

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

DISSERTATION

**Bestimmung klinischer Schwellenwerte und Identifikation prädiktiver
Werte für die klinische Reaktion unter oraler Erdnussprovokation bei
erdnussallergischen Kindern unter Verwendung eines modifizierten
Provokationsprotokolls**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alena Beder

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung/Abstract (deutsch/englisch)	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Allergie - Definitionen und Pathophysiologie	1
1.2. Erdnussallergie	7
1.2.1. Die Erdnuss	7
1.2.2. Epidemiologie und Risikofaktoren der Erdnussallergie	9
1.2.3. Klinische Aspekte der Erdnussallergie	10
1.2.4. Diagnostik	12
1.2.5. Orale Erdnussprovokation	12
1.3. Fragestellung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Patientenkollektiv	17
2.2. Studiendesign	18
2.3. Orale Erdnussprovokation	19
2.3.1. Provokations-Protokoll	19
2.3.2. Auswertung der Provokation	19
2.3.3. Weitere Schweregradeinteilungen	21
2.3.4. Therapie unter Provokation	21
2.4. Hautpricktest	22
2.5. Antikörperbestimmung im Serum	22
2.5.1. Gesamt-IgE	22
2.5.2. Erdnuss-spezifisches IgE und Ara h2-spezifisches IgE	22
2.6. Differential-Blutbild	23
2.7. Basophilenaktivierungstest und Analyse von T-Zell-Zytokinen	23
2.7.1. Geräte, Material und Reagenzien	23
2.7.2. Herstellung des Erdnussextrakts	25
2.7.3. Durchflusszytometrie	25
2.7.4. Basophilenaktivierungstest	28
2.7.5. Analyse der T-Zell-Zytokin-Sekretion	34
2.8. Statistische Auswertung	36

3.	Ergebnisse	37
3.1.	Patientenkollektiv	37
3.1.1.	Klinische Charakterisierung	37
3.1.2.	Laborparametrische Charakterisierung	37
3.2.	Orale Erdnussprovokation	41
3.2.1.	Reaktionsdosis	41
3.2.2.	Zeit bis zum Auftreten der allergischen Reaktion unter oraler Provokation	42
3.2.3.	Schweregrad	43
3.3.	Korrelationen klinischer und anamnestischer Daten	46
3.3.1.	Korrelation zwischen Reaktionsdosis und Schweregrad unter oraler Erdnussprovokation	46
3.3.2.	Korrelation von Alter und akzidentellen Reaktionen vor Studienbeginn	47
3.4.	Korrelation von Laborparametern und Reaktionsdosis	49
3.4.1.	Korrelation von Allergen-spezifischen Sensibilisierungsmarkern und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation	49
3.4.2.	Korrelation Allergen-spezifischer Basophilenaktivierung und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation	50
3.4.3.	Korrelation von Allergen-spezifischer T-Zell-Aktivierung und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation	50
3.4.4.	Korrelation von Allergen-unspezifischer Laborparameter und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation	50
3.5.	Korrelation von Laborparametern und Schweregrad	53
3.6.	Gruppenvergleich	56
3.6.1.	Reaktionsdosisgruppen	56
3.6.2.	Schweregradgruppen	59
3.7.	Korrelationen von Markern der Basophilenaktivierung und anderen Markern der Sensibilisierung und T-Zell-Aktivierung	59
3.7.1.	Korrelation von Markern Erdnuss-spezif. Basophilenaktivierung und Erdnuss-spezif. Sensibilisierungsmarkern sowie Erdnuss-spezif. Zytokinproduktion	59
3.7.2.	Korrelation von Markern Allergen-unspezif. Basophilenaktivierung und Erdnuss-spezif. Sensibilisierungsmarkern sowie Erdnuss-spezif. Zytokinproduktion	61
3.7.3.	Korrelation von Markern der Basophilenaktivierung und Allergen-unspezifischen Sensibilisierungsmarkern	61

4.	Diskussion	62
4.1.	Methodik	62
4.1.1.	Studienpopulation	62
4.1.2.	Orale Provokation	63
4.1.3.	Basophilenaktivierungstest	66
4.2.	Ergebnisse	69
4.2.1.	Schwellenwerte	69
4.2.2.	Prädiktoren der Reaktion unter oraler Provokation	71
4.2.2.1.	Reaktionsdosis und Schweregrad	71
4.2.2.2.	Korrelation von Parametern aus Anamnese und der klinischen Reaktion unter oraler Provokation	74
4.2.2.3.	Korrelation von Erdnuss-Sensibilisierung und der klinischen Reaktion unter oraler Provokation	76
4.2.2.4.	Korrelation von der Basophilenaktivierung, dem Allergen-spezifischen PBMC-Zytokinprofil und der klinischen Reaktion unter oraler Provokation	79
4.2.2.5.	Korrelation von Markern der Basophilenaktivierung und Markern der Sensibilisierung und T-Zell-Aktivierung	82
4.3.	Zusammenfassung und Ausblick	84
5.	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	98
	Lebenslauf	99
	Publikationsliste	100
	Eidesstattliche Versicherung	101

Abkürzungsverzeichnis

AAAAI	American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
AD	Atopische Dermatitis
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin 7
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
Ara h1-13	Erdnussallergene
ARK	Allergische Rhinokonjunktivitis
BA	Basophilenaktivierung
BAT	Basophilenaktivierungstest
Bet v1	Birkenpollenallergen
bzw.	beziehungsweise
CBA	Cytometric Bead Array
CD	cluster of differentiation
CDmax	maximale Basophilenaktivierung nach Allergenstimulation
CD-sens	(1/ Erdnuss-Konzentration bei $\frac{1}{2}$ CDmax) x 100
DBPCFC	double blind placebo controlled food challenge (dt. doppelblind placebokontrollierte Nahrungsmittelprovokation)
DGAKI	Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
ED	Eliciting dose (dt. Reaktionsdosis)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
FACS	fluorescence activated cell sorting (dt. Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung)
FcεRI	Fragment-cristallisable-ε-Rezeptor I
FEIA	Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	forward scatter (dt. Forwärtsstreulicht)
GALT	gut associated lymphoid tissue (dt. Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
GATA 3	GATA binding protein 3, Transkriptionsfaktor
ggfs.	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt

GPA	Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HR	Hazard Ratio
i.d.R.	in der Regel
i.m.	intramuskulär
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
kU _A /L	Kilounits of Antibody per Liter
kU/L	Kilounits per Liter
KI	Konfidenzintervall
KiGGS	Kinder- und Jugendgesundheitsurvey
LOAEL	Lowest-observed-adverse-effect-level
Log	logarithmisch
Max.	Maximum
MHC	Major histocompatibility complex (dt. Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min.	Minimum
NMA	Nahrungsmittelallergie
NOAEL	No-Observed-adverse-effect-level
OAS	Orales Allergiesyndrom
OIT	Orale Immuntherapie
p	Wahrscheinlichkeit statistischer Signifikanz
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (dt. mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline (dt. Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PHA	Phytohämagglutinin
PMT	Photomultiplier tube (dt. Photomultiplier-Röhrchen)
PRACTALL	PRACTical ALLergology, Initiative der EAACI und AAAAI
RPMI	Roswell Park Memorial Institute; Zellkulturmedium, ebd. entwickelt
r _s	Spearman Korrelationskoeffizient
SCORAD	SCORing Atopic Dermatitis (dt. System zur Schweregradeinteilung der Atopischen Dermatitis)

sog.	sogenannt
spezif.	spezifisch
SSC	sideward scatter (dt. Seitwärtsstreulicht)
T _h -Zelle	T-Helfer-Zelle
TGF- β	Transforming-Growth-Faktor- β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
V.a.	Verdacht auf
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
[...]	Literaturangabe, Verweis auf entsprechende Nummer im Literaturverzeichnis

Zusammenfassung

Einleitung

Die Prävalenz der Erdnussallergie im Kindesalter wird mit 0,8 bis 2% angegeben. Bereits der Verzehr von kleinsten Allergenmengen kann bei erdnussallergischen Kindern zu schweren, potenziell lebensbedrohlichen allergischen Reaktionen führen. Im Alltag sind sie aufgrund der häufig unzureichenden Kennzeichnung von Nahrungsmitteln dem Risiko akzidenteller Reaktionen ausgesetzt. Diagnostischer Goldstandard für Nahrungsmittelallergien ist die orale Nahrungsmittelprovokation. In der Regel wird die Menge des allergenen Nahrungsmittels in halblogarithmischen Schritten gesteigert mit Intervallen von 30 Minuten zwischen den Einzeldosen. Bisher ist eine Vorhersage der klinischen allergischen Reaktion unter Provokation nicht möglich. Ziel vorliegender Arbeit war es, mithilfe eines modifizierten Provokationsprotokolls mit einem 2-stündigen Steigerungsintervall zwischen den einzelnen Erdnussdosen Reaktionsschwellen zu ermitteln und so eventuell genauere Erdnuss-Schwellenwerte zu bestimmen. Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, anhand der Korrelation der Reaktionsdosis und Reaktionsschwere unter oraler Erdnussprovokation mit B-Zell, T-Zell und Effektorzell-Markern Vorhersagewerte für die klinische allergische Reaktion zu identifizieren.

Methodik

63 Erdnuss-allergische Kinder erhielten eine offene orale Erdnussprovokation mit einem Steigerungsintervall von 2 Stunden und sieben semi-logarithmisch aufsteigenden Dosierungsschritten von 3 bis maximal 4500 mg Erdnussprotein. Abbruchkriterium war das Auftreten objektiver allergischer Symptome. Die Schwere der allergischen Reaktion wurde in Grade von I bis V eingeteilt. Vor Beginn der Provokation erfolgten ein Hautpricktest und die Messung von Erdnuss- und Ara h2-spezifischem IgE, Erdnuss-spezifischer PBMC-Zytokinproduktion und Basophilenaktivierungstest. Die Schwellenwerte bei der 5 % bzw. 10 % der Population objektive allergische Symptome zeigten (ED_5 bzw. ED_{10}), wurden mittels Intervall-zensierter Überlebensanalyse errechnet. Die klinische Reaktion unter Erdnussprovokation (Reaktionsdosis, Schweregrad) wurde mit den Parametern aus Anamnese, Hautpricktest und der Analyse von B-Zell-, T-Zell- und Effektorzellmarkern mit Hilfe der Spearman Rang-Korrelation korreliert.

Ergebnisse

54 % der 63 Studienteilnehmer (Alter 3-18 Jahre, Median 6 Jahre) litten an Asthma bronchiale und 90 % berichteten von mindestens einer allergischen Reaktion nach akzidentellem Erdnusskontakt. Die Zeit von der Erdnussgabe bis zum Auftreten des ersten objektiven allergischen Symptoms betrug im Median 55 Minuten, 45 Patienten reagierten erst mehr als 30 Minuten nach der Erdnussgabe. Die ED₅ wurde auf 1,95 mg Erdnussprotein und die ED₁₀ auf 4,1 mg Erdnussprotein berechnet.

Die Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation konnte zu Erdnuss- und Ara h2-spezifischem IgE, der Erdnussquaddelgröße im Hautpricktest sowie zur Erdnuss-spezifischen Basophilenaktivierung und PBMC-T_{H2}-Zytokin-Produktion invers korreliert werden. Eine Korrelation zwischen der Reaktionsschwere und den genannten Parametern oder der Reaktionsdosis zeigte sich nicht.

Schlussfolgerung

Mit dem in vorliegender Arbeit verwendeten modifizierten Provokationsprotokoll lassen sich möglicherweise präzisere Erdnuss-Schwellenwerte in der erdnussallergischen Population ermitteln, da mehr als die Hälfte der Patienten unter der Provokation erst nach einem Intervall von mehr als 30 Minuten allergisch reagierte.

Es konnten lediglich Prädiktoren für die Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation identifiziert werden, deren Bedeutung jedoch nach aktueller Studienlage kontrovers diskutiert wird. Aufgrund dessen sowie vor dem Hintergrund fehlender Prädiktoren für die Schwere der allergischen Reaktion, sollten orale Erdnussprovokationen nach wie vor nur unter stationärer Überwachung durchgeführt werden.

Abstract

Background

The prevalence of peanut allergy is estimated between 0.8 and 2 % in the pediatric population. In peanut allergic children even the ingestion of small amounts of the allergen can lead to severe, life-threatening allergic reactions. Accidental peanut ingestion due to insufficient food labeling might cause allergic reactions in these children. Oral food challenges are the gold standard in the diagnosis of food allergy. Routinely, doses are increased with half-logarithmic steps with dosing intervals 30 minutes apart. So far it is not possible to predict the allergic reaction under challenge.

The aim of this study was to determine threshold levels for peanut allergic reactions by using a modified oral food challenge protocol with time intervals between single dosages of 2 hours mimicking a more real-life exposure. Second aim of this study was to correlate the eliciting dose and the severity of clinical reaction in peanut allergic children with B-cell, T-cell and effector cell markers in order to identify predictors of the clinical reaction.

Methods

63 peanut allergic children underwent an open oral peanut challenge with doses scheduled 2 hours apart and seven semi-log increasing titration steps ranging from 3 to 4500 mg of peanut protein until objective allergic reactions occurred. The severity of allergic symptoms was graded from I to V. A peanut skin prick test and measurement of peanut- and Ara h2-specific IgE levels, peanut-specific cytokine production by PBMCs and a basophil activation test were done before challenge. An interval-censored survival analysis approach was used to calculate the threshold levels of mg of peanut protein that elicit objective symptoms in 5 % and 10 % (ED₅ and ED₁₀) of the peanut allergic population. To correlate the clinical reaction under challenge (eliciting dose, grade of severity) with parameters from patient's history, skin prick test and analysis of B-cell, T-cell and effector cell markers the Spearman's rank correlation was used.

Results

54 % of the 63 included patients (3-18 years of age, median 6 years) were suffering from asthma, and 90 % reported on at least one allergic reaction due to accidental peanut ingestion. The median time until onset of the first objective allergic symptom after administration of the respective peanut dose was 55 minutes. 45 patients showed an objective clinical reaction with a latency of greater than 30 minutes. The ED₅ and ED₁₀ were calculated to be 1.95 and 4.1 mg of peanut protein.

The eliciting dose was inversely correlated with peanut- and Ara h2-specific IgE levels, skin prick test responses, peanut-specific basophil activation and peanut-specific T_{H2} cytokine production by PBMCs. There was no correlation between severity of symptoms and any of these markers or the eliciting dose.

Conclusion

The modified oral food challenge protocol used in this study might help to determine more precise threshold levels for peanut allergy than the standard protocol because more than half of the patients in this study showed allergic symptoms at a time interval of more than 30 minutes. In this study parameters to predict the eliciting dose were found, however, the impact of these predictors is controversially discussed in literature. Due to the lack of parameters predicting the severity of the allergic reaction oral peanut challenges should only be performed under medical supervision.

1. Einleitung

1.1. Allergie - Definitionen und Pathophysiologie

Begriffsbestimmung

Unter dem Begriff Allergie versteht man eine überschießende Immunantwort des Körpers ausgelöst durch den Kontakt mit einer körperfremden, normalerweise harmlosen Substanz, dem sogenannten Allergen. Die Typ-I- oder Soforttyp-Reaktion nach Coombs und Gell ist die häufigste allergische Immunreaktion [1]. Sie ist durch die Bildung spezifischer Immunglobulin-E-Antikörper (IgE) als Reaktion auf Kontakt mit einem Allergen gekennzeichnet. Die genetische Prädisposition eines Organismus auf Allergenkontakt mit der Bildung von IgE-Antikörpern zu reagieren, wird mit dem Begriff Atopie bezeichnet [2].

Eine Allergie manifestiert sich in der Mehrzahl der Fälle im Kindesalter. Laut der KiGGS-Basiserhebung zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (Mai 2003 bis Mai 2006, Robert-Koch-Institut, Berlin [3]) leiden 22,6 % der Kinder und Jugendlichen hierzulande an mindestens einer Erkrankung des atopischen Formenkreises. Hierzu zählen die atopische Dermatitis (AD), die allergische Rhinokonjunktivitis (ARK) und allergisches Asthma bronchiale sowie Urtikaria und IgE-vermittelte Nahrungs- und Arzneimittelallergien. Häufige auslösende Allergene sind Baum- und Gräserpollen, Tierhaare, Hausstaubmilbenkot, Nahrungsmittelproteine und Medikamente.

Nahrungsmittelallergien, wie die Erdnussallergie, sind immunologisch vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen, die mit dem Verzehr bestimmter Nahrungsmittel assoziiert sind. Sie werden in Antikörper-vermittelte (IgE-vermittelte) und Zell-vermittelte (nicht-IgE-vermittelte) Reaktionen eingeteilt [2]. Ca. 6-8 % der Kinder unter vier Jahren leiden an einer IgE-vermittelten Nahrungsmittelallergie, wobei Kuhmilch, Hühnerei, Erdnuss, Soja und Weizen die häufigsten allergieauslösenden Nahrungsmittel sind [4]. Bis zum Schulalter verliert der überwiegende Teil Kuhmilch- und Hühnerei-allergischer Kinder seine Nahrungsmittelallergie im Rahmen einer spontanen Toleranzentwicklung [5, 6]. Oft wird die schwindende Nahrungsmittelallergie jedoch abgelöst von einer klinisch relevanten Sensibilisierung gegenüber Inhalationsallergenen im Sinne des sogenannten „atopic march“ [7]. Im Gegensatz dazu bleibt eine Erdnussallergie ebenso wie eine Allergie gegen Baumnüsse zu ca. 80 % bis ins Erwachsenenalter bestehen und ist nicht selten lebenslang [8].

Sensibilisierung und allergische Reaktion

Der allergischen Reaktion geht ein Sensibilisierungsprozess voraus, der beim Erstkontakt mit dem entsprechenden Allergen in Gang gesetzt wird und in der Bildung allergenspezifischer IgE-Antikörper resultiert. Erst wenn es bei bestehender Sensibilisierung zu einem Zweitkontakt mit dem Allergen kommt, wird eine allergische Reaktion im Körper ausgelöst. Verkürzt lässt sich der Sensibilisierungsprozess wie folgt beschreiben (Abb. 1): Nahrungsmittelallergene werden z.B. im Dünndarm von spezialisierten Zellen der gastrointestinalen Schleimhaut, den M-Zellen (engl. microfold cells), via Transzytose zu antigenpräsentierenden Zellen (APZ) in den darunterliegenden Peyer-Plaques der Submukosa geschleust [9, 10]. Hier, im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (engl. gut associated lymphoid tissue, GALT), nehmen dendritische Zellen, die zu den APZ gehören, das Protein auf, prozessieren es intrazellulär in Peptidfragmente und präsentieren diese über MHC-II-Moleküle (engl. major histocompatibility-complex) auf ihrer Zelloberfläche. Nach Migration der dendritischen Zelle in die drainierenden mesenterischen Lymphknoten, oder auch im GALT selbst, interagieren die antigenbeladenen dendritischen

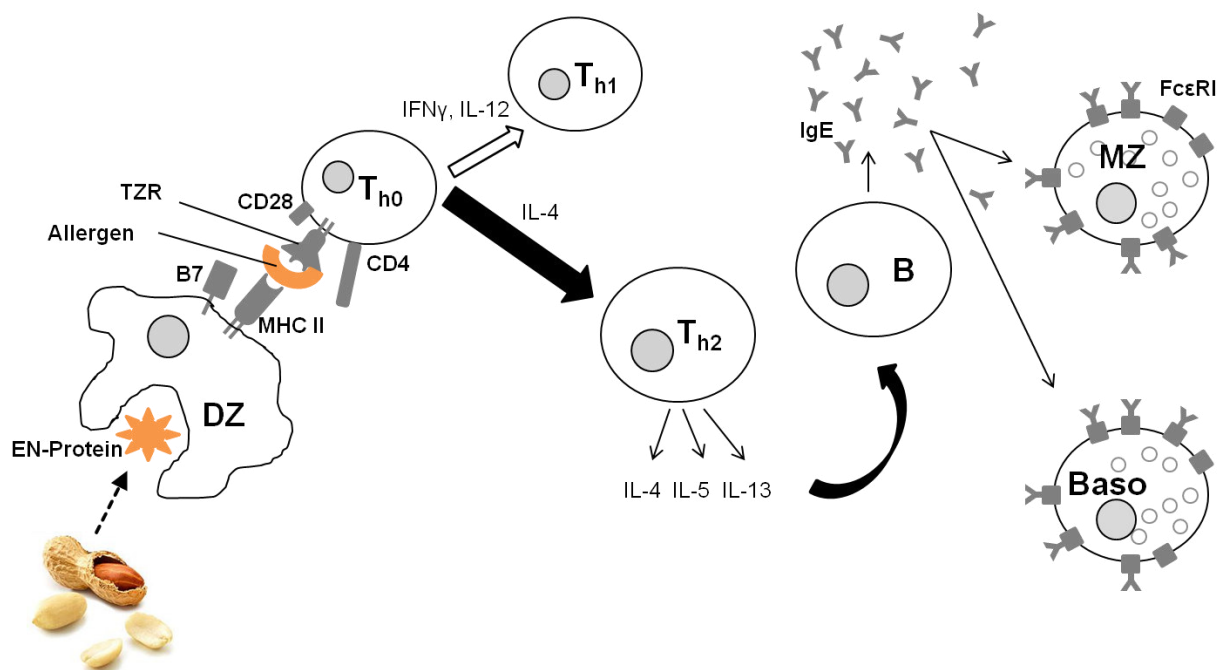


Abb. 1: Sensibilisierungsprozess bei Erdnussallergie.

