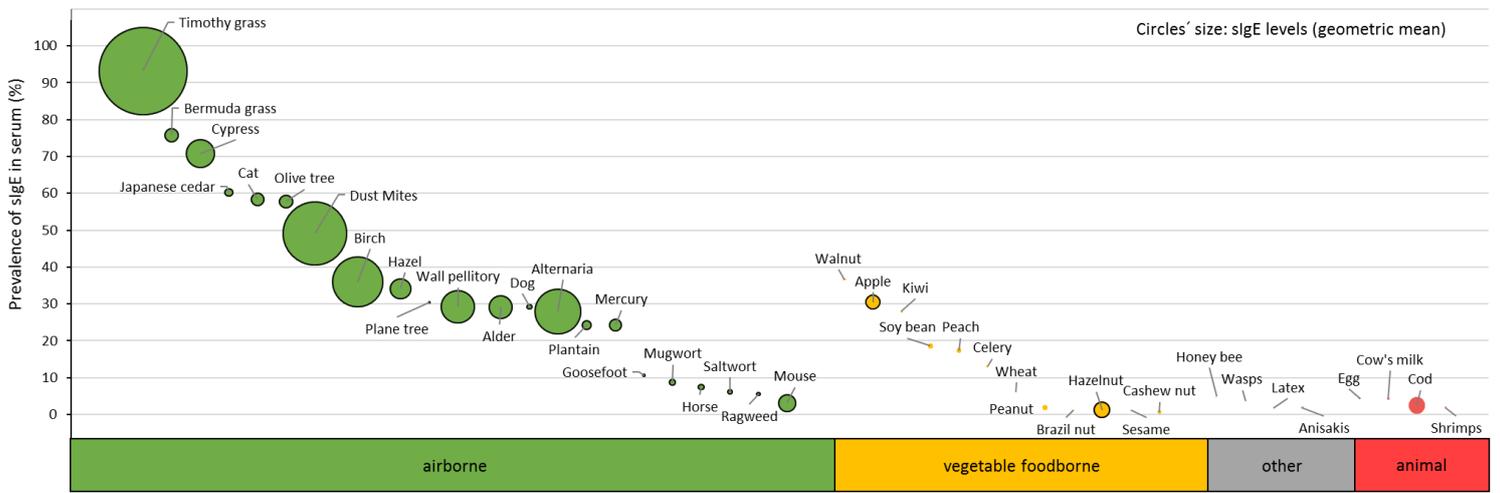


Figure E4. Prevalence and levels of specific IgE responses to allergenic sources in the serum of 161 SAR patients. Circles show the prevalence (y-axis) and levels (diameter) of detectable sIgE responses (≥ 0.1 ISU) to allergenic sources (see the **Method** section for definition). The exposure category to which the allergenic sources of individual molecules belong is specified: airborne [green], vegetable food [orange], animal food [red], other [grey]. The values are ordered according to the prevalence in each exposure category.

Figure E5:

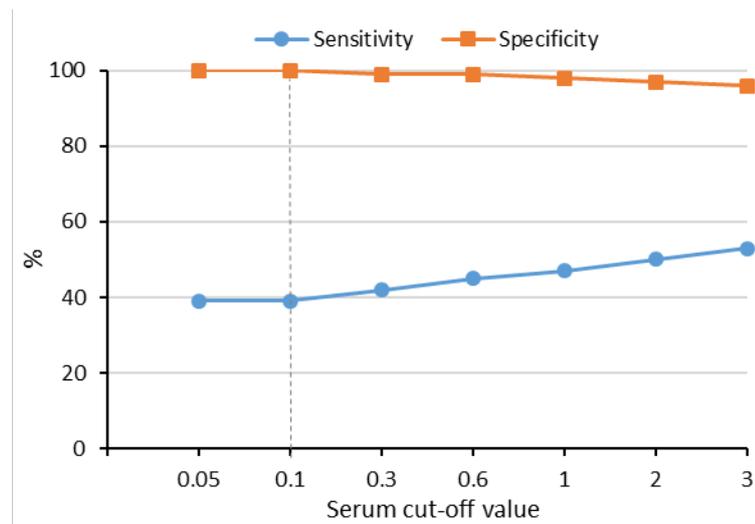


Figure E5. Performance of testing IgE in nasal secretions in identifying positive serum sIgE varying the serum sIgE cut off from 0.05 to 3 ISU. Sensitivity and specificity at each cutoff point were pooled estimates of the values observed in each of 26 selected allergen molecules (molecules with at least 10 subjects who had a molecule-specific IgE response); the results are shown on the graph. The dashed line indicates the cutoff point provided by the reference serum (≥ 0.1 ISU).