EN Erdnuss, DZ Dendritische Zelle, MHC major histocompatibility complex, B7 und CD28 Co-Rezeptoren, TZR T-Zellrezeptor, T_h T-Helfer-Zelle, B B-Lymphozyt, MZ Mastzelle, Baso Basophiler Granulozyt, $Fc\epsilon RI$ hochaffiner IgE-Rezeptor.

Zellen mit naiven T-Helfer-Lymphozyten (T_H -Zellen) [11], welche durch Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-II-Antigen-Komplex aktiviert werden. In Anwesenheit allergiebegünstigender Faktoren, wie z.B. Interleukin-4 (IL-4) und IL-13 differenzieren sich die aktivierten T_H -Zellen in T_{H2} -Zellen und sezernieren Zytokine, u.a. wiederum IL-4 und IL-13, die die Proliferation von B-Lymphozyten sowie einen Klassenwechsel der Immunglobulin-Produktion hin zur IgE-Produktion bewirken. Diese allergenspezifischen IgE-Antikörper binden zum größten Teil an den hochaffinen IgE-Rezeptor, Fc ϵ RI, auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen Granulozyten. Durch die Besetzung ihrer Zelloberfläche mit an den Fc ϵ RI-Rezeptor gebundenen spezifischen IgE-Antikörpern sind Mastzellen und Basophile und somit der gesamte Organismus „sensibilisiert“. Bei erneutem Kontakt mit dem Nahrungsmittelprotein bindet dieses an die membrangebundenen IgE-Antikörper und löst dadurch über Kreuzvernetzung der IgE-tragenden Fc ϵ RI-Rezeptoren die Aktivierung der Mastzelle bzw. des Basophilen und die Sekretion einer Vielzahl an Entzündungsmediatoren aus, die die allergische Reaktion vermitteln [4, 12] (Abb. 2).

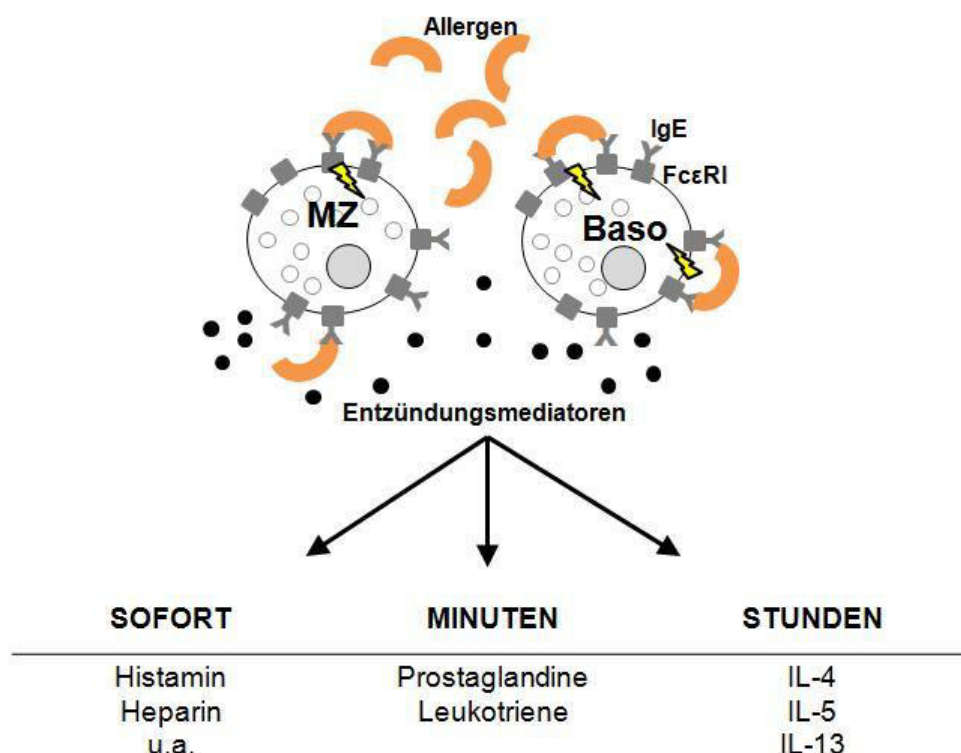


Abb. 2: Allergische Reaktion durch Kreuzvernetzung der Fc ϵ RI-Rezeptoren auf Effektorzellen. MZ Mastzelle, Baso Basophiler Granulozyt, Fc ϵ RI hochaffiner IgE-Rezeptor. (modifiziert nach [13])

Da sich Nahrungsmittelallergene nach Aufnahme durch die gastrointestinale Schleimhaut schnell via Blut und Lymphe im gesamten Körper verteilen [14, 15], bleibt die allergische Reaktion nicht auf den Darm beschränkt und kann ein oder mehrere Organsysteme betreffen. So sind typische Symptome der allergischen Sofortreaktion Urtikaria, Angioödem, Blutdruckabfall, Husten, Atemnot oder Erbrechen (siehe auch Abb. 4, Seite 11) [16]. Eine anaphylaktische Reaktion (Anaphylaxie) ist eine lebensbedrohliche generalisierte Akutreaktion, bei der mehrere Organsysteme betroffen sein können und es durch Freisetzung großer Mengen an Histamin, das u.a. die Gefäßpermeabilität steigert, über Volumenverschiebung von intra- nach extravasal zum anaphylaktischen Kreislaufschock kommen kann [17].

Im zeitlichen Verlauf der Reaktion lässt sich eine Früh- von einer Spätphase unterscheiden: Die Frühphase, die u.a. durch die Freisetzung von Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen verursacht wird, zeigt sich klinisch meist innerhalb weniger Minuten, kann aber auch noch innerhalb von 2 Stunden nach Allergenkontakt auftreten. Die Spätphase der allergischen Reaktion, die nach 6 bis 8 Stunden auftritt, wird durch die Interleukine IL-3, -5, -6 und Tumornekrose-Faktor- α (TNF α) eingeleitet, die die Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen und Basophilen Granulozyten veranlassen. Ein Beispiel für diese zellvermittelte Spätreaktion ist die Verschlechterung einer bestehenden Atopischen Dermatitis [1].

Mastzellen und Basophile Granulozyten

Mastzellen und Basophile Granulozyten sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, die durch Freisetzung von Mediatoren die Früh- und Spätphase der allergischen Reaktion beeinflussen [18]. Mastzellen sind gewebständige Zellen, die als noch nicht vollständig gereifte Zellen aus dem Knochenmark ins Gewebe einwandern und dort ausdifferenzieren. Sie befinden sich vorwiegend entlang von Gefäßen und in Haut und Schleimhäuten. Basophile Granulozyten dagegen zirkulieren im peripheren Blut und stellen dort ca. 1 % der Leukozytenpopulation dar. Sie sind den Mastzellen funktionell sehr ähnlich, entstammen jedoch einer eigenen hämatopoetischen Zellreihe, differenzieren unter dem Einfluss von IL-3 im Knochenmark und gelangen als vollständig ausgereifte Zellen in die Blutzirkulation. Basophileninfiltrate finden sich darüber hinaus in Geweben, die Schauplatz allergischer Reaktionen sind [19]. Die Aktivierung der Basophilen erfolgt hauptsächlich wie bei den Mastzellen über die Kreuzvernetzung der Fc ϵ RI-Rezeptoren durch Allergenbindung an membrangebundene IgE-Antikörper. Außerdem können Basophile IgE-unabhängig über Chemokine wie z.B. fMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), einem synthetischen Analogon eines bakteriellen

chemotaktischen Peptids [20], aktiviert werden [21]. Aktivierte Basophile setzen wie Mastzellen Histamin, Leukotriene, Prostaglandine und weitere Entzündungsmediatoren frei. Darüber hinaus fördern sie mit der Sekretion von IL-4 und IL-13 als Antwort auf IgE-abhängige und IgE-unabhängige Stimulation die T_{h2}-Polarisierung der Immunantwort [22-25].

T_{h1}-/T_{h2}-Dichotomie und regulatorische T-Zellen

T-Helfer-Lymphozyten (T_h-Zellen, CD4⁺-T-Zellen) als Subpopulation der T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle im allergologisch-immunologischen Geschehen. Sie lassen sich anhand der von ihnen sezernierten Zytokine (Tab. 1) weiter unterteilen in T_{h1}-Zellen, die an der zellvermittelten Immunantwort gegen Viren und intrazelluläre Bakterien, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, beteiligt sind, und in T_{h2}-Zellen, die die humorale Abwehr gegen extrazelluläre Pathogene und Parasiten, wie z.B. Helminthen, modulieren und wesentliche Akteure der allergischen Immunantwort sind [26].

Eine durch die Bindung des MHC-II-Antigen-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor aktivierte T_h-Zelle proliferiert unter autokriner IL-2-Stimulation und wandelt sich in eine sog. T_{h0}-Zelle um. In Abhängigkeit vom vorherrschenden Zytokinmilieu differenziert sich die T_{h0}-Zelle entweder in eine T_{h1}- oder T_{h2}-Zelle: In Anwesenheit von IL-12 und Interferon-γ (IFN-γ) differenzieren sich die Zellen unter Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet (T_{h1}-specific T box transcription factor) zu T_{h1}-Zellen und unter dem Einfluss von IL-4 wird die Differenzierung der T_{h0}-Zelle nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-3 (GATA binding protein 3) in Richtung T_{h2} gelenkt [27]. Die Herkunft des für die Ausbildung der T_{h2}-Polarisierung verantwortlichen Zytokinmilieus, ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Quelle sind Basophile

Tab. 1: T_{h1}- und T_{h2}-Zytokine. Gegenüberstellung der Hauptfunktionen ausgewählter T_{h1}- und T_{h2}-Zytokine [1].

T _{h1}		T _{h2}	
Zytokin	Funktion	Zytokin	Funktion
IFN-γ	Makrophagenaktivierung Ig-Klassenwechsel (IgG1) Hemmung der T _{h2} -Polarisierung	IL-4	B-Zell-Aktivierung Ig-Klassenwechsel (IgE) Induktion T _{h2} -Differenzierung
IL-2	T-Zell-Proliferation	IL-5	Eosinophilen-Proliferation/-Differenzierung
TNF-α	proinflammatorisch Endothelaktivierung	IL-10, IL-13	B-Zell-Proliferation/-Differenzierung Ig-Klassenwechsel (IgE) Hemmung T _{h1} -Polarisierung

Granulozyten, die in der Lage sind unter dem Einfluss von IL-3, IL-33, PAMPs (engl. pathogen-associated molecular patterns) und TLR (engl. toll-like receptor)-Liganden relevante Mengen an IL-4 und IL-13 zu produzieren und im Zusammenspiel mit dendritischen Zellen die Immunantwort in Richtung T_{h2} zu dirigieren [23-25, 28, 29].

In jüngster Zeit zeigte sich, dass neben den T_{h1} - und T_{h2} -Zellen weitere Populationen $CD4^+$ -T-Zellen existieren, die eine wichtige Rolle in der oralen Toleranzentwicklung gegenüber körperfremden Antigenen, und somit möglicherweise auch in der Genese allergischer Erkrankungen, zu spielen scheinen. Es handelt sich hierbei um regulatorische T-Zellen, die bei einem gesunden Individuum durch Produktion von IL-10 und Transforming-Growth-Faktor (TGF- β) die Immunantwort auf harmlose Nahrungsmittelproteine in Richtung Toleranz lenken. Sie werden als $CD4^+$ - $CD25^+$ - oder $Foxp3^+$ -T-Zellen beschrieben und scheinen unter dem Einfluss von Retinsäure aus naiven $CD4^+$ - T_h -Zellen hervorzugehen, wobei $CD103^+$ dendritische Zellen, die das fragliche Antigen den jeweiligen naiven T_h -Zellen präsentieren, in der Lage sind, Retinsäure aus Vitamin A herzustellen [30]. Welchen Einfluss regulatorische T-Zellen in der Pathogenese von Nahrungsmitteln haben, bleibt jedoch noch zu klären [31].

1.2. Erdnussallergie

1.2.1. Die Erdnuss

Die Erdnuss (*Arachis hypogaea*) ist eine ursprünglich in Südamerika beheimatete Pflanze mit relativ hohem allergenen Potenzial, die heute überwiegend in Westafrika, China, Indien, Nord- und Südamerika angebaut wird. Aufgrund ihres hohen Fett- und Proteingehalts (je 100 g rohe Erdnuss: 48 g Fett, 25 g Protein [33]) findet sie in der Lebensmittelindustrie vielfache Verwendung: Die Samen der Erdnuss eignen sich zur Ölgewinnung, sind gekocht oder geröstet beliebt zum Verzehr, in Back- und Süßwaren, als salzige Snacks oder in Form von Erdnussbutter und können geröstet auch als Kaffee-Ersatz verwendet werden. Die Erdnuss-Schale kann zur Herstellung von Papier und Dämmmaterial eingesetzt werden.

Anders als ihr Name vermuten lässt, ist die 20-50 cm hohe Erdnuss-Pflanze keine Nussfrucht, sondern gehört zu den *Leguminosae* (oder *Fabaceae*, Hülsenfrüchtler), einer Pflanzenfamilie zu der auch Sojabohnen, Erbsen, Bohnen und Linsen zählen. Innerhalb dieser Familie ist sie den Schmetterlingsblütlern zugeordnet und bringt von Mai bis August goldgelbe, sich selbst befruchtende Blüten hervor. Nach der Befruchtung wachsen die geokarpen Früchte in die Erde hinein, was der Pflanze ihren Namen gab [34] (Abb. 3).



Abb. 3: *Arachis hypogaea*. [35]

Allergene der Erdnuss

Ein Großteil der bisher bekannten Erdnussallergene gehört zu den Samenspeicherproteinen, darunter die Hauptallergene Ara h1, Ara h2, Ara h3 und Ara h6 (Tab. 2). Wobei die meisten Erdnussallergiker IgE-Antikörper gegen Ara h2 und Ara h6 produzieren [41-43]. Ara h2 scheint das Allergen mit der größten IgE-Reaktivität zu sein und ist besonders resistent gegenüber der gastralen Verdauung durch Pepsin. Ara h6 kann als Struktur-Homolog zu Ara h2 beschrieben werden und hat dem Ara h2-Allergen sehr ähnliche Eigenschaften. Die Allergene Ara h1 und Ara h3 werden dagegen von weniger Erdnussallergikern erkannt, haben eine im Vergleich zu Ara h2 und Ara h6 geringere IgE-Reaktivität und sind weniger verdauungsstabil [41-44]. Produzieren erdnussallergische Patienten IgE gegen Ara h2 und Ara h6 und zusätzlich gegen Ara h1 und Ara h3, ist dies möglicherweise ein Indikator für das Auftreten schwerer allergischer Reaktionen [45].

Die hohe Allergenität scheint neben der hohen Thermostabilität der Erdnussallergene und ihrer hohen Resistenz gegenüber gastraler Verdauung auch durch die Art der Zubereitung beeinflusst zu werden. So besitzen gekochte oder frittierte Erdnüsse eine geringere Ara h 1-, Ara h2- und Ara h3-IgE-Bindungsfähigkeit als geröstete Erdnüsse. Beim Rösten (150 bis 170°C) entwickeln sich wesentlich höhere Temperaturen als beim Kochen (100°C) oder Frittieren (120°C) wodurch die chemische Modifikation von Seitenketten des Allergenmoleküls begünstigt wird. Ein Beispiel hierfür ist die Maillard-Reaktion, die zur Stabilisierung des Allergenmoleküls beiträgt [46, 47]. Shreffler et al. zeigten darüber hinaus, dass glykosyliertes Ara h1 als T_{h2}-Adjuvant agieren kann indem es dendritische Zellen dahingehend aktiviert, die Reifung von T_{h2}-Zellen zu fördern [48].

Tab. 2: Übersicht bisher identifizierter Erdnussallergene [36-39].

Hauptallergene sind **fett** gekennzeichnet. *Bet v1* Birkenpollenallergen.

Allergen	Proteinfamilie
Ara h1	Vicilin, Samenspeicherproteine
Ara h2, Ara h6, Ara h7	Conglutin, Samenspeicherproteine
Ara h3, Ara h4 (=Ara h3.02)	Cupin, Samenspeicherproteine
Ara h5	Profilin, Aktin-bindende Proteine für den Zytoskelettaufbau
Ara h8	Pathogen-related protein (PR-10); <i>Bet v1</i> -Homolog [40]
Ara h9	Lipid-Transferprotein
Ara h10, Ara h 11	Oleosin, Samenspeicherproteine
Ara h12, Ara h13	Defensin, Proteine zur Pathogenabwehr

1.2.2. Epidemiologie und Risikofaktoren der Erdnussallergie

Die Prävalenz der Erdnussallergie ist weltweit sehr variabel, in westlichen Ländern wird sie mit 0,8 bis 2 % der pädiatrischen Population angegeben [49-52]. In Asien und Ländern mit hohem Erdnussverzehr wie z.B. Israel tritt die Erdnussallergie hingegen weniger häufig auf [51, 53]. Ein Anstieg der Prävalenz wird diskutiert, doch Kohortenstudien in Großbritannien und Kanada lassen eher eine gleichbleibende Rate an erdnussallergischen Kindern in den letzten 10 bis 15 Jahren vermuten [50, 54]. Die Erdnussallergie gehört zu den häufigsten Ursachen nahrungsmittelinduzierter Anaphylaxie. Circa 60 % der durch Nahrungsmittel verursachten anaphylaktischen Reaktionen mit tödlichem Ausgang in den USA sind auf Erdnuss zurückzuführen [55, 56]. Im Zeitraum 1999 bis 2006 konnten Pumphrey et al. von 48 durch eine Nahrungsmittelallergie ausgelösten Asthmaanfällen mit Todesfolge 9 (19 %) auf den Verzehr von Erdnuss zurückführen [57].

Es wird eine Vielzahl an Faktoren diskutiert, die die Entwicklung einer Erdnussallergie beeinflussen, es ist jedoch unklar ob und in welchem Ausmaß diese eine Rolle im Prozess der Sensibilisierung bzw. Toleranzentwicklung auf Erdnuss spielen [58]. U.a. zeigen z.B. Studien aus Großbritannien, dass eine positive Familienanamnese für Atopie im Allgemeinen und für Erdnussallergie im Besonderen das Risiko erhöht selbst eine Erdnussallergie zu entwickeln [59-61]. Es ist umstritten inwiefern ein Zusammenhang besteht zwischen Erdnussensibilisierung und mütterlichem Erdnusskonsum in Schwangerschaft und Stillzeit oder früher oraler Erdnusszufuhr im Säuglingsalter, ob bewusst als Bestandteil der Beikost oder unbewusst z.B. über erdnussöhlhaltige Vitamin-D-Präparate [60, 62-64]. Da in vielen Fällen bereits auf den ersten bekannten Erdnussverzehr eine allergische Reaktion beobachtet wird, wird bei Kindern mit atopischer Dermatitis auch eine Sensibilisierung über die Haut angenommen, beispielsweise durch Benutzung von erdnussöhlhaltigen Pflegeprodukten oder durch Kontakt zu kontaminierten Oberflächen in der Küche, in Restaurants, über die Hände etc. [60, 65].

Akzidentelle Reaktionen

Allergische Reaktionen auf akzidentellen Erdnusskontakt sind ein häufiges Problem, dem sich Erdnussallergiker ausgesetzt sehen. Die Inzidenz symptomatischer akzidenteller Erdnussexposition bei Kindern wird mit 7 bis 14 % pro Jahr angegeben, ca. 60 % der Erdnussallergiker erfährt mindestens einmal innerhalb von fünf Jahren eine akzidentelle allergische Reaktion [66-68]. Die häufigste Form der akzidentellen Exposition ist dabei mit ca. 70 % die Ingestion, gefolgt von Hautkontakt (15 %) und Inhalation (5 %). Auch ein Kuss oder

gemeinsame Besteckbenutzung kann für erdnussallergische Patienten risikoreich sein. Ara h1 konnte bis zu 1 Stunde nach dem Verzehr eines Erdnussbutter-Sandwiches im Speichel nachgewiesen werden [69,70]. Die Mehrzahl der akzidentellen Erdnussexpositionen geschieht im eigenen Haushalt oder bei Verwandten und Freunden, in Restaurants oder in Schule/Hort/Kindergarten. Als Risikofaktoren für schwere akzidentelle Reaktionen werden koexistierendes Asthma bronchiale, Adoleszenz, hohe erdnusspezifische IgE-Werte, und eine erst kurz zurückliegende Diagnosestellung genannt [52, 67, 68].

1.2.3. Klinische Aspekte der Erdnussallergie

Die klinischen Manifestationen einer Nahrungsmittelallergie sind vielfältig und betreffen v.a. die Haut, den Gastrointestinal-Trakt und/oder das Respirationssystem. So findet sich auch bei Erdnussallergikern das gesamte Spektrum allergischer Symptome (Abb. 4). Nach oraler Erdnussaufnahme kommt es zumeist neben lokalen Reaktionen wie z.B. perioraler Urtikaria auch zu systemischen Reaktionen, wobei isoliert ein Organ betroffen sein kann oder auch mehrere Organsysteme Reaktionen zeigen können. Erstreaktionen betreffen meist die Haut, in 50 % der Fälle den Respirationstrakt und zu 30 % den Gastrointestinaltrakt. Zwei Organsysteme sind bei ca. einem Drittel der Patienten betroffen und bei einem Fünftel reagieren Haut, Respirations- und Gastrointestinaltrakt [71]. Schon kleinste Allergenmengen können schwere lebensbedrohliche Reaktionen auslösen. In der Literatur werden Schwellenwerte von bis zu 0,1 mg Erdnussprotein genannt, entsprechend 0,4 mg ganzer Erdnuss bzw. weniger als ein Hundertstel eines Erdnusskorns [72]. Die Erdnussallergie gehört zu den häufigsten Ursachen nahrungsmittelinduzierter Anaphylaxie.

Auf Hautkontakt mit Erdnuss reagieren Allergiker in der Regel mit einer lokal begrenzten Reaktion, zumeist Urtikaria, Pruritus und Erythem, evtl. Angioödem [73]. Auch inhalative Erdnussexposition durch Staub, Mehl oder Aerosole (beim Kochen) kann in besonders sensiblen Patienten oder bei großer Allergenmenge allergische Reaktionen auslösen [74]. Bei älteren Kindern und Erwachsenen werden Kreuzreaktionen auf das Betv1-Allergen von Birkenpollen, ein Strukturhomolog des Ara h8-Allergens der Erdnuss, beobachtet, die sich als Kribbeln und Juckreiz im Mund, orales Allergiesyndrom (OAS) genannt, äußern [40]. Rund zwei Drittel der Patienten mit Erdnussallergie sind auf weitere Nahrungsmittelallergene sensibilisiert bzw. ko-allergisch. Häufig sind Ko-Allergien auf Baumnüsse, aber auch je nach Alter des Patienten Allergien auf Kuhmilch, Hühnerei, Fisch, Meeresfrüchte, Soja, Weizen oder Sesam [49, 75].

Einleitung

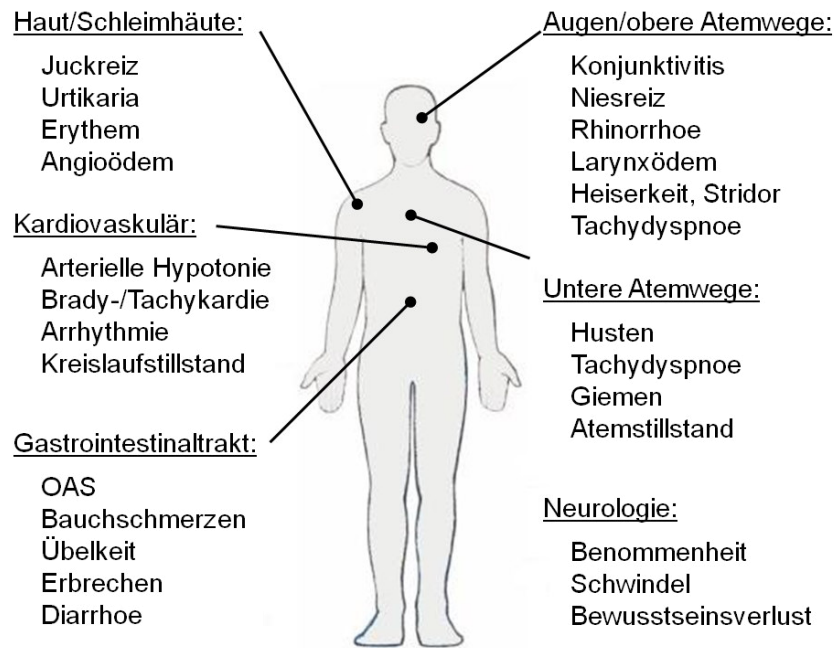


Abb. 4: Symptome der allergischen Sofortreaktion. OAS Orales Allergiesyndrom (Juckreiz oder Kribbeln/Brennen im Mund/Rachenbereich, Lippen-/Zungenschwellung, Enanthem).

Ein Großteil der Erdnussallergiker leidet außerdem an Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis: 60 bis 75 % an Asthma bronchiale und/oder Atopischer Dermatitis und 55 bis 60 % an Allergischer Rhinokonjunktivitis [76].

Die Diagnosestellung einer Erdnussallergie erfolgt meist im Alter von 1 bis 2 Jahren, eine spätere Manifestation ist jedoch möglich [12]. Eine „Late onset“-Erdnussallergie kann auch als OAS in Assoziation mit einer Birkenpollenallergie auftreten [40, 52]. Die klassische Erdnussallergie mit Erkrankungsbeginn im Kleinkindalter persistiert im Gegensatz zu anderen Nahrungsmittelallergien, wie der Kuhmilch- oder Hühnereiallergie, meist bis ins Erwachsenenalter. Nur 15 bis 20 % der Kinder entwickeln bis zu ihrem fünften Lebensjahr eine Toleranz gegenüber Erdnuss, wobei Pricktest und erdnusspezifisches IgE meist weiterhin positiv bleiben, auch wenn klinisch keine Allergie mehr besteht. Eine Wiederkehr der Erdnussallergie nach Toleranzentwicklung ist möglich, meist wenn Erdnuss weiterhin nicht regelmäßig verzehrt worden ist [8, 12, 78].

1.2.4. Diagnostik

Der Verdacht auf eine Erdnussallergie besteht, wenn Patienten, in der Regel Kinder, oder deren Eltern von allergischen Symptomen berichten, deren Auftreten möglicherweise in Zusammenhang mit Erdnussverzehr stehen könnte. Aber auch bei Kindern mit atopischer Dermatitis oder positiver Familienanamnese für Erdnuss- bzw. Nahrungsmittelallergien, die aus Vorsicht bisher noch nie Erdnuss gegessen haben, und bei Patienten mit dem Zufallsbefund einer Erdnussensibilisierung kann eine klinisch relevante Erdnussallergie vorliegen. Aus der Anamnese gilt es u.a. zu eruieren (1) ob die geschilderten Symptome mit einer allergischen Reaktion vereinbar sind, (2) wie lange die letzte Erdnussexposition zurückliegt, (3) ob jemals Erdnuss vorher verzehrt worden ist, ohne dass allergische Symptome aufgetreten sind und (4) ob es anaphylaktische Reaktionen auf Erdnussverzehr gegeben hat. Bei anamnestischem Verdacht auf eine Erdnussallergie ist die nächste Stufe des Diagnosealgorithmus die Bestimmung von erdnusspezifischen IgE und/oder die Durchführung eines Hautpricktests. Bei erdnusspezifischem IgE $> 0,35 \text{ kU}_A/\text{L}$ und/oder erdnusspezifischem Quaddeldurchmesser im Haut-Prick-Test $\geq 3 \text{ mm}$ spricht man von einer Erdnuss-Sensibilisierung. In Zusammenschau mit der Anamnese ist bei berichteter Anaphylaxie in der Vorgeschichte und vorliegender Erdnuss-Sensibilisierung von einer bestehenden klinisch relevanten Erdnussallergie auszugehen. Bei allen anderen Patienten mit Erdnuss-Sensibilisierung als auch bei unklaren Anaphylaxiefällen sollte zum Nachweis einer klinisch relevanten Erdnussallergie eine orale Erdnussprovokation durchgeführt werden. (Abb. 5) [79-81].

1.2.5. Orale Erdnussprovokation

Das Ziel der oralen Provokationstestung ist der Nachweis einer klinisch relevanten Nahrungsmittelallergie bei anamnestischem Verdacht, bei vorliegender Sensibilisierung mit unklarer klinischer Relevanz und zur Überprüfung der klinischen Aktualität einer bestehenden Allergie [82]. Die orale Erdnussprovokation wird idealerweise als doppelblind placebokontrollierte Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC, engl. double blind placebo controlled food challenge) durchgeführt, kann in bestimmten Fällen jedoch auch offen durchgeführt werden (Abb. 5). Sie sollte im Rahmen eines stationären/tagesklinischen Aufenthaltes und unter Vorhaltung entsprechender Notfallmedikamente stattfinden. In einer geeigneten Matrix, beispielweise in Form von Keksen oder Pudding, erfolgt die Verabreichung von Erdnuss in titrierten Dosierungsschritten, zumeist

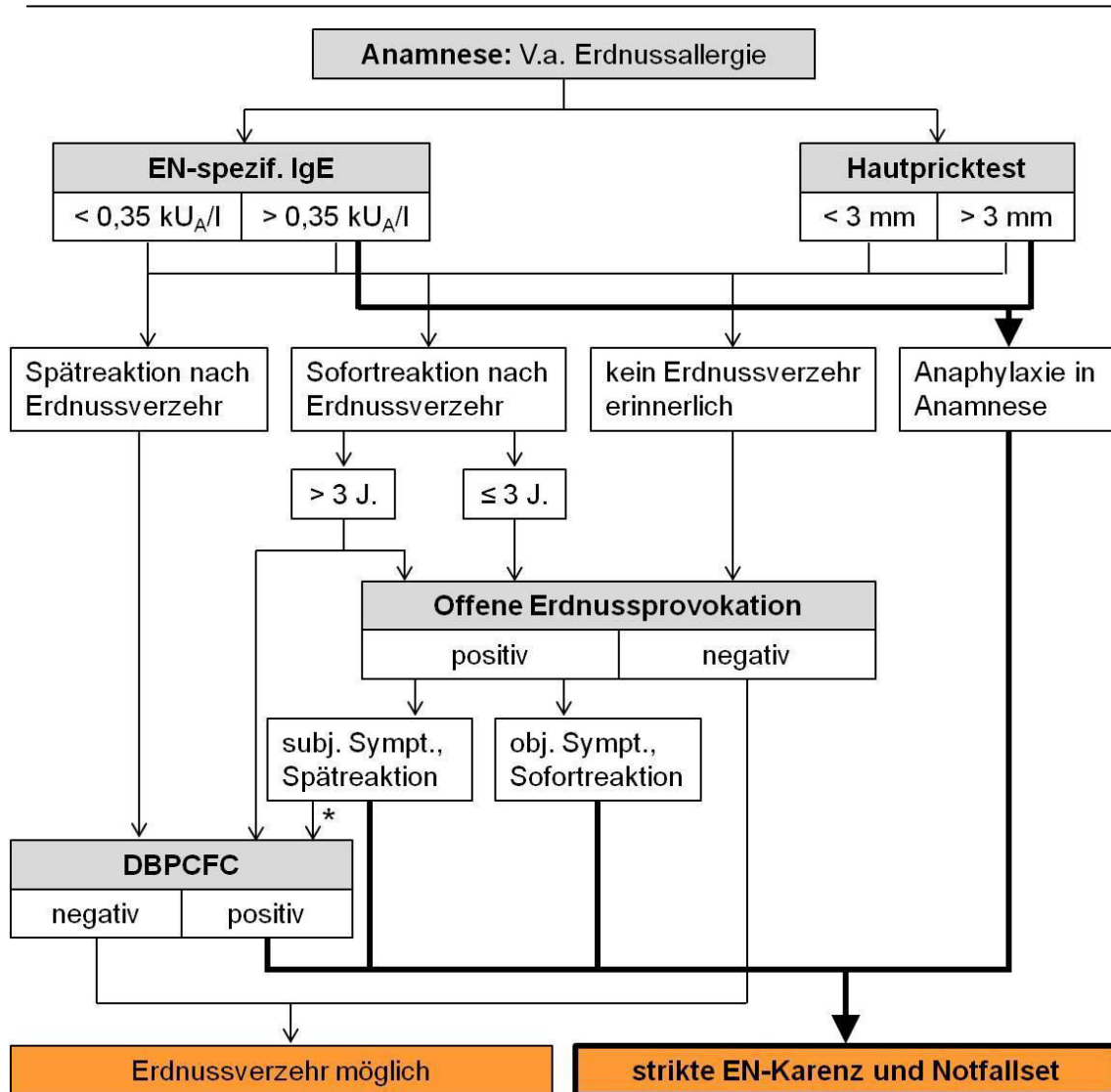


Abb. 5: Fließschema zur Diagnostik der Erdnussallergie. * In der klinischen Praxis wird i.d.R. nach subjektiven Symptomen unter offener Provokation die Diagnose einer Erdnussallergie gestellt ohne zusätzliche DBPCFC; Spätreaktionen auf Erdnuss sind sehr selten. *V.a. Verdacht auf, EN Erdnuss, subj. subjektiv, obj. objektiv, DBPCFC double blind placebo controlled food challenge.*

mit einem Steigerungsintervall von ca. 30 Minuten. Tritt im Laufe der Provokation eine allergische Reaktion in Form objektiver und/oder je nach Provokationsprotokoll auch subjektiver Symptome auf, so gilt die Provokation als positiv und wird beendet [83, 84].

Prädiktoren der Reaktion unter oraler Provokation

In der Diagnostik von Nahrungsmittelallergien im Allgemeinen und der Erdnussallergie im Besonderen besteht das Problem, dass einerseits die orale Provokation als Goldstandard der Diagnosestellung gilt [81], andererseits eine Abschätzung der Reaktion, sei es hinsichtlich der

Reaktionsschwere oder hinsichtlich der Reaktionsdosis, nicht im Voraus möglich ist. Eine orale Erdnussprovokation ist immer mit einem Risiko für den Patienten verbunden, schwere allergische Reaktionen zu erleiden. Es wäre daher hilfreich anhand von anamnestischen Angaben oder immunologisch-diagnostischen Parametern eine Vorhersage über die individuelle Reaktionsschwelle und Reaktionsschwere eines Patienten treffen zu können. Möglicherweise ließen sich so auch Rückschlüsse auf die Art der zu erwartenden Reaktionen bei akzidenteller Erdnussexposition ziehen. Als Prädiktoren kämen neben Daten aus der Anamnese, wie Begleiterkrankungen, Schweregrad vorangegangener Reaktionen etc., auch diagnostische Parameter in Frage, wie z.B. Reaktion im Hautpricktest oder Höhe des spezifischen IgE.

In der Literatur finden sich wenige Studien über Korrelationen von anamnestischen oder diagnostischen Parametern und der Reaktion unter oraler Nahrungsmittelprovokation mit widersprüchlichen Ergebnissen. Ein Großteil dieser Studien betrachtet nur eine kleine Studienpopulation, wertet retrospektive Daten aus und berücksichtigt nur Patienten ohne Anaphylaxie in der Vorgeschichte. Darüber hinaus zeigen Methodik und Ergebnisse der Studien kein einheitliches Bild [85-91].

Schwellenwerte

Die derzeit einzige Therapieoption für Erdnussallergiker ist die strikte Vermeidung von jedwedem Erdnusskontakt. Da Erdnüsse jedoch breiten Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie finden, sind Erdnussallergiker einem hohen Risiko ausgesetzt über kreuzkontaminierte Nahrungsmittel unbeabsichtigt mit Erdnuss in Kontakt zu kommen und akzidentelle Reaktionen zu erleiden. Nach EU-Recht sind Lebensmittelhersteller verpflichtet, allergene Inhaltsstoffe verpackter Waren zu kennzeichnen, sofern sie als Zutat im Rezept vorgesehen sind [92]. Unbeabsichtigte Produktkontamination mit Spuren des Allergens ist dagegen nicht kennzeichnungspflichtig. Um sich haftungsrechtlich abzusichern weisen Hersteller jedoch oft vorsorglich auf mögliche Kreuzkontamination mit freiwilligen Vermerken wie „Kann Spuren von Erdnuss enthalten“ hin. Durch Hinweise dieser Art wird die Lebensmittelauswahl von Allergikern jedoch unnötig eingeschränkt. So enthielt nur 1 von 26 Produkten (4%) mit dem Vermerk „Kann Erdnuss enthalten“, die das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg im Jahr 2005 untersuchte, tatsächlich Erdnuss [93] und in den USA fanden Hefle et al. in 20 von 200 Nahrungsmitteln mit vorsorglicher Kennzeichnung Erdnussprotein [94]. Andererseits ist die Abwesenheit eines Hinweises auf Allergenspuren keine Garantie für ein tatsächlich allergenfreies und damit ohne Risiko verzehrbares Nahrungsmittel. Um diesem

Problem Abhilfe zu schaffen, spielt die Festlegung von Standards zur Deklaration von Kreuzkontamination und damit verbunden die Bestimmung von Schwellenwerten für Allergenkonzentrationen eine wichtige Rolle. Ein Schwellenwert ist die Allergenmenge, deren Überschreitung bei Allergikern zum Auftreten allergischer Symptome führen kann, wobei zwischen No-Observed-Adverse-Effect-Levels (NOAELs) und Lowest-Observed-Adverse-Effect-Levels (LOAELs) unterschieden wird. NOAELs geben die höchste Allergenkonzentration an, die bei Kontakt bei Allergikern keine Symptome auslöst. Mit LOAEL wird die kleinste Allergenmenge bezeichnet, die bei Allergikern eine Reaktion hervorruft. Der tatsächliche Schwellenwert liegt meist zwischen diesen beiden Werten. Zur Bestimmung allergenspezifischer Schwellenwerte eignen sich titrierte orale Provokationstestungen, allerdings mit einigen Einschränkungen:

1. NOAELs bzw. LOAELs können tagesaktuell bei ein- und demselben Patienten schwanken, beeinflusst z.B. durch Infekte, körperliche oder psychische Belastung aber auch durch Alkohol und Nikotin [95].