VI. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VII. Publikationsliste

Als Erstautorin:

1. Castelli S, Arasi S, Tripodi S, Villalta D, Martelli P, Conte M, Panetta V, Simonelli I, Rohrbach A, Di Fraia M, Sfika I, Villella V, Di Rienzo Businco A, Perna S, Dramburg S, Potapova E, Matricardi PM. *IgE antibody repertoire in nasal secretions of children and adults with seasonal allergic rhinitis: A molecular analysis*. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020 Apr;31(3):273-280. doi:10.1111/pai.13148. Epub 2020 Jan 22.

2. Castelli S, Arasi S, Pawankar R, Matricardi PM. *Collection of nasal secretions and tears and their use in allergology*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018 Feb;18(1):1-9. doi: 10.1097/ACI.0000000000000412. Review.

**Impact
Factor**

4.654

3.014

Als Co-Autorin:

1. Di Fraia M, Arasi S, Castelli S, Dramburg S, Potapova E, Villalta D, Tripodi S, Sfika I, Zicari AM, Villella V, Perna S, Travaglini A, Verardo PL, Matricardi PM. *A new molecular multiplex IgE assay for the diagnosis of pollen allergy in Mediterranean countries: A validation study*. *Clin Exp Allergy*. 2019 Mar;49(3):341-349. doi: 10.1111/cea.13264. Epub 2018 Oct 9.

2. Di Fraia M, Tripodi S, Arasi S, Dramburg S, Castelli S, Villalta D, Buzzulini F, Sfika I, Villella V, Potapova E, Perna S, Brighetti MA, Travaglini A, Verardo P, Pelosi S, Zicari AM, Matricardi PM. *Adherence to Prescribed E-Diary Recording by Patients With Seasonal Allergic Rhinitis: Observational Study*. *J Med Internet Res*. 2020 Mar 16;22(3):e16642. doi: 10.2196/16642.

**Impact
Factor**

4.741

4.945

VIII. Danksagung

Viele Menschen waren für mich während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit eine wichtige Unterstützung und ein Grund für die Freude, die ich an der Arbeit gefunden habe.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Paolo Matricardi danken. Ich konnte während unserer Zusammenarbeit sehr viel von ihm lernen und in ihm einen hilfreichen sowie wegweisenden Betreuer finden. Er konnte mir seine Begeisterung für die Wissenschaft sowie wichtige Aspekte des wissenschaftlichen Arbeitens vermitteln. Darüber hinaus hat er mir stets großes Vertrauen in meine Fähigkeiten entgegengebracht, mein selbstständiges Arbeiten unterstützt und mir viele Entwicklungsmöglichkeiten angeboten. Dank seiner Mühe, viele teambildende Gelegenheiten zu schaffen, herrschte in unserer Arbeitsgruppe immer eine über die Jahre anhaltende kollegiale, stimulierende sowie positive Atmosphäre.

Meinen KollegInnen Stefania Arasi, Stephanie Dramburg, Ekaterina Potapova, Tara Hoffmann, Theresa Lipp, Leandra Forchert, Daniela Posa, Marco Di Fraia und Xinyuan Huang danke ich für schöne Arbeitsstimmung, die mir Freude und Inspiration geschenkt hat. Bedanken möchte ich mich auch für die Hilfsbereitschaft, die mir stets von allen entgegengebracht wurde. Insbesondere gilt dies auch für den Kollegen des Allergielabors, Alexander Rohrbach, dem ich für die vielen konzentrierten und fröhlichen Stunden im Labor, das Interesse an meiner Arbeit und den bemerkenswerten Einsatz sehr dankbar bin.

Ich danke den Statistikerinnen Valentina Panetta und Ilaria Simonelli für die geduldige Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt allen Teilnehmern sowie dem Team der @IT2020 Studie, denen es gemeinsam gelungen ist, dieses Projekt umzusetzen und somit das Fundament für meine Untersuchungen zu schaffen.