2. Ziel oraler Provokationstestungen ist in der Regel eine ja-/nein-Antwort auf die Frage nach einer vorliegenden Allergie, daraus ergibt sich zumeist eine für die NOAEL-Bestimmung zu hohe Startdosis. Darüber hinaus birgt das übliche Steigerungsintervall von 30 Minuten die Gefahr von falsch hohen Schwellenwerten, da Symptome u.U. fälschlicherweise der höheren, schon verabreichten Dosis zugeordnet werden.

3. Patienten mit bekannten schweren allergischen Reaktionen in der Vorgeschichte oder mit hohem Sensibilisierungsgrad (spezif. IgE, Hautpricktest) werden nicht oder nur sehr selten einer oralen Provokation unterzogen [96]. Doch stellen vermutlich gerade diese Patientengruppen eine Hochrisikogruppe dar, deren Schutz durch festgelegte Schwellenwerte zur Lebensmittelkennzeichnung von besonderem Interesse sein sollte.

Mittels Intervall-zensierter Überlebensanalysen können anhand individueller NOAELs und LOAELs, die zuvor in Studienpopulationen durch orale Provokation ermittelt worden sind, annäherungsweise Schwellenwerte berechnet werden, die in einem bestimmten Prozentsatz aller Allergiekranke wahrscheinlich allergische Reaktionen auslösen würden [97, 98]. In der Literatur werden vorrangig Schwellenwerte angegeben, die in 5 oder 10 % der Erdnussallergiker Symptome provozieren, die sog. ED₅ und ED₁₀ (eliciting dose, engl. für Reaktionsdosis) (z.B. Taylor et al., Blom et al., Eller et al. [99-101]).

1.3. Fragestellung der Arbeit

Ziel vorliegender Arbeit war es zum Einen, Reaktionsschwellen unter oraler Erdnussprovokation in einer Population von Hoch-Risiko-Erdnussallergikern zu ermitteln, die Teilnehmer einer Studie zur oralen Immuntherapie bei Erdnussallergie waren. Hierbei kam ein modifiziertes Protokoll für orale Erdnussprovokation mit Steigerungsintervall von 2 Stunden zur Anwendung, um eventuell genauere Reaktionsschwellen zu bestimmen.

Zweites Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktionsschwere und Reaktionsdosis unter oraler Provokation bei einer Hochrisikogruppe von erdnussallergischen Kindern mit anamnestischen, klinisch-diagnostischen und immunologischen Parametern zu korrelieren, und anhand dessen Vorhersagewerte für die klinische Reaktion unter oraler Erdnussprovokation zu identifizieren. Als immunologische Parameter sollten neben der Bestimmung von spezifischem IgE, die Basophilenreaktivität und das T-lymphozytäre Zytokinmuster dienen.

Es ergaben sich also folgende Fragestellungen:

- In welcher Höhe konnten Schwellenwerte in einer Hochrisikogruppe von Erdnuss-Allergikern bestimmt werden, die mittels eines modifizierten Protokolls für orale Erdnussprovokation ermittelt wurden, dessen Hauptschwerpunkt ein 2-stündliches Steigerungsintervall an Erdnussgaben vorsah?
- Konnten Prädiktoren für die klinische Reaktion unter oraler Provokation bei diesen erdnussallergischen Kindern identifiziert werden?
 - a. Korrelierten Reaktionsdosis und Schweregrad unter oraler Erdnussprovokation?
 - b. Gab es Angaben aus der Anamnese wie z.B. Vorliegen atopischer Erkrankungen, Alter des Patienten oder Anzahl und Schweregrad vorhergegangener akzidenteller Reaktionen, anhand derer Rückschlüsse auf die Reaktionsdosis oder die Reaktionsschwere unter oraler Provokation gezogen werden konnten?
 - c. Ließen sich Marker der Sensibilisierung (erdnusspezifisches IgE, Ara h2- spezifisches IgE, Hautpricktest) mit Reaktionsdosis oder -schwere korrelieren?
 - d. Konnten Parameter des Basophilenaktivierungstests mit der klinischen Reaktion unter Erdnussprovokation korreliert werden?
 - e. Korrelierten T-lymphozytäres Zytokinmuster und Reaktionsdosis oder Reaktionsschwere miteinander?

2. Material und Methoden

2.1. Das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv vorliegender Arbeit umfasst 63 Erdnuss-allergische Kinder im Alter von 3 bis 18 Jahren, die an einer Studie zur Oralen Immuntherapie teilnehmen wollten. Insgesamt wurden 186 Kinder mit vermuteter Erdnuss-Allergie aus der Kinderallergieambulanz der Charité, deren Datenbank und anhand von Datenbanken über Erdnuss-sensibilisierte Patienten der anderen beteiligten Kliniken rekrutiert. Folgende weitere Kliniken nahmen als Kooperationspartner an der Studie teil:

- Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg
- Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, München
- St. Josef-Hospital, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Ruhr-Universität Bochum, Bochum
- Klinik für pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover
- Zentrum für Kinder und Jugendmedizin, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg im Breisgau
- Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden, Dresden

71 Kinder erfüllten die folgenden Einschlusskriterien: Vorliegen einer Erdnuss-Sensibilisierung (Erdnuss-spezifisches IgE > 0,35 kU/l) und keine Durchführung einer anderen Immuntherapie, falls die Kinder an Asthma bronchiale litten, sollte dies stabil sein. Im Zeitraum zwischen der Einschlussuntersuchung und der stationär durchgeführten oralen Erdnussprovokation, entschieden sich vier Patienten aus Angst vor der oralen Provokation oder aufgrund von Befürchtungen, die orale Immuntherapie würde zu zeitaufwändig werden, gegen eine Teilnahme an der Studie. Bei den verbliebenen 67 Patienten wurde stationär eine offene orale Erdnussprovokation durchgeführt. Vier dieser Patienten waren tolerant und zeigten keine allergische Reaktion unter der Provokation. Somit wurden sie von der Studienteilnahme ausgeschlossen (Abb. 6).

Alle Untersuchungen wurden mit dem schriftlichen Einverständnis der Eltern durchgeführt und waren durch die lokalen Ethikkommissionen genehmigt.

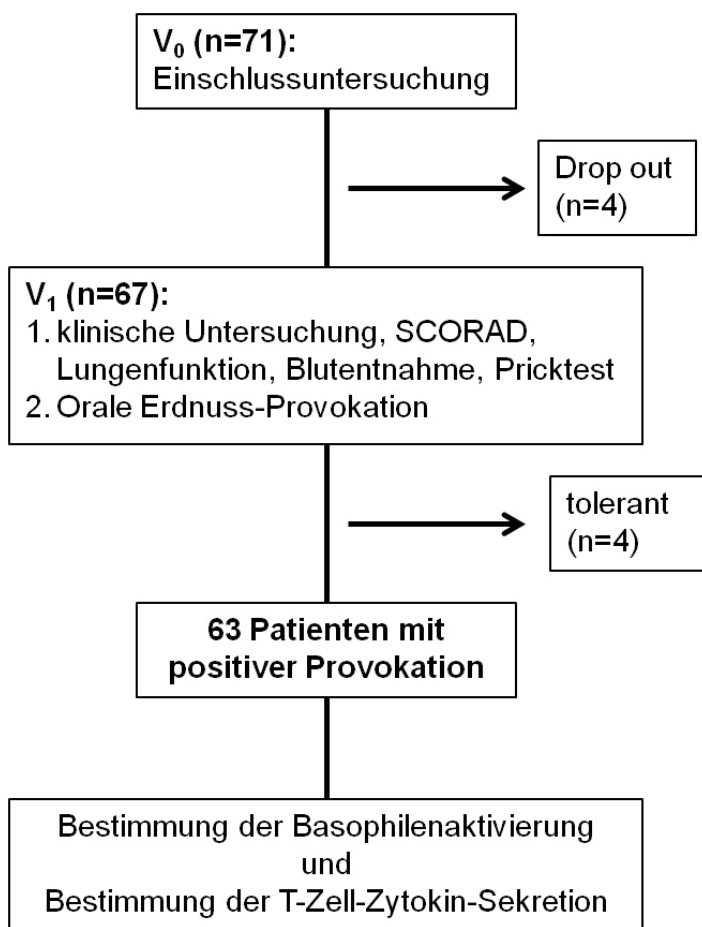


Abb. 6: Studiendesign

V – Visite

2.2. Studiendesign

Bei der Einschlussuntersuchung (Visite 0, V_0) wurden Anamnese, körperliche Untersuchung und der Status der Erdnuss-Sensibilisierung erhoben. Circa acht Wochen später erfolgte die stationäre Aufnahme der Kinder für die orale Erdnussprovokation (Visite 1, V_1). Vor Beginn der Provokation wurde die Stabilität vorliegender atopischer Erkrankungen wie Atopischer Dermatitis oder Asthma bronchiale mittels Anamnese, SCORAD und Lungenfunktionsprüfung sichergestellt. Desweiteren wurde klinisch eine Infektion durch eine klinische Untersuchung und Messung von Vitalparametern und der Rektal-Temperatur ausgeschlossen. Außerdem wurde ein Hautpricktest durchgeführt, die Patienten erhielten einen peripher-venösen Zugang und eine Blutentnahme für die Analyse von B-Zell-, T-Zell- und Effektor-Zell-Markern. Die Blutproben wurden innerhalb von 2 Stunden nach Abnahme analysiert, Serum wurde für die weitere Untersuchung der IgE-Antikörper bei -80 °C aufbewahrt (Abb. 6).

2.3. Orale Erdnussprovokation

2.3.1. Provokations-Protokoll

Die orale Erdnussprovokation wurde als offene Provokation über insgesamt drei Tage durchgeführt. Sowohl das Procedere der Provokation als auch die Kriterien, die Provokation abzubrechen und als positiv zu bewerten, richteten sich nach den Empfehlungen des PRACTALL Consensus Reports [83]. Die Patienten erhielten zerkleinerte, in Apfelmus eingerührte, geröstete Erdnuss in sieben semi-logarithmisch aufsteigenden Dosierungsschritten, beginnend mit einer Dosis von 12 mg Erdnuss (entspricht 3 mg Erdnuss-Protein [33]). Um die Reaktionsdosis unter Provokation präziser bestimmen zu können, wurde ein hinsichtlich des Steigerungsintervalls vom Standardprotokoll abweichendes Provokationschema gewählt: Die Dosissteigerungen erfolgten im Intervall von 120 Minuten, anstelle des im Standardprotokoll vorgesehenen Steigerungsintervalls von 30 Minuten. Am ersten Provokationstag erhielten die Patienten 12 - 40 - 120 - 400 mg Erdnuss, am Folgetag 400 - 1200 - 4000 - 12000 mg Erdnuss. Bei ausbleibender Reaktion wurde am dritten Tag einmalig die Kumulativdosis von 18 g Erdnuss (4,5 g Erdnuss-Protein) verabreicht. Beim Auftreten objektiver allergischer Symptome wurde die Provokation beendet. Subjektive Symptome und Symptome wie Flush, periorale Urtikaria und Erbrechen unmittelbar nach Verabreichung der Erdnussdosis wurden registriert, waren jedoch keine Abbruchkriterien. Die Beurteilung der Reaktion und die Entscheidung zum Abbruch der Provokation lagen in der Verantwortung einer einzigen Studienärztin. Systemische Glukokortikoide und Antihistaminika wurden 72 Stunden vor Provokation, kurzwirksame inhalative β_2 -Mimetika am der Tag der Provokation abgesetzt. Kombinationstherapien aus inhalativen langwirksamen β_2 -Mimetika und Glukokortikoiden oder orales Montelukast wurden beibehalten, wenn dies die Dauermedikation des Patienten darstellte.

2.3.2. Auswertung der Provokation

Alle 63 Patienten, die unter der Provokation eine allergische Reaktion aufwiesen, wurden in die Datenanalyse aufgenommen. Die Schwere der Reaktion wurde mittels zweier Merkmale genauer charakterisiert: 1. Reaktionsdosis, definiert als die Erdnussdosis, bei der erste objektive allergische Symptome auftraten, 2. klinische Schwere der allergischen Reaktion, wobei die schwerste aufgetretene objektive Reaktion den Schweregrad bestimmte. Die Reaktionsschwere wurde modifiziert nach dem Schweregradschema für Nahrungsmittel-induzierte Anaphylaxie in fünf Schweregrade eingeteilt [87, 102] (Tab.3).

Außerdem wurden zur weiteren Datenanalyse die Patienten in zwei Gruppen je nach Merkmal

eingeteilt: Hinsichtlich der *Reaktionsdosis* wurden die Gruppen „niedrige Reaktionsdosis“, definiert als Reaktionsdosis unter Provokation von kleiner oder gleich 1200 mg, und „hohe Reaktionsdosis“, definiert als Reaktionsdosis unter Provokation größer oder gleich 4000 mg, unterschieden. Bezüglich des *Schweregrades* unter Provokation wurden die Patienten in die Gruppen „Schweregrad I-III“ und „Schweregrad IV/V“ aufgeteilt.

Tab. 3: Schweregradeinteilung (modifiziert nach Sampson [102])

¹ leichte Lippenschwellung. ² deutliche Lippen-, Augenlid- oder Ohrschwellung. ³ ≥ 3 Nicht-Kontakt-Urtikaria. ⁴ Zeit von der Erdnussgabe bis zur Reaktion >10 Minuten.

Die Symptome, die in vorliegender Studie auftraten und zum Abbruch der Provokation führten, sind **fett** markiert. Jeweils das schwerste aufgetretene objektive Symptom bestimmte die Zuordnung des Schweregrades. Waren mehrere Organsysteme betroffen, so führte dies nicht zur Einordnung in eine höhere Schweregradstufe.

Grad	Haut	Gastrointestinaltrakt	Respirationstrakt	Kardiovaskuläres System	Neurologie
I	leichter Flush, Angioödem¹ , periorale Urtikaria	–	–	–	–
II	Flush, Angioödem² , generalisierte Urtikaria³	einmaliges Erbrechen⁴	leicht verstopfte Nase oder Niesreiz leichte Rhinokonjunktivitis	–	–
III	wie Grad I/II	mehrmaliges Erbrechen, Diarrhoe	deutlich verstopfte Nase, schwere Rhinokonjunktivitis , Kloßgefühl im Hals, trockener Husten	Tachykardie (Anstieg ≥ 15 /min)	–
IV	wie Grad I/II	wie Grad I-III	Heiserkeit, Dysphagie, bellender Husten , Pfeifen/Giemen , Peak-Flow-Abfall , Stridor , Dyspnoe , Zyanose	Arrhythmie, leichte arterielle Hypotonie	–
V	wie Grad I/II	wie Grad I-III	Atemstillstand	schwere Bradykardie, arterielle Hypotonie, Kreislaufstillstand	Bewusstseinsverlust

2.3.3. Weitere Schweregradeinteilungen

Um die Aussagekraft des in vorliegender Arbeit angewendeten Schweregradsystems (Sampson [102]) besser einschätzen zu können, wurde die klinische Reaktion unter oraler Provokation zusätzlich anhand der Anzahl betroffener Organsysteme (*Grad I* ein Organsystem betroffen, *Grad II* zwei und *Grad III* drei Organsysteme betroffen) und anhand folgender in der Literatur veröffentlichter Schweregradsysteme ausgewertet. Wir verwendeten jeweils nur die in der Publikation genannten objektiven Symptome der unterschiedlichen Schweregradsysteme zur Einteilung:

Mueller [103]: *Grad I* Urtikaria, Angioödem, Rhinitis, Konjunktivitis; *II* Diarrhoe, Erbrechen; *III* Asthma, Heiserkeit, Pfeifen/Giemen, Atemnot, O₂-Sättigungsabfall, Peak-Flow-Abfall; *IV* Tachykardie, Bradykardie, Arrhythmie, arterielle Hypotension, Herzkreislaufstillstand, Bewusstlosigkeit. *Milde Reaktion* = Grad I. *Moderate Reaktion* = Grad II. *Schwere Reaktion* = Grad III und IV.

Astier et al. [104]: *Grad I* Rhinokonjunktivitis, <10 Urtikaria; *II* ein Organsystem betroffen, generalisierte Urtikaria, Angioödem, mildes Asthma (Husten, Peak-Flow-Abfall < 20%); *III* zwei Organsysteme betroffen; *IV* drei Organsysteme betroffen, Asthma, das eine therapeutische Intervention erfordert, Heiserkeit, Stridor, Atemnot, Larynxödem, arterielle Hypotonie; *V* kardiale und respiratorische Symptome, die intensivmedizinische Betreuung erfordern.

Van der Zee et al. [105]: *Schweregradindex 0-12*, berechnet aus einer Punktsomme, die sich nach Einteilung der Symptome in fünf Kategorien ergab. Jeder Kategorie war ein bestimmter Punktwert zugeordnet worden, der vergeben wurde, sobald ein oder mehrere Symptome der entsprechenden Kategorie auftraten. Die Punkte aus den einzelnen Kategorien wurden anschließend für jeden Patienten individuell zusammengezählt. Haut (Exanthem, Angioödem) – *1 Punkt*; Gastrointestinaltrakt (Diarrhoe, Erbrechen) – *2 Punkte*; Obere Atemwege (Rhinitis, Konjunktivitis, Stridor, Heiserkeit) – *3 Punkte*; Untere Atemwege (Pfeifen/Giemen, Atemnot, O₂-Sättigungsabfall, Peak-Flow-Abfall) – *3 Punkte*; Tachykardie, Bradykardie, Arrhythmie, arterielle Hypotension, Herzkreislaufstillstand, Bewusstlosigkeit – *3 Punkte*.

2.3.4. Therapie unter Provokation

Grundsätzlich oblag die Entscheidung zur Akuttherapie unter Provokation der Studienärztin. Gemäß der Leitlinien standen für die Therapie Adrenalin (inklusive eines Adrenalin-Autoinjektors), systemische Antihistaminika, Glukokortikoide und inhalative β_2 -Mimetika zur Verfügung.

2.4. Hautpricktest

Die Hauttestung auf Erdnuss erfolgte als nativer Prick-Test (Prick-zu-Prick-Methode) [106], durchgeführt gemäß den Leitlinien der DGAKI [107, 108]. Als Testsubstanz wurden unbehandelte, ganze, geröstete Erdnüsse verwendet. Als Kontrolllösungen dienten 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung und 10 mg/ml Histamin-Dihydrochlorid-Lösung (ALK-Abelló, Wedel, Deutschland). Nach 15 Minuten wurde die Größe der entstandenen Quaddel abgelesen, indem der Mittelwert aus Quer- und Längsdurchmesser der Quaddel gebildet wurde. Der Test galt als positiv bei einer Quaddelgröße von ≥ 3 mm von Histamin- und Erdnussquaddel mit negativer Reaktion (Quaddelgröße ≤ 2 mm) auf Natriumchlorid.

2.5. Antikörperbestimmung im Serum

2.5.1. Gesamt-IgE

Die Gesamt-Menge an Immunglobulin E (Gesamt-IgE) im Serum wurde mit dem ImmunoCap-System FEIA[®] (Phadia, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers gemessen. Dieser Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay (FEIA) ist ein Sandwich-Immunoassay, der Anti-IgE-Antikörper als Fängerantikörper an eine feste Phase gebunden hat. Das eingefrorene Patientenserum wurde aufgetaut und auf diese Matrix gegeben, sodass jegliches freies IgE aus dem zugegebenen Serum an die Fängerantikörper gebunden wurde. Nach Auswaschen ungebundenen Patienten-IgEs wurden β -Galactosidase-markierte Detektionsantikörper zugegeben, die ihrerseits an Patienten-IgE binden. Nach Zugabe von 4-Methylumbelliperyl- β -galactopyranosid wurde dieses durch die β -Galactosidase enzymatisch zum fluoreszierenden Farbstoff 4-Methylbellipheron abgebaut. Die entstandene Fluoreszenz wurde anschließend gemessen und war in ihrer Intensität proportional zur Menge an gebundenem Patienten-IgE.

2.5.2. Erdnuss-spezifisches IgE und Ara h2-spezifisches IgE

Die quantitative Bestimmung von Erdnuss- bzw. Ara h2- spezifischem IgE erfolgte ebenfalls mit dem ImmunoCap-System FEIA[®]. Hier wurde ein FEIA verwendet, der als Fängersubstanz das entsprechende Allergen an die Festphase des Tests gebunden hat (Erdnuss bzw. das Einzelallergen Ara h2). Nach Zugabe von Patienten-Serum binden darin enthaltene (Erdnuss- bzw. Ara h2-) spezifische IgE-Antikörper an das fixierte Allergen. Die folgenden Schritte dieser Methodik entsprechen der Gesamt-IgE-Bestimmung (s.o.).

2.6. Differential-Blutbild

Zur Bestimmung der Absolutzahl Eosinophiler und Basophiler Granulozyten im peripheren Blut wurde je Patient ein Differential-Blutbild aus EDTA-Blut an einem automatisierten Blutbildanalysator (Sysmex XE-2100, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) erstellt.

2.7. Basophilenaktivierungstest und Analyse von T-Zell-Zytokinen

2.7.1. Geräte, Material und Reagenzien

Geräte und Software

<i>Brutschrank</i>	Heraeus Typ BB622002, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
<i>Blutbildanalysator</i>	Sysmex XE-2100, Sysmex Corporation, Kobe, Japan
<i>Durchflusszytometer</i>	FACSCanto™ II Flow Cytometer, BD Biosciences, San Jose, USA
<i>Software</i>	FACSDiva, Version 6, BD Biosciences, San Jose, USA FCAP Array Software, Version 1.0.1, BD Biosciences, San Jose, USA
<i>Sicherheitswerkbank</i>	Clean Air Typ CAIREV 3, Haan, Woerden, Deutschland
<i>Zentrifugen</i>	Sorvall RT 6000D und Heraeus Multifuge 1 L-R, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

Reagenzien

Zellmedien, Negativkontrollen

- RPMI 1640, ohne L-Glutamin, mit HEPES, PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria
- Dulbecco's PBS ohne Ca und Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria

Positivkontrollen

- N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
- anti-FcεRI, monoklonaler Antikörper, Bühlmann Laboratories AG, Schönenbruch, Schweiz
(Bestandteil des „FlowCast“- BAT-Kits)
- Phytohämagglutinin (PHA), Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

Spezifische Erdnuss-Stimulanz

siehe 2.7.3. Herstellung des Erdnussextrakts

- Protease-Inhibitor-Cocktail, Roche, Basel, Schweiz

Fluorochrom-markierte Antikörper

Alle Antikörper sind monoklonale Maus-Antikörper und wurden sofern nicht anders bezeichnet von der Firma BD Biosciences, San Jose, USA bezogen.

- anti-HLA-DR Phycoerythrin-Cyanin 7, Klon L243 (anti-HLA-DR-PE-Cy7)
- anti-CD45 Allophycocyanin-Cyanin 7, Klon 2D1 (anti-CD45-APC-Cy7)
- anti-Human CD63 Fluoreszein-Isothiocyanat, Klon H5C6 (anti-CD63-FITC)
- anti-Human CD123 Phycoerythrin-Cyanin 5, Klon 9F5 (anti-CD123-PE-Cy5)
- anti-Human CD203c Phycoerythrin, Klon 97A6, (anti-CD203c-PE), Immunotech, Beckmann Coulter Inc., Marseille, France

Puffer und Lösungen

- EDTA-Lysepuffer: 82,9 g/L Ammoniumchlorid (NH₄Cl), 10,2 g/L Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃), 292 mg/L Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen Deutschland
- Aceton
- PBS-Azid: 0,2 g/L Natriumazid (NaN₃), 0,037 g/L EDTA in Dulbecco's PBS
- AB-Serum: GemCell™ U.S. Origin Human Serum AB, GeminiBio-Products, West Sacramento, Kalifornien, USA
- Trennlösung: Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077 g/ml), Biochrom AG, Berlin, Germany

Cytometric Bead Array Test Kit

BD™ Cytometric Bead Array, human Th1/Th2 cytokine kit, BD Biosciences, San Diego, USA

Verbrauchsmaterialien

Blutentnahme-Röhrchen

BD-Vacutainer® Plasmaröhrchen mit Lithium-Heparin-Zusatz, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Einmalgefäße

- BD Falcon Blue Max™ (15 und 50 ml), BD Labware, NJ, USA
- BD Falcon Tube (12x75 mm, 5 ml), BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland CryoPure Tube (1,6 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

- Eppendorf Safe-Lock Gefäß 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Gewebekulturröhrchen (10 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Röhrchen mit Belüftungsstopfen (5 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Pipetten

- Eppendorf Reference[®] (10-100 µl) und Eppendorf Research[®] (10-100 µl, 100-1000 µl), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Transferpipette (3,5 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.7.2. Herstellung des Erdnussextrakts

Zur Herstellung des Erdnussextrakts wurden geschälte und gehäutete geröstete Erdnüsse zu einer pastösen Konsistenz zerkleinert, mit Aceton entfettet, anschließend filtriert (Papierfilter, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und bei 4°C getrocknet. Das so gewonnene Erdnusspulver wurde mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation zeigte sich eine Phasentrennung mit einer unteren Erdnuss-Festphase, einer mittleren Erdnussextrakt-Flüssigphase und einer oberen Fettphase. Die mittlere Phase wurde entnommen und deren Proteinkonzentration mittels Standard Bradford Protein Assay (Pierce[®] BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) bestimmt. Schließlich wurde der Erdnussextrakt mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml Erdnussprotein bei - 80 °C gelagert [109].

2.7.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Erfassung verschiedener Merkmale einer Zelle bzw. eines Partikels und findet u.a. Anwendung beim Basophilenaktivierungstest und bei der quantitativen und qualitativen Analyse von Mediatorsubstanzen in Zellüberständen. Die folgenden Paragraphen stellen eine kurze Zusammenfassung der Methodik dar.

Zellen einer Zell-Suspension werden einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und führen abhängig von ihrer Größe und inneren Struktur zu unterschiedlich starker Ablenkung des Laserlichts. Zusätzlich kann die Fluoreszenzintensität von Zellen oder Partikeln, die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, ermittelt werden. Anhand des Ausmaßes dieser Ablenkung sowie eventuell vorhandener Fluoreszenz können die spezifischen Eigenschaften der entsprechenden Zelle charakterisiert werden [110, 111].

Aufbau des Durchflusszytometers

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei Komponenten, dem Flüssigkeitssystem, dem optischen und dem elektronischen System. Im *Flüssigkeitssystem* werden die Zellen der zu analysierenden Probe durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und passieren nacheinander den Laserstrahl in der Messküvette. Das *optische System* setzt sich aus einer Anregungs- und einer Sammeloptik zusammen. Die Anregungsoptik beinhaltet einen oder mehrere Laser, deren Lichtstrahl über optische Leiter zur Messküvette gelenkt wird. Übliche eingesetzte Laser sind ein blauer Argonlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und ein roter Diodenlaser ($\lambda = 635 \text{ nm}$). Das optische Signal, das nach Passage einer Zelle durch den Laserstrahl in der Messküvette entsteht, wird von der Sammeloptik zu den entsprechenden Signaldetektoren, den Photodioden und Photomultiplier-Röhren (engl. photomultiplier tube, PMT), geleitet. Hier wird das auftreffende Lichtsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt und anschließend im *elektronischen System* digitalisiert und weiterverarbeitet (Abb. 7) [110, 111].

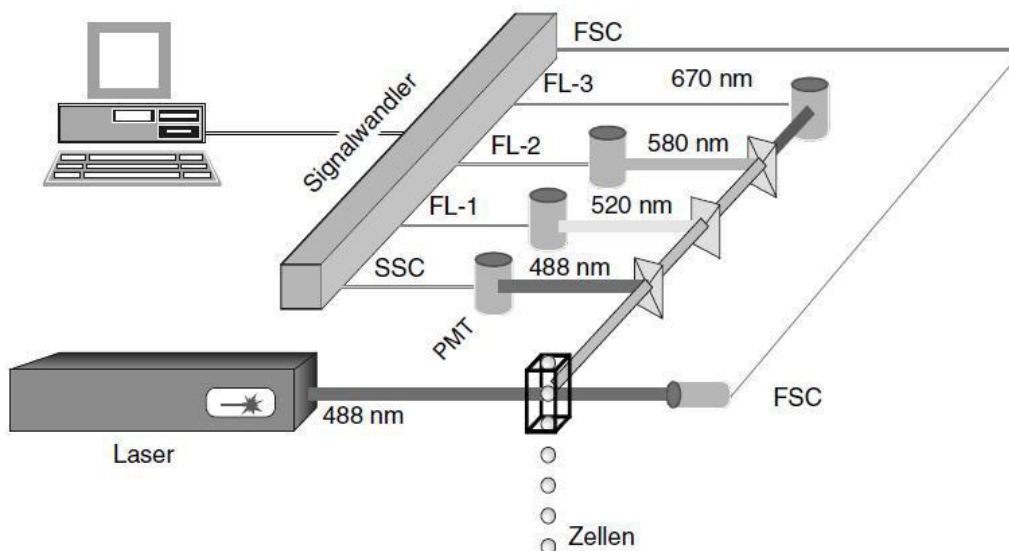


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.

FL – Fluoreszenzkanal, FSC/SSC – Forwardscatter/Sidewardscatter,

PMT – Photomultiplier-Röhren (aus [110]).

Messung

Die Passage einer Zelle durch den Laserstrahl in der Messküvette erzeugt eine Streuung des Laserlichtes an ihrer Zelloberfläche, die entlang der Achse des einfallenden Lichtes in einem Winkel von 1-10° mittels einer Photodiode detektiert und als Forwärtstreulicht (engl. forward scatter, FSC) bezeichnet wird. Das FSC-Signal ist proportional zur Größe der Zelle. Das in die Zelle eindringende Laserlicht wird an intrazellulären Oberflächen gebrochen und reflektiert. Dieses sog. Seitwärtstreulicht (engl. sideward scatter, SSC) wird in einem Winkel von 90° mittels PMT-Detektor erfasst und ist abhängig von der Granularität oder innere Komplexität der Zelle.

Zur Analyse von Oberflächenproteinen der Zellmembran, können Fluorochrome eingesetzt werden, die an Antikörper gegen das zu analysierende Oberflächenprotein gekoppelt sind. Die Eigenschaft der Fluorochrome nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge (Absorptionsspektrum) Licht einer längeren spezifischen Wellenlänge (Emissionsspektrum) zu emittieren, wird dabei genutzt, die An- bzw. Abwesenheit des gesuchten Merkmals zu detektieren. Fluorochrome mit gleicher Anregungswellenlänge, aber unterschiedlichen Emissionspeaks, können gleichzeitig eingesetzt werden und ermöglichen es, mehrere Eigenschaften einer Zelle in einem Messvorgang zu betrachten. Das nach Passage durch den Laserstrahl vom Fluorochrom emittierte Licht wird über optische Filter zum PMT und Detektionskanal der entsprechenden Wellenlänge geleitet. In Tab. 4 sind die im Basophilenaktivierungstest verwendeten Fluorochrome dargestellt und den entsprechenden Detektionskanälen des verwendeten Durchflusszytometers zugeordnet [110, 111].

Tab. 4: Eingesetzte Fluorochrome mit ihren Anregungs- und Emissionseigenschaften

Durchflusszytometer: FACSCanto II (BD, USA). Anregung durch 20mW-Feststoff-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$; vier Fluoreszenzkanäle, FL1-4) und 17mW-Helium-Neon-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$; zwei Fluoreszenzkanäle, FL1 und 2).

Fluorochrom	Abkürzung	Anregung	Emission	Detektionskanal
Fluoreszein-Isothiocyanat	FITC	488 nm	519 nm	FL1 (515-545 nm)
Phycoerythrin	PE	488 nm	576 nm	FL2 (564-606 nm)
Phycoerythrin-Cyanin 5	PE-Cy5	488 nm	666 nm	FL3 (670-750 nm)
Phycoerythrin-Cyanin 7	PE-Cy7	488 nm	778 nm	FL4 (750-810 nm)
Allophycocyanin-Cyanin7	APC-Cy7	635 nm	779 nm	FL2 (750-810 nm)

2.7.4. Basophilenaktivierungstest

Basophile Granulozyten eignen sich gut für funktionelle immunologische Tests, die *in vitro* den Kontakt zwischen Allergenen und allergischen Effektorzellen imitieren, da sie mittels einfacher Blutentnahme vergleichsweise leicht zugänglich sind. Der Basophilenaktivierungstest (BAT) ist ein solches Testverfahren, das auf dem durchflusszytometrischen Nachweis von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche Basophiler beruht [21, 112-115]. Nach *in vitro*-Allergenexposition werden die Basophilen aus Vollblut unter Zuhilfenahme von Oberflächenproteinen wie CD45 und CD123 durchflusszytometrisch identifiziert und anhand der Aktivierungsmarker CD63 und CD203c auf ihren Aktivierungszustand hin analysiert. CD63 ist Bestandteil der Membran Histamin-haltiger Granula und gelangt durch Exozytose der Vesikel auf die Zelloberfläche. Die Expression des konstitutiv exprimierten CD203c wird bei Zellaktivierung hochreguliert (Abb. 8 und Tab. 5).

In der vorliegenden Arbeit kamen zwei Positivkontrollen zum Einsatz: das Peptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), das über IgE-unabhängige Mechanismen eine Basophilenaktivierung und eine Histamin-Freisetzung auslöst, und ein monoklonaler FcεRI-Antikörper zur Stimulation einer IgE-abhängigen Basophilenaktivierung.

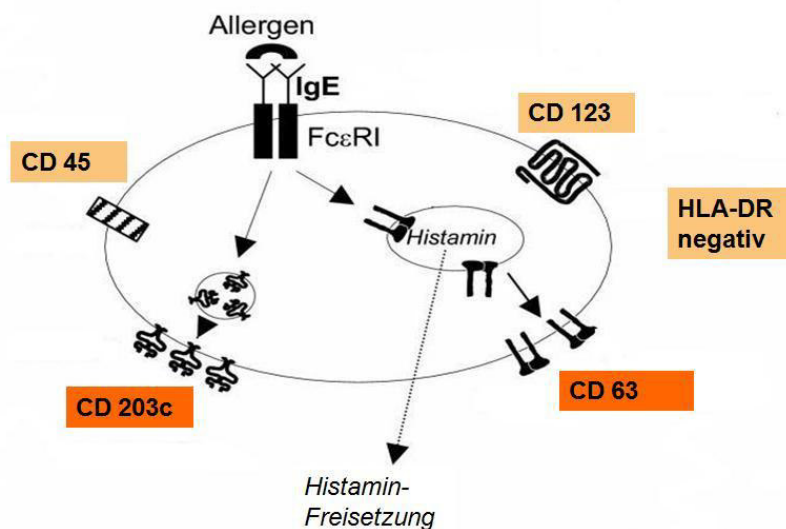


Abb. 8: Aktivierter Basophiler Granulozyt. Durch Kreuzvernetzung der oberflächlichen IgE-Rezeptoren wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zur Zell-Aktivierung und damit verbunden zur Entleerung zytoplasmatischer Vesikel führt. Die hierdurch hochregulierte Expression von CD63 und CD203c kennzeichnet den „aktivierten Basophilen“ (modifiziert nach [113]).

Tab. 5: Oberflächenproteine zur Identifizierung Basophiler Granulozyten. In Klammern die in dieser Arbeit jeweils eingesetzten Fluorochrome.

Protein	Funktion/alternativer Name [1]	Zellen, die das Protein tragen [1]
CD45 (APC-Cy7)	leukocyte common antigen	Leukozyten
HLA-DR (PE-Cy7)	MHC-Klasse II-Antigen/ Humanes-Leukozyten-Antigen-DR	B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, aktivierte T-Zellen
CD123 (PE-Cy5)	α -Kette des IL-3-Rezeptors	Knochenmark-Stammzellen, Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten
CD203c (PE)	Ektoenzym E-NPP3	Basophile Granulozyten, Mastzellen
CD63 (FITC)	Granulamembranprotein	aktivierte Basophile Granulozyten und Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen

Stimulation und Färbung der Basophilen Granulozyten

Zur Stimulation der Basophilen Granulozyten wurden jeweils 100 μ l heparinisierten Vollblutes mit folgenden Zusätzen für 20 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert:

- (1) 100 μ l RPMI 1640 als Negativkontrolle.
- (2) 100 μ l fMLP [10^{-5} M] als IgE-unabhängige Positivkontrolle.
- (3) 25 μ l Fc ϵ RI-Antikörper [3 μ g/ml] als Positivkontrolle (Endkonzentration von 0,6 μ g/ml Fc ϵ RI-Antikörper im Ansatz).
- (4) 100 μ l Erdnussextrakt [0,001 μ g/ml Erdnussprotein] (Endkonzentration: 0,0005 μ g/ml Erdnussprotein)
- (5) 100 μ l Erdnussextrakt [0,1 μ g/ml Erdnussprotein] (Endkonzentration: 0,05 μ g/ml Erdnussprotein)
- (6) 100 μ l Erdnussextrakt [10 μ g/ml Erdnussprotein] (Endkonzentration: 5 μ g/ml Erdnussprotein)
- (7) 100 μ l Erdnussextrakt [1000 μ g/ml Erdnussprotein] (Endkonzentration: 500 μ g/ml Erdnussprotein)

Um die Zelldegranulation zu beenden, schlossen sich weitere fünf Minuten Inkubation im Eisbad an. Für die Färbung wurden die Ansätze mit anti-CD123-PE-Cy5, anti-CD63-FITC, anti-CD203c-PE, anti-HLA-DR-PE-Cy7 und anti-CD45-APC-Cy7 versetzt und für 25 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden unter Lichtschutz der Proben

durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 4 ml EDTA-Lysepuffer (1:10 verdünnt mit Aqua ad iniectabilia) und die zweimalige Waschung mit PBS-Azid. Die Ansätze wurden in PBS resuspendiert und bis zur Messung am Durchflusszytometer, die innerhalb von zwei Stunden erfolgte, bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt [116].

Messung der Basophilenaktivierung am Durchflusszytometer

Zur Identifikation der Basophilen Granulozyten aus der vorliegenden Zellsuspension wurde das Vorhandensein von den Oberflächenproteinen CD45, HLA-DR (Humanes-Leukozyten-Antigen-DR), CD123 und CD203c geprüft. Zellen, die CD45, CD123 und CD203c auf ihrer Oberfläche exprimierten und nicht HLA-DR exprimierten (CD45⁺/HLA-DR⁻/CD123⁺/CD203c⁺-Zellen), wurden als Basophile Granulozyten definiert. Als Aktivierungsmarker diente das Oberflächenprotein CD63.

Die Vorgehensweise zur Identifizierung der Basophilen anhand oben genannter Merkmale ist in Abb. 9 erläutert. Der Schwellenwert für die Abgrenzung von aktivierten und nicht-aktivierten Basophilen wurde für jede Messreihe anhand der CD63⁺ Zellpopulation nach Stimulation mit der anti-FcεRI-Positivkontrolle gesetzt. Die Basophilenaktivierung ergab sich aus dem prozentualen Anteil aktivierter Basophiler Granulozyten an der Gesamt-Basophilenzahl. Pro Stimulationsansatz wurden mindestens 300 Ereignisse im Basophilen-Gate akquiriert. Vor der Messung wurde eine Kompensation mit BD™CompBeads (BD Biosciences, San Jose, USA) durchgeführt.

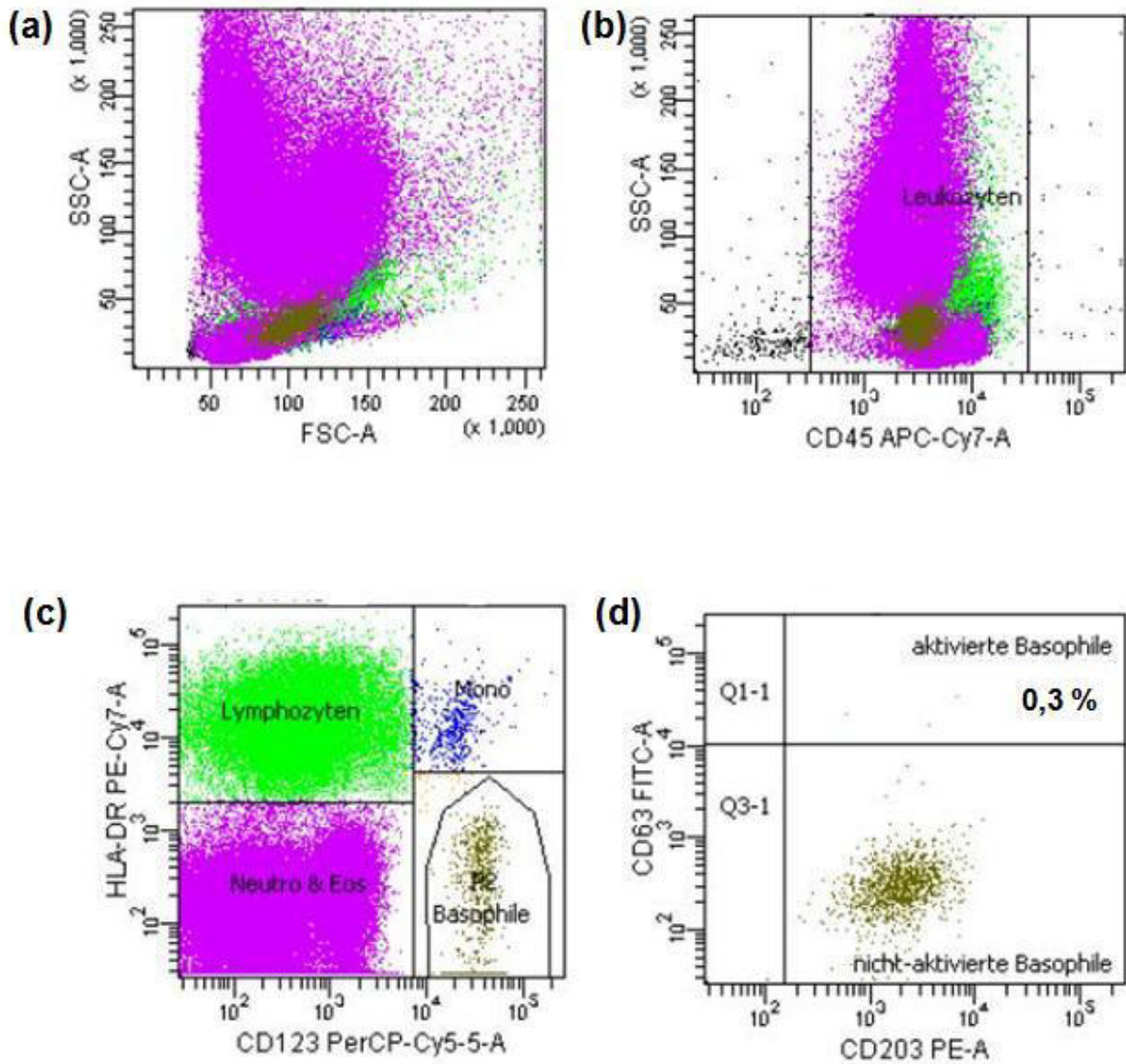


Abb. 9: Identifizierung der Basophilen Granulozyten (Bsp. einer Negativkontrolle).

Mono – Monozyten, Neutro – Neutrophile Granulozyten, Eos – Eosinophile Granulozyten.

(a) Darstellung aller Messereignisse im FSC-/SSC-Dotplot. (b) Auftragung aller Messereignisse anhand ihrer CD45-Färbung. Das Auswertfenster (Gate) markiert die Leukozytenpopulation (CD45⁺-Zellen). (c) Darstellung der in (b) markierten Leukozyten. Anhand der CD123- und HLA-DR-Färbung sind die Leukozyten-Subpopulationen abgrenzbar. Das polygonale Gate im rechten unteren Quadranten markiert die Basophilen Granulozyten (CD45⁺, CD123⁺, HLA-DR⁺). (d) Darstellung aller aktivierter Basophiler Granulozyten aus dem in (c) gesetzten Gate; Basophilenaktivierung (CD63⁺ und CD203c⁺) in % (entspricht oberem rechten Quadranten, 0,3 % der Basophilen Granulozyten sind aktiviert).

Analyse der BAT-Messwerte

Die Ergebnisse des BAT wurden für jeden Patienten anhand von elf einzelnen Parametern ausgewertet, analog der Vielzahl an in der Literatur zu findenden Auswertungsmöglichkeiten des BAT [116-120] (Tab. 6): Die *Basophilenaktivierung* (BA) beschreibt den jeweilige Anteil der aktivierten Basophilen (CD63⁺) an allen gemessenen Basophilen Granulozyten (CD45⁺/HLA-DR⁻/CD123⁺/CD203c⁺-Zellen) in % (= % CD63⁺/CD45⁺/HLA-DR⁻/CD123⁺/CD203c⁺-Zellen von CD45⁺/HLA-DR⁻/CD123⁺/CD203c⁺-Zellen) nach 1.) RPMI-Stimulation (Negativkontrolle), 2.) fMLP-Stimulation (IgE-unabhängige Positivkontrolle), 3.) anti-FcεRI-Stimulation (IgE-abhängige Positivkontrolle), 4.) Stimulation mit 0,0005 µg/ml oder 5. 0,05 µg/ml oder 6.) 5 µg/ml oder 7.) 500 µg/l Erdnussextrakt. Die BA nach Stimulation mit fMLP, anti-FcεRI bzw. Erdnussextrakt wurde durch Subtraktion der BA der Negativkontrolle um spontane CD63-Expression korrigiert und so dargestellt. Weitere Parameter zur Auswertung waren 8.) *CDmax* und 9.) *CD-sens*: *CDmax* ist definiert als maximale Basophilenaktivierung nach Allergenstimulation, die bei einer der getesteten Erdnusskonzentrationen erreicht wurde, abzüglich der BA nach RPMI-Stimulation (Abb. 10) [118]. *CD-sens*, ist ein berechneter Parameter, der die allergenbezogene Sensitivität der Basophilen beschreibt. Um *CD-sens* zu berechnen, wurde zunächst die Erdnuss-Konzentration ermittelt, die unter Annahme eines linearen Kurvenanstiegs rein rechnerisch zur halbmaximalen Basophilenaktivierung (½ *CDmax*) führen würde. Der reziproke Wert dieser „Erdnuss-Konzentration bei ½ *CDmax*“ multipliziert mit 100 ergibt *CD-sens* (1/berechnete Erdnussextraktkonzentration bei ½ *CDmax* x 100) (übernommen von Nopp et al. [118]) (Abb. 11). Je höher der *CD-sens*-Wert, desto höher ist die allergenbezogene Sensitivität der Basophilen Granulozyten. Außerdem wurde zur Auswertung der BAT-Ergebnisse 10.) der Quotient aus *CDmax* und der BA nach Stimulation mit anti-FcεRI („*CDmax/anti-FcεRI*“) und 11.) der Quotient aus der BA nach Stimulation mit 0,05 µg/ml Erdnuss und der BA nach Stimulation mit anti-FcεRI („*EN- 0,05/ anti-FcεRI*“) herangezogen.

Tab. 6: Parameter zur Auswertung des Basophilenaktivierungstests

BA - Basophilenaktivierung

Parameter	Definition
BA	prozentualer Anteil CD63 ⁺ Basophiler Granulozyten
CDmax	maximale BA bei einer der vier Erdnusskonzentrationen
CD-sens	(1 / Erdnuss-Konzentration bei ½ <i>CDmax</i>) x 100
CDmax/anti-FcεRI	CDmax / BA nach anti-FcεRI-Stimulation
EN-0,05/ anti-FcεRI	BA nach Stimulation mit Erdnuss 0,05 µg/ml / BA nach anti-FcεRI-Stimulation

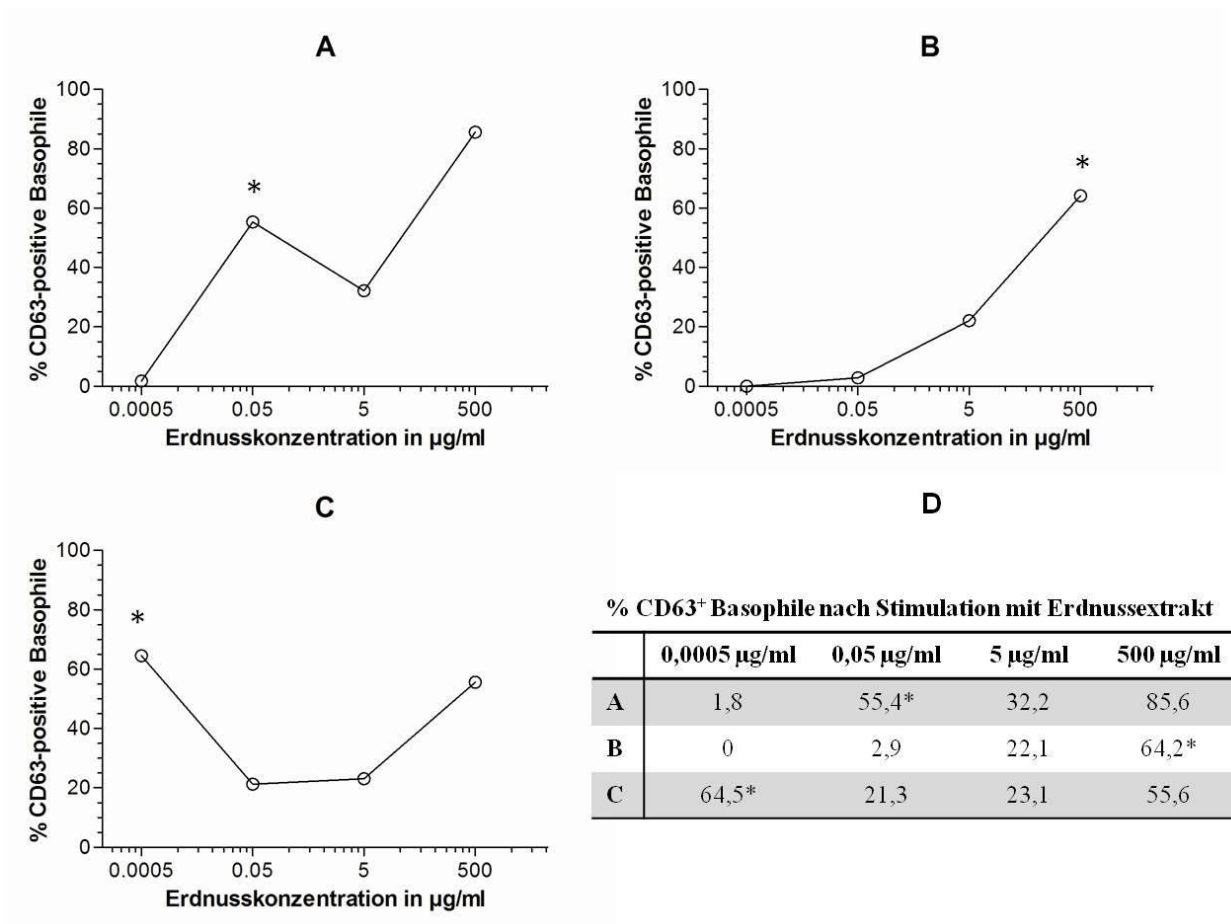


Abb. 10: Unterschiedliche Verläufe der Basophilenaktivierung nach Stimulation mit vier verschiedenen Erdnussextrakt-Konzentrationen bei drei Patienten (A-C). Zugehörige BA in % (D), * CDmax.

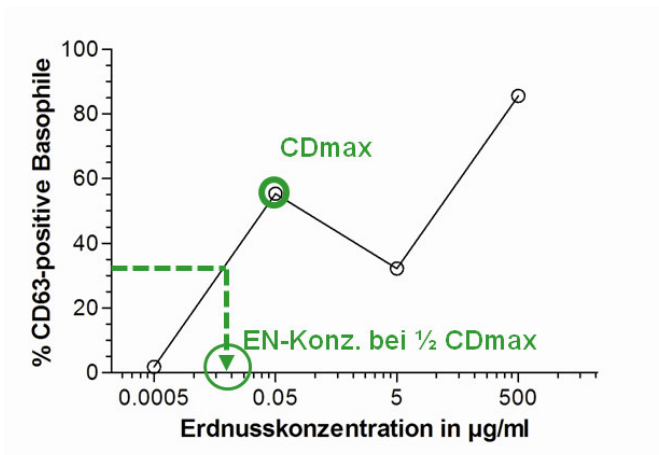


Abb. 11: CD-sens-Berechnung. $CD\text{-sens} = 1/\text{berechnete Erdnussextraktkonzentration bei } \frac{1}{2} CD_{max} \times 100$. Es wurde zunächst die Erdnuss-Konzentration (EN-Konz.) berechnet, die unter Annahme eines linearen Kurvenanstiegs zur halbmaximalen Basophilenaktivierung ($\frac{1}{2} CD_{max}$) führen würde. Der reziproke Wert dieser „Erdnuss-Konzentration bei $\frac{1}{2} CD_{max}$ “ multipliziert mit 100 ergibt CD-sens [118].

Bei zwei Patienten konnte der BAT nicht durchgeführt werden, weil entweder zu wenig Material vorlag oder weil es zum Verlust des Materials auf dem Weg vom Entnahmeort ins Labor kam. Drei Patienten, deren BA nach Stimulation mit anti-FcεRI < 10 % betrug, wurden als Non-Responder klassifiziert und nicht in die Analyse der Erdnuss-spezifischen Aktivierung einbezogen, wie in der Literatur vorgeschlagen [115, 121]. Bei vier weiteren Patienten blieb die BA nach Stimulation mit Erdnussextrakt <10%, weswegen diese aus der CDmax- und CD-sens-Berechnung herausgenommen wurden. Es konnten also BAT-Daten von 56 bis 61 Patienten zur Auswertung herangezogen werden.

2.7.5. Analyse der T-Zell-Zytokin-Sekretion

Die T-Zell-Zytokin-Sekretion wurde im Überstand von zuvor aus Vollblut isolierten und mit Erdnussextrakt stimulierten peripheren mononukleären Zellen (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) mittels Cytometric Bead Array bestimmt [122]. Sämtliche Versuchsschritte der PBMC-Isolierung und -Stimulation wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

In vitro-Stimulation peripherer mononukleärer Zellen

Heparinisiertes Vollblut wurde zentrifugiert, der Plasmaüberstand durch PBS ersetzt und das Gemisch erneut mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die Isolierung der PBMCs erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml). Anschließend wurde das PBMC-Isolat zunächst mit reinem PBS, dann mit 1 und 5 % humanem AB-Serum versetztem PBS (PBS 1% und PBS 5%) gewaschen. Schließlich wurden die PBMCs in einer 10% autologes Patientenplasma enthaltenden RPMI-Lösung resuspendiert (10×10^6 Zellen/ml) und wie folgt mit einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml (2×10^6 Zellen pro Ansatz) für 48 Stunden bei 37°C kultiviert:

jeweils 200 µl der Zellsuspension (10×10^6 Zellen/ml) mit

- (1) 300 µl Medium (RPMI mit 10% autologem Plasma) als Negativkontrolle.
- (2) 300 µl Phytohämagglutinin (20 µg/ml, Medium: RPMI mit 10% autologem Plasma) als Positivkontrolle.
- (3) 300 µl Erdnussextrakt (50 µg/ml, Medium: RPMI mit 10% autologem Plasma).

Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Protein aus der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*), das aufgrund seiner mitogenen und zellagglutinierenden Eigenschaften zur Stimulation der Zellteilung in Lymphozytenkulturen eingesetzt wird.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die zytokinhaltigen Überstände asserviert und bis zur Messung am Durchflusszytometer bei - 80 °C gelagert.

Zytokin-Bestimmung mittels Cytometric Bead Array

Der „Cytometric Bead Array“ (CBA) ist ähnlich wie der FEIA ein Testverfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, dem das Prinzip eines Sandwich-Immunoassays zugrunde liegt. Anders als beim FEIA werden im CBA jedoch Partikel, sog. Beads, als Festphase zur Bindung der Fängerantikörper genutzt, wodurch die simultane Bestimmung mehrerer Proteine in einem Ansatz möglich wird.

In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen der Zytokine Interleukin (IL-) 2, IL-4, IL-5, IL-10, Interferon (IFN-) γ und Tumor Nekrose Faktor (TNF-) α bestimmt. Das verwendete BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit enthält Capture Beads, die mit für jeweils ein Zytokin spezifischen Antikörpern besetzt sind. Nach Bindung des entsprechenden Zytokins binden wiederum PE-konjugierte Detektionsantikörper an den Capture Bead-Zytokin-Komplex und die entstehenden Sandwich-Komplexe können mittels Durchflusszytometrie gemessen werden (Abb. 12). Die einzelnen Zytokine können durch die Fluoreszenzeigenschaften der Capture Beads voneinander unterschieden werden. Die Konzentration des jeweiligen Zytokins ist proportional zur Zahl der gebundenen Detektionsantikörper und daher proportional zur PE-Fluoreszenz des Bead-Komplexes.

Durchführung und Auswertung des Cytometric Bead Arrays erfolgte nach Angaben des Herstellers BD. Zur Auswertung wurde die Höhe der Zytokin-Produktion nach in vitro-Stimulation mit der Negativkontrolle bestimmt und diese von der Höhe der Zytokin-Produktion nach in vitro-Stimulation mit Erdnuss-Extrakt bzw. mit der Positivkontrolle abgezogen.

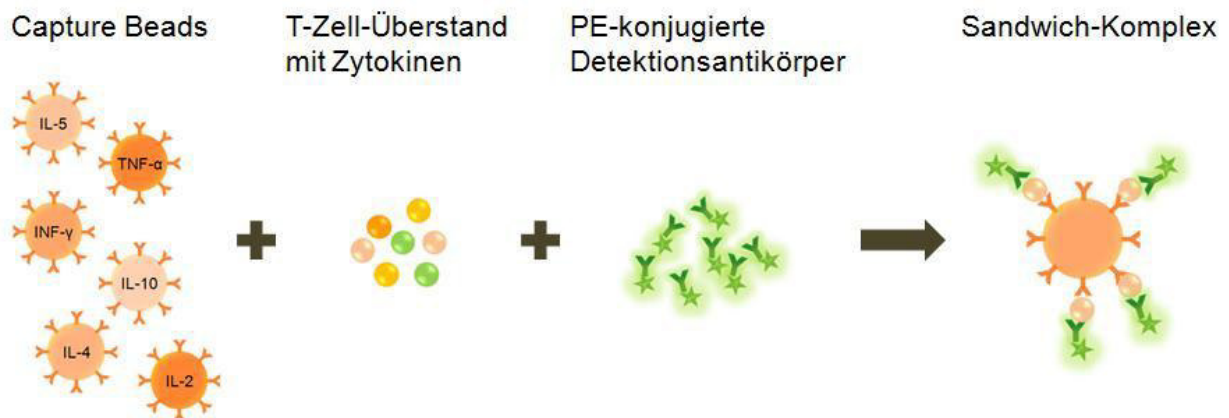


Abb. 12: Funktionsprinzip des Cytometric Bead Array.

Bei zwei Patienten konnte die PBMC-Stimulation nicht durchgeführt werden, weil entweder zu wenig Material vorlag oder weil es zum Verlust des Materials auf dem Weg vom Entnahmestort ins Labor kam.

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 18 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Für stetige Variablen wurden Mediane und Spannweiten berechnet.

Die klinische Reaktion unter Erdnussprovokation (Reaktionsdosis, Schweregrad) wurde mit den Parametern aus Anamnese, Hautpricktest und der Analyse von B-Zell-, T-Zell- und Effektorzellmarkern mit Hilfe der Spearman Rang-Korrelation korreliert. Ein Korrelationskoeffizient (r_s) von 0,8 bis 1 wurde als sehr gute, ein r_s von 0,6 bis 0,8 als gute, ein r_s von 0,4 bis 0,6 als moderate, ein r_s von 0,2 bis 0,4 als schwache und ein r_s von 0,0 bis 0,2 als keine Korrelation bewertet.

Nach Einteilung und Zuordnung der klinischen Reaktion unter Erdnussprovokation in je zwei Gruppen hinsichtlich der Merkmale Reaktionsdosis („niedrige Reaktionsdosis“ = Reaktionsdosis unter Provokation von kleiner oder gleich 1200 mg; „hohe Reaktionsdosis“ = Reaktionsdosis unter Provokation größer oder gleich 4000 mg) und Schweregrad („Schweregrad I-III“; „Schweregrad IV/V“) wurden die Gruppen innerhalb eines Merkmals auf signifikante Unterschiede in allen getesteten Parametern analysiert. Dabei wurde der Mann-Whitney-U-Test für quantitative Werte und Fischer-Yates-Test für qualitative Werte verwendet.

Wahrscheinlichkeitswerte (p) kleiner 0,05 wurden als signifikant gewertet.

Die Schwellendosis bei der 5 %, 10 % und 50 % der vorliegenden Population objektive allergische Symptome zeigten (ED_5 , ED_{10} und ED_{50} ; ED, eliciting dose (Reaktionsdosis)), wurde mittels Intervall-zensierter Überlebensanalyse mit dem Programm SAS v9.3 berechnet. Hierzu wurden individuelle NOAELs (no observed adverse effect level, d.h. die höchste Erdnussdosis, die keine objektiven Symptome hervorruft) und LOAELs (lowest observed adverse effect level, d.h. die niedrigste Erdnussdosis, die objektive allergische Symptome hervorruft; entspricht in vorliegender Studie der Reaktionsdosis) bestimmt und Patienten, die bei der niedrigsten Provokationsdosis (12 mg Erdnuss) reagiert hatten, als links-zensiert betrachtet. Die Darstellung der erwarteten Schwellenwertverteilung erfolgte als Log-Normale Wahrscheinlichkeitsverteilung mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

3. Ergebnisse

3.1. Das Patientenkollektiv

3.1.1. Klinische Charakterisierung

Insgesamt konnten 63 Patienten mit klinisch relevanter, mittels oraler Provokationstestung bestätigter Erdnussallergie in die vorliegende Studie eingeschlossen werden. Das Alter der Patienten lag im Median bei 6 Jahren mit einer Spanne von 3 bis 18 Jahren, 62 % waren männlich und der größte Teil kam aus atopiebelasteten Familien (89 %). Über die Hälfte der Teilnehmer litt an Asthma bzw. bronchialer Hyperreagibilität (54 %), Atopischer Dermatitis (67 %) und Allergischer Rhinitis (51 %). 24 der 34 Patienten, die an Asthma bzw. bronchialer Hyperreagibilität litten, standen unter medikamentöser Dauertherapie mit inhalativen Steroiden, Montelukast und einige zusätzlich mit langwirksamen β_2 -Agonisten. Weitere Nahrungsmittelallergien neben der Erdnussallergie lagen bei 38 % (n=24) der Kinder vor, am häufigsten bestand eine entweder gesicherte oder der Verdacht auf eine Allergie gegen Haselnuss (n=12), Hühnerei (n=7) und Soja (n=7). Nahezu alle teilnehmenden Kinder berichteten von mindestens einer allergischen Reaktion als Folge akzidenteller Erdnuss-Ingestion im Vorfeld der Studie (56/63 Patienten, minimal 0 bis maximal 6 akzidentelle Ingestionen/Patient), wobei Reaktionen der Schweregrade I bis V aufgetreten waren (Schweregrad nach Sampson [102] siehe Material und Methoden 2.3. Orale Erdnussprovokation). Im Median lag der Schweregrad der schwersten Reaktion auf akzidentelle Erdnuss-Ingestion bei IV.

3.1.2. Laborparametrische Charakterisierung

Alle eingeschlossenen Patienten zeigten eine Erdnussensibilisierung im Hautpricktest mit einer medianen Quaddelgröße von 8 mm. Das Gesamt-IgE lag im Median bei 364 kU/l wobei 8 % (n=5) einen Wert < 100 kU/l aufwiesen. Der Median des Erdnuss-spezifischen IgE lag bei 74 kU/l, wobei 95 % der Patienten (n=60) zusätzlich gegen das Erdnussallergen Ara h2 sensibilisiert waren. Die Patienten hatten im Median 0,5 /nl Eosinophile und 0,04 /nl Basophile Granulozyten im Blut (Tab. 7).

Tab. 7: Laborparametrische Charakteristika der Studienteilnehmer.

(n = 63)	Median	(Min. – Max.)
Hautpricktest	8 mm	(3 – 14,5)
Gesamt IgE	364 kU _A /l	(7,77 – 2869,00)
Erdnuss spezifisches IgE	74 kU _A /l	(0,57 – 624)
Ara h2 spezifisches IgE	45 kU _A /l	(0,04 – 256)
Eosinophile absolut	0,5 /nl	(0,10 – 1,50)
Eosinophile in % Leukozyten	6,7 %	(1,4 – 17,5)
Basophile absolut	0,04 /nl	(0,01 – 0,12)
Basophile in % Leukozyten	0,6 %	(0,20 – 1,93)

Basophilenaktivierungstest

Die IgE-abhängige Basophilenaktivierung konnte in der vorliegenden Studienpopulation bei nahezu allen Patienten durch den FcεRI-Antikörper simuliert werden, nur drei Patienten (5 %) wurden als Non-Responder klassifiziert (siehe 2.7.4.). Die Hälfte der Kinder reagierte in-vitro mit einer BA von > 70 % nach anti-FcεRI-Stimulation. Das bakterielle Peptid fMLP als IgE-unabhängiges Basophilenstimulans löste ebenfalls eine, jedoch geringere BA aus, nur bei einem Patienten lag die BA nach fMLP-Stimulation > 70 % (Abb. 13A und Tab. 8). Die Basophilenantwort auf Erdnussstimulation zeigte sich bei den meisten Patienten dosisabhängig (Abb. 13B und Tab. 8). Mit einer BA > 10 % reagierten bei der niedrigsten Erdnusskonzentration von 0,0005 µg/ml Erdnussprotein elf Patienten (19 %), bei der höchsten Erdnusskonzentration von 500 µg/ml Erdnussprotein mit 53/63 Patienten über 90 % der Studienteilnehmer (Abb. 13). Bei mehr als der Hälfte der Kinder (56 %, n=32) wurde der CDmax-Wert nach Stimulation mit 0,05 µg/ml Erdnussprotein erzielt, sie erreichten bei der nächst höheren Erdnusskonzentration eine geringere BA (vgl. Kurvenverlauf 2.7.4. Basophilenaktivierungstest, Abb. 10-A). Gut ein Drittel der Kinder (33 %, n=19) reagierte mit einer höheren BA je höher die Erdnusskonzentration war, mit der stimuliert wurde, sodass der CDmax-Wert dieser Patienten nach Stimulation mit der höchsten Erdnusskonzentration von 500 µg/ml Erdnussprotein erzielt wurde (vgl. Kurvenverlauf 2.7.4. Basophilenaktivierungstest, Abb. 10-B). Sechs Patienten (11 %) erreichten ihren CDmax bereits nach Stimulation mit der niedrigsten Erdnusskonzentration, auf Stimulation mit höheren Erdnusskonzentrationen konnte bei ihnen keine höhere BA gemessen werden (vgl. Kurvenverlauf Basophilenaktivierungstest, Abb. 10-C).

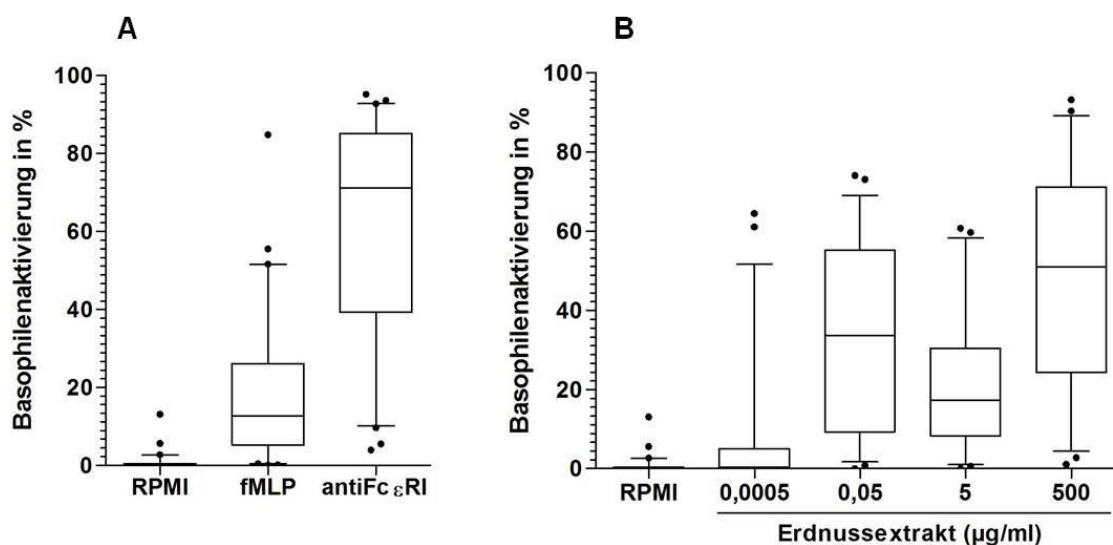


Abb. 13: Basophilenaktivierung (BA) der Studienteilnehmer (n=63) nach in-vitro Stimulation. Box-and-Whisker-Plot, unterer und oberer Whisker markieren die 5. bzw. 95. Perzentile. BA = % CD63⁺-Zellen von CD45⁺/HLA-DR/CD123⁺/CD203c⁺-Zellen. **A:** BA nach Stimulation mit RPMI (Negativkontrolle), IgE-unabhängiger Kontrolle (fMLP) und IgE-abhängiger Kontrolle (anti-Fc ϵ RI). **B:** BA nach Stimulation mit Erdnussextrakt.

T-Zell-Zytokin-Profil

Nach 48 Stunden PBMC-Stimulation mit Erdnussextrakt lag die im Überstand gemessene Produktion der getesteten Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, IFN- γ , TNF- α) signifikant höher als nach Stimulation mit Medium (Students t-Test, $p = 0,0004$ bis $< 0,0001$). Der größte Unterschied zwischen Erdnuss- und Mediumstimulation zeigte sich in der IL-5- und IL-2-Produktion mit 300fachem bzw. 100fachem Anstieg nach Erdnussextrakt-Stimulation. (Tab. 8 und Abb. 14A). Nach PHA-Stimulation als Positivkontrolle konnten vorrangig die Zytokine IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α detektiert werden. Die IL-2- und IL-4-Produktion lag in diesem Ansatz nur wenig über der Produktion nach Stimulation mit Medium (Abb. 14B). Da IL-2 als autokrines Stimulans für die Produktion von IL-5 und IL-10 notwendig ist, ist der nur geringe Anstieg von IL-2 im Zellüberstand nach Stimulation mit PHA möglicherweise damit zu erklären, dass IL-2 zum Messzeitpunkt 48h nach Stimulationsbeginn schon zu einem Teil wieder abgebaut worden ist. Ähnliches könnte auch für IL-4 gelten [123].

Die PBMC-Zytokin-Produktion nach 48h Stimulation mit RPMI (Negativkontrolle) betrug im Median (Spannweite) für IL-4 2 pg/ml (0-32), für IL-5 0 pg/ml (0-10), für IL-10 3 pg/ml (0-60),

für IL-2 2 pg/ml (0-18), für IFN- γ 7 pg/ml (0-289) und für TNF- α 5 pg/ml (0-161). Die PBMC-Zytokin-Produktion nach 48h Stimulation mit PHA (Positivkontrolle) betrug im Median (Spannweite) für IL-4 3 pg/ml (0-97), für IL-5 353 pg/ml (4-3131), für IL-10 384 pg/ml (36-1080), für IL-2 4 pg/ml (0-360), für IFN- γ 609 pg/ml (29-10389) und für TNF- α 272 pg/ml (0-3369) (Abb. 14).

Tab. 8: Basophilenaktivierung (BA) und Zytokin-Profil der Studienteilnehmer (n=63).

Darstellung als Median (Min.-Max.), * abzüglich BA/Zytokinproduktion nach Stimulation mit Medium. Zytokin-Profil im Überstand der PBMC-Zellsuspension nach 48h PBMC-Stimulation (2×10^6 Zellen je Ansatz) mit Erdnussextrakt, gemessen mittels Cytometric Bead Array.

BA = % CD63⁺-Zellen von CD45⁺/HLA-DR/CD123⁺/CD203c⁺-Zellen. CDmax = maximale Basophilenaktivierung nach Allergenstimulation, die bei einer der getesteten Erdnusskonzentrationen erreicht wurde. CD-sens = $1/\text{berechnete Erdnussextraktkonzentration bei } \frac{1}{2} \text{ CDmax} \times 100$. $\text{CDmax/anti-Fc}\epsilon\text{RI} = \text{CDmax} / \text{BA nach anti-Fc}\epsilon\text{RI-Stimulation}$. $\text{EN-0,05/anti-Fc}\epsilon\text{RI} = \text{BA nach Stimulation mit Erdnuss } 0,05 \mu\text{g/ml} / \text{BA nach anti-Fc}\epsilon\text{RI-Stimulation}$.

Basophilenaktivierung			Zytokinprofil im Überstand nach Stimulation mit Erdnuss [50 $\mu\text{g/ml}$]*	
nach Stimulation mit	RPMI	0,2 % (0-13)	IL-4	17 pg/ml (0-80)
	anti-Fc ϵ RI	71 % (4-95)*	IL-5	333 pg/ml (0-2006)
	fMLP	13 % (0-85)*	IL-10	24 pg/ml (0-229)
	Erdnuss 0,0005 $\mu\text{g/ml}$	0,4 % (0-65)*	IL-2	171 pg/ml (0,5-1131)
	Erdnuss 0,05 $\mu\text{g/ml}$	34 % (0-74)*	IFN- γ	10 pg/ml (0-476)
	Erdnuss 5 $\mu\text{g/ml}$	17 % (0-60)*	TNF- α	7 pg/ml (0-163)
	Erdnuss 500 $\mu\text{g/ml}$	51 % (1-93)*		
CDmax	47 % (14-87)	IL-4/ IFN- γ	1,3 (0-651)	
CD-sens	3995 (0,4-4x10 ⁵)	IL-5/ IFN- γ	17,3 (0-9568)	
CDmax/anti-Fc ϵ RI	0,7 (0,1-2,6)			
EN-0,05/ anti-Fc ϵ RI	0,5 (0-1,3)			

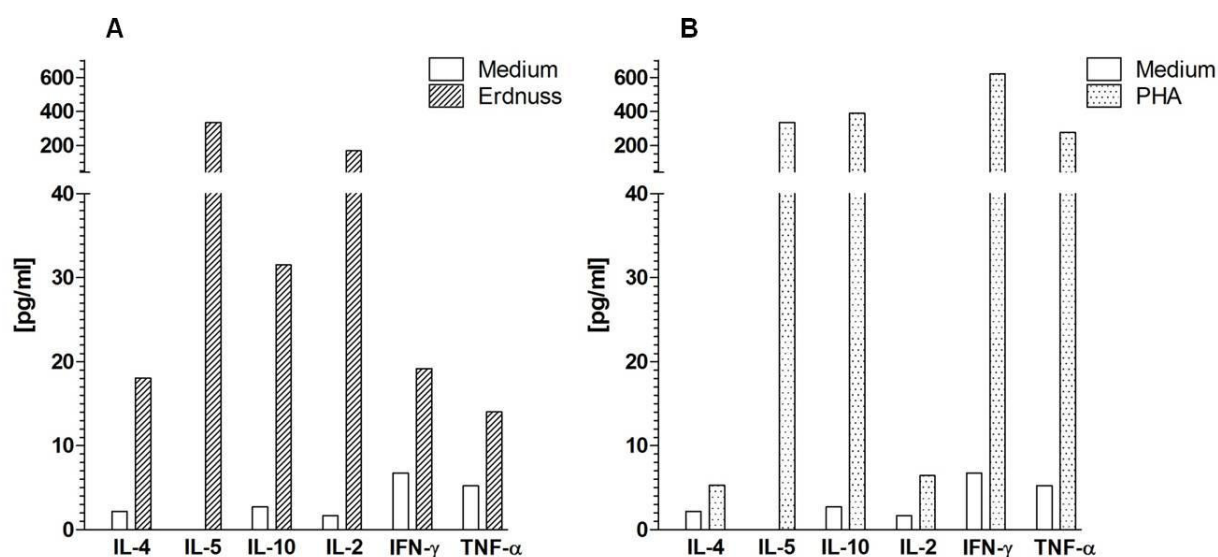


Abb. 14: Zytokinprofil aller Studienteilnehmer (n=63) im Überstand der PBMC-Zellsuspension nach 48h Stimulation mit Erdnussextrakt [50 µg/ml] (A, ▨) und mit PHA als Positivkontrolle (B, ▩), verglichen mit dem Zytokinprofil aller Studienteilnehmer nach 48h PBMC-Stimulation mit RPMI als Negativkontrolle (□). Dargestellt als Median in pg/ml. Zytokin-Profil gemessen mittels Cytometric Bead Array.

3.2. Orale Erdnussprovokation

3.2.1. Reaktionsdosis

Alle teilnehmenden Patienten zeigten objektive allergische Symptome unter offener oraler Erdnussprovokation wobei die Reaktionsdosis im Medium bei 400 mg ganzer Erdnuss (entsprechend 100 mg Erdnussprotein) lag (Tab. 9). Drei Patienten reagierten bereits nach Gabe der ersten Dosis von 12 mg Erdnuss (3 mg Erdnussprotein) mit trockenem Husten, Erbrechen oder Diarrhoe. Drei weitere Patienten zeigten erst nach Verabreichung der Kumulativdosis von 18 g ganzer Erdnuss (4,5 g Erdnussprotein) allergische Symptome (Erbrechen oder Urtikaria). Die kumulative Reaktionsdosis, als Gesamtmenge an Erdnuss, die während der Provokation am Reaktionstag verabreicht worden war, ergab im Median 572 mg ganze Erdnuss (190,7 mg Erdnussprotein). Sie lag mindestens bei 12 mg Erdnuss und betrug maximal 18,8 g Erdnuss. Bei drei Patienten wurde individuell vom Provokationsprotokoll abgewichen, da sie entweder den Verzehr einer Gabe verweigerten (n=1) oder den Abbruchkriterien grenzwertig entsprechende Reaktionen zeigten (n=2, Kontakt-Urtikaria). In diesen Fällen wurde die Gabe der betreffenden Dosis zum Zeitpunkt des nächsten Steigerungsschrittes wiederholt und anschließend die Provokation entsprechend dem ursprünglichen Schema fortgesetzt.

Erdnuss-Schwellenwerte der Studienteilnehmer

Die erwartete Verteilung der Schwellenwerte der Studienpopulation, die bei einem jeweils bestimmten Prozentsatz der Studienteilnehmer objektive allergische Reaktionen hervorriefen, zeigt Abb. 15. Die ED₅, als die Erdnussdosis, bei der 5 % der Patienten eine objektive allergische Reaktion zeigten, betrug in vorliegender Population 7,81 mg Erdnuss (entsprechend 1,95 mg Erdnussprotein) mit einem 95 %-Konfidenzintervall (95 %-KI) von 3,5 bis 17,6 mg Erdnuss. Die ED₁₀ betrug 16,41 mg Erdnuss (95 %-KI: 8-33,5 mg) und die ED₅₀ 225,37 mg Erdnuss (95 %-KI: 134,9-376,4).

3.2.2. Zeit bis zum Auftreten der allergischen Reaktion unter oraler Provokation

Die Zeit von der Gabe der Erdnussdosis bis zum Auftreten des ersten objektiven Symptoms betrug im Median 55 Minuten (5-210 Minuten). Ein Drittel der Patienten reagierte innerhalb des Intervalls von < 30 Minuten nach Erdnussgabe, das im Standardprotokoll für orale Nahrungsmittelprovokation als Steigerungsintervall vorgesehen ist. Mit 45/63 Patienten reagierte jedoch der größte Teil erst nach dieser Zeit. Drei Patienten zeigten sogar erst eine Reaktion nach > 120 Minuten: 160 bzw. 180 Minuten nach Ingestion der letzten Gabe an Tag 1 (400 mg Erdnuss) trockener Husten (n=1) bzw. Erbrechen (n=1) und 210 Minuten nach Verzehr von 1200 mg Erdnuss generalisierte Urtikaria (n=1), nachdem die Folgedosis von 4000 mg aus Ekel bei Verabreichung sofort komplett wieder ausgespuckt worden war.

Tab. 9: Verteilung der Patienten (n=63) nach Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation: Anzahl der Patienten, die bei der jeweiligen Erdnussdosis unter oraler Erdnussprovokation mit objektiven Symptomen reagierten.

Erdnussdosis (mg ganze Erdnuss)	n	%
Tag 1 der Provokation		
12 mg	3	5
40 mg	11	18
120 mg	12	19
400 mg	14	22
Tag 2 der Provokation		
400 mg	1	1
1200 mg	7	11
4000 mg	9	14
12000 mg	3	5
Tag 3 der Provokation		
18000 mg	3	5
Σ	63	100

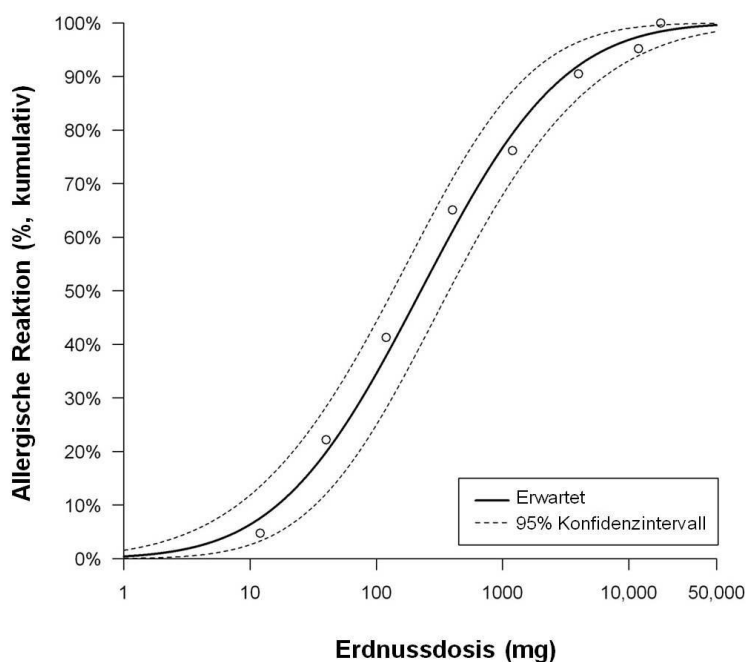


Abb. 15: Log-Normale Wahrscheinlichkeitsverteilung der individuellen Erdnuss-Schwellenwerte (mg ganze Erdnuss) für die in vorliegender Arbeit getesteten Patienten mit Erdnussallergie. Die Verteilung basiert auf Lowest observed adverse effect Levels (LOAELs) und No observed adverse effect Levels (NOAELs) für objektive allergische Symptome.

3.2.3. Schweregrad

Mit Ausnahme schwerster respiratorischer oder kardiovaskulärer Reaktionen (Schweregrad V) zeigte sich unter der offenen Erdnussprovokation das gesamte allergische Symptom-Spektrum mit einem nach Beurteilung der insgesamt schwersten beobachteten objektiven Reaktion medianen Schweregrad von III nach Sampson [102] (Tab. 10). 9 von 63 Patienten reagierten ausschließlich mit Hautsymptomen wie Urtikaria und/oder Angioödem, 12 Patienten zeigten nur gastrointestinale Symptome wie Erbrechen (n=10) oder Diarrhoe (n=2) und 4 Patienten nur Reaktionen des Respirationstraktes wie Husten (n=1) und Giemen (n=3). Insgesamt reagierten 65% der Patienten mit der Haut, 48% mit dem Gastrointestinaltrakt und 57% mit Symptomen des Respirationstraktes. Symptome der unteren Atemwege wie trockener Husten (n=8), Pfeifen/Giemen (n=5) oder Dyspnoe (n=9) zeigten 35% der Kinder, zumeist neben gleichzeitig bestehenden Symptomen anderer Organsysteme. Knapp die Hälfte der Patienten reagierten mit mehr als einem Organsystem auf die orale Erdnussprovokation.

Die Anwendung weiterer in der Literatur publizierter Schweregradeinteilungen auf die Daten der oralen Erdnussprovokation vorliegender Arbeit ergab ein ähnliches Bild der Schweregradverteilung wie nach der Schweregradeinteilung nach Sampson (Tab. 11).

Therapie unter oraler Erdnussprovokation

Unabhängig davon ob die Kinder aufgrund ihres Asthmas bzw. bronchialer Hyperreagibilität unter medikamentöser Dauertherapie standen (s.o.), die sie auch während der Erdnussprovokation beibehielten, mussten 29 der 63 Patienten aufgrund ihrer Symptome unter der Provokation akut medikamentös behandelt werden: Vier Patienten erhielten nur systemische Antihistaminika, fünf Patienten nur ein inhalatives β_2 -Mimetikum. Bei neun Patienten wurden ein systemisches Antihistaminikum und entweder ein inhalatives β_2 -Mimetikum (n=1) oder ein systemisches Kortikosteroid (n=8) verabreicht. Eine Dreifach-Therapie aus Antihistaminikum, β_2 -Mimetikum und Kortikosteroid war bei weiteren neun Kindern notwendig. Zwei Patienten benötigten zusätzlich i.m. Adrenalin. Bei Reaktionen mit dem Schweregrad I nach Sampson [102] wurden keine Medikamente verabreicht. Kinder, die mit Schweregrad IV reagiert hatten, wurden medikamentös therapiert, sofern sich das Symptom nicht unmittelbar vor der Verabreichung des Medikaments spontan regredient zeigte (n=1, Stridor).

Subjektive Symptome unter oraler Erdnussprovokation

Unter oraler Provokation traten zumeist als erste Reaktion subjektive Symptome auf, die registriert wurden, jedoch nicht zum Abbruch der Provokation führten. Insgesamt berichteten 54 der 63 Patienten vor dem Auftreten objektiver Symptome von subjektiven Symptomen wie Bauchschmerzen (n=31), Übelkeit (n=16), orales Allergiesyndrom (n=24), Pruritus (n=9), blockierter Nasenatmung (n=3), Kloßgefühl im Hals (n=2) oder Kopfschmerz und Schwindel (n=1). Bei 42 Patienten traten diese Symptome bei einer Erdnussdosis vor der objektiven

Tab. 10: Verteilung der Patienten (n=63) nach Schweregrad der allergischen Reaktion unter oraler Erdnussprovokation. Einteilung des Schweregrads in I-V modifiziert nach dem Schema für Nahrungsmittel-induzierte Anaphylaxie nach Sampson [87, 102]. Das jeweils schwerste aufgetretene objektive Symptom definierte den Schweregrad.

Schweregrad der allergischen Reaktion	n	%
I	2	3
II	25	40
III	21	33
IV	15	24
V	0	
Σ	63	100

Reaktionsdosis auf, 12 Patienten erfuhren subjektive Symptome als erste Reaktion bei der Reaktionsdosis. Von den verbleibenden Patienten zeigten acht keine subjektiven Symptome während der Provokation und bei einem Patienten traten 80 Minuten nach der Erdnussgabe Bauchschmerzen zeitgleich mit generalisierten Urtikaria und Flush auf, 30 Minuten später kam es zu pulmonaler Obstruktion. Subjektive Symptome traten im Median bei einer Erdnusssdosis von 40 mg auf (Min.-Max.: 12-4000 mg).

Tab. 11: Verteilung der Patienten (n=63) nach Schweregrad der allergischen Reaktion unter oraler Erdnusssprovokation unter Anwendung weiterer Schweregrad-Einteilungen.

Es wurden jeweils nur die beobachteten objektiven Symptome in die Schweregradbestimmung einbezogen. * Schweregradindex 0-12.

Schwerstes Symptom nach Mueller [103]			Gesamtreaktion nach Astier et al. [104]			Gesamtreaktion nach van der Zee et al. [105]			Anzahl betroffener Organsysteme		
Grad	n	%	Grad	n	%	Index*	n	%	Grad	n	%
0	-	-	I	3	5	1	13	20	I	35	55
I	16	25	II	28	44	2	15	24	II	25	40
II	24	38	III	15	24	3	11	17	III	3	5
III	22	35	IV	17	27	4	8	13			
IV	1	2	V	-	-	5	6	10			
						6	6	10			
						7	4	6			
Median	2		Median	3		Median	3		Median	1	

Mueller [103]: *Grad I* Urtikaria, Angioödem, Rhinitis, Konjunktivitis; *II* Diarrhoe, Erbrechen; *III* Asthma, Heiserkeit, Pfeifen/Giemen, Atemnot, O₂-Sättigungsabfall, Peak-Flow-Abfall; *IV* Tachykardie, Bradykardie, Arrhythmie, arterielle Hypotension, Herzkreislaufstillstand, Bewusstlosigkeit. *Milde Reaktion* = Grad I. *Moderate Reaktion* = Grad II. *Schwere Reaktion* = Grad III und IV.

Astier et al. [104]: *Grad I* Rhinokonjunktivitis, <10 Urtikaria; *II* ein Organsystem betroffen, generalisierte Urtikaria, Angioödem, mildes Asthma (Husten, Peak-Flow-Abfall < 20%); *III* zwei Organsysteme betroffen; *IV* drei Organsysteme betroffen, Asthma, das eine therapeutische Intervention erfordert, Heiserkeit, Stridor, Atemnot, Larynxödem, arterielle Hypotonie; *V* kardiale und respiratorische Symptome, die intensivmedizinische Betreuung erfordern.

Van der Zee et al. [105]: *Schweregradindex 0-12*, berechnet aus einer Punktsomme, die sich nach Einteilung der Symptome in fünf Kategorien ergab. Jeder Kategorie war ein bestimmter Punktwert zugeordnet worden, der vergeben wurde, sobald ein oder mehrere Symptome der entsprechenden Kategorie auftraten. Die Punkte aus den einzelnen Kategorien wurden anschließend für jeden Patienten individuell zusammengezählt. Haut (Exanthem, Angioödem) – 1 Punkt; Gastrointestinaltrakt(Diarrhoe, Erbrechen) – 2 Punkte; Obere Atemwege (Rhinitis, Konjunktivitis, Stridor, Heiserkeit) – 3 Punkte; Untere Atemwege (Pfeifen/Giemen, Atemnot, O₂-Sättigungsabfall, Peak-Flow-Abfall) – 3 Punkte; Tachykardie, Bradykardie, Arrhythmie, arterielle Hypotension, Herzkreislaufstillstand, Bewusstlosigkeit – 3 Punkte.

3.3. Korrelationen klinischer und anamnestischer Daten

3.3.1. Korrelation zwischen Reaktionsdosis und Schweregrad unter oraler Erdnussprovokation

Zwischen der Reaktionsdosis und dem Schweregrad nach Sampson [102] der Reaktion unter Erdnussprovokation zeigte sich keine Korrelation ($r_s = -0,06$, $p = 0,64$, Abb. 16). Auch nach Berechnung des Schweregrades mithilfe weiterer Schweregradschemata (s.o.) korrelierten Reaktionsschwere und -dosis nicht miteinander (Schema nach Mueller [103] $r_s = -0,01$, $p = 0,91$; Schema nach Astier [104] $r_s = 0,15$, $p = 0,24$; Schema nach van der Zee [105] $r_s = 0,06$, $p = 0,64$). Ebenso fand sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl betroffener Organsysteme und der Reaktionsdosis unter Provokation ($r_s = 0,11$, $p = 0,40$).

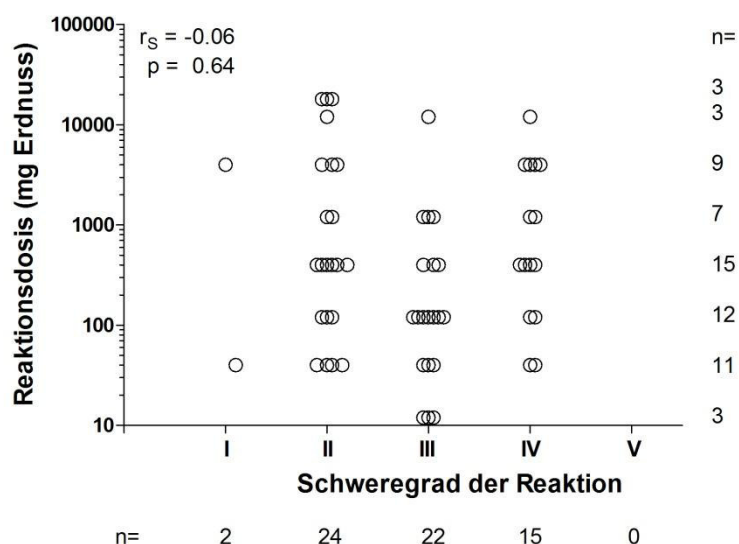


Abb. 16: Korrelation von Reaktionsdosis und Schweregrad der allergischen Reaktion (nach Sampson [102]) unter oraler Provokation. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. p = statistische Signifikanz.

Die Zeit von der Gabe der Erdnussdosis bis zum Auftreten des ersten objektiven Symptoms korrelierte weder mit der Reaktionsdosis selbst ($r_s = -0,03$, $p = 0,84$) noch mit der Reaktionsschwere (z.B. Schema nach Sampson [102] $r_s = 0,18$, $p = 0,17$) unabhängig davon, nach welchem Schema der Schweregrad berechnet worden war (restliche Daten nicht gezeigt).

Wurde anstelle der Reaktionsdosis die kumulative Reaktionsdosis, definiert als Summe der bis zum Auftreten des ersten objektiven Symptoms verzehrten Erdnussmenge am Tag der Reaktion, zur Berechnung o.g. Korrelationen herangezogen, änderte sich das beschriebene Bild nicht (kumulative Reaktionsdosis versus Schweregrad: $r_s = -0,05$, $p = 0,70$). Auch hier fand sich kein Zusammenhang zwischen Dosis und Schweregrad bzw. Zeit bis zum Auftreten der Reaktion (Daten nicht gezeigt).

3.3.2. Korrelation von Alter und akzidentellen Reaktionen vor Studienbeginn

Das Alter der Patienten konnte weder zur Reaktionsdosis noch zur Reaktionsschwere unter Erdnussprovokation korreliert werden (Alter versus Reaktionsdosis: $r_s = -0,14$, $p = 0,28$; Alter versus Schweregrad nach Sampson [102]: $r_s = 0,04$, $p = 0,80$), unabhängig vom verwendeten Schweregradsystem (Daten nicht gezeigt). Jedoch tendierten Anzahl und Schweregrad der vor Studienbeginn aufgetretenen allergischen Reaktionen aufgrund akzidenteller Erdnussingestion schwach dazu, mit dem Alter der Kinder zuzunehmen (Tab. 12).

In der Korrelation zwischen Reaktionsdosis und der Anzahl akzidenteller Reaktionen vor Studienbeginn zeigte sich, dass Kinder, die in der Anamnese eine hohe Zahl an allergischen Reaktionen aufgrund ungewollten Erdnussverzehr berichteten, mit höherer Wahrscheinlichkeit unter Provokation bereits bei niedrigen Erdnussdosen objektive Symptome zeigten als Kinder ohne oder mit weniger akzidentellen Reaktionen in der Vorgeschichte. Die Anzahl akzidenteller Erdnussingestion vor Studienbeginn ließ sich jedoch nicht mit dem Schweregrad unter Provokation korrelieren (Tab. 12).

Der Schweregrad der schwersten Reaktion nach akzidenteller Erdnussingestion korrelierte schwach invers mit der Reaktionsdosis unter oraler Provokation (Tab. 12). Diese Korrelation zeigte sich unabhängig davon, welches Schweregradschema zur Beurteilung herangezogen worden war (Daten nicht gezeigt). Daneben zeigte sich eine schwache Korrelation zwischen Erdnusspezifischem IgE und der Reaktionsschwere nach akzidenteller Erdnussingestion, dergestalt je höher der spezifische IgE-Wert, desto schwerer die Reaktion in der Vorgeschichte. Die Reaktionsschwere nach akzidentellem Erdnussgenuss wies jedoch keinen Zusammenhang

Ergebnisse

zur Schwere der Reaktion unter Provokation auf (Tab. 12). Auch hier hatte das verwendete Schweregradsystem keinen Einfluss auf die Korrelation (Daten nicht gezeigt).

Tab. 12: Korrelationen von Anzahl und Schwere der akzidentellen Reaktionen in der Vorgeschichte und Reaktionsdosis, Schweregrad und Sensibilisierung unter oraler Provokation. Schweregrad nach Sampson [102]. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. p = statistische Signifikanz.

Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) sind **fett** gekennzeichnet.

	Anzahl akzidenteller Erdnussingestionen		Schweregrad der schwersten Reaktion nach akzidentellem Erdnussverzehr	
	r_s	p	r_s	p
Alter (Jahre)	0,31	0,01	0,34	0,01
Reaktionsdosis (mg)	-0,36	0,004	-0,28	0,04
Schweregrad unter Provokation	0,16	0,21	-0,25	0,86
Erdnuss-spezifisches IgE (kU_A/l)	0,15	0,25	0,26	0,04
Ara h2-spezifisches IgE (kU _A /l)	0,11	0,38	0,22	0,08
Erdnussquaddel im Pricktest (mm)	0,31	0,01	0,04	0,77

3.4. Korrelation von Laborparametern und Reaktionsdosis

3.4.1. Korrelation von Allergen-spezifischen Sensibilisierungsmarkern und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation

Die Reaktionsdosis unter Provokation korrelierte schwach invers mit der Höhe des Erdnuss-spezifischen IgE, des Ara h2-spezifischen IgE und der Erdnussquaddelgröße im Hautpricktest. D.h. je ausgeprägter die Sensibilisierung (Höhe des spezifischen IgE und Quaddelgröße im Pricktest) war, umso eher reagierten die Kinder unter oraler Erdnussprovokation bei niedrigen Erdnussdosen (Abb. 17).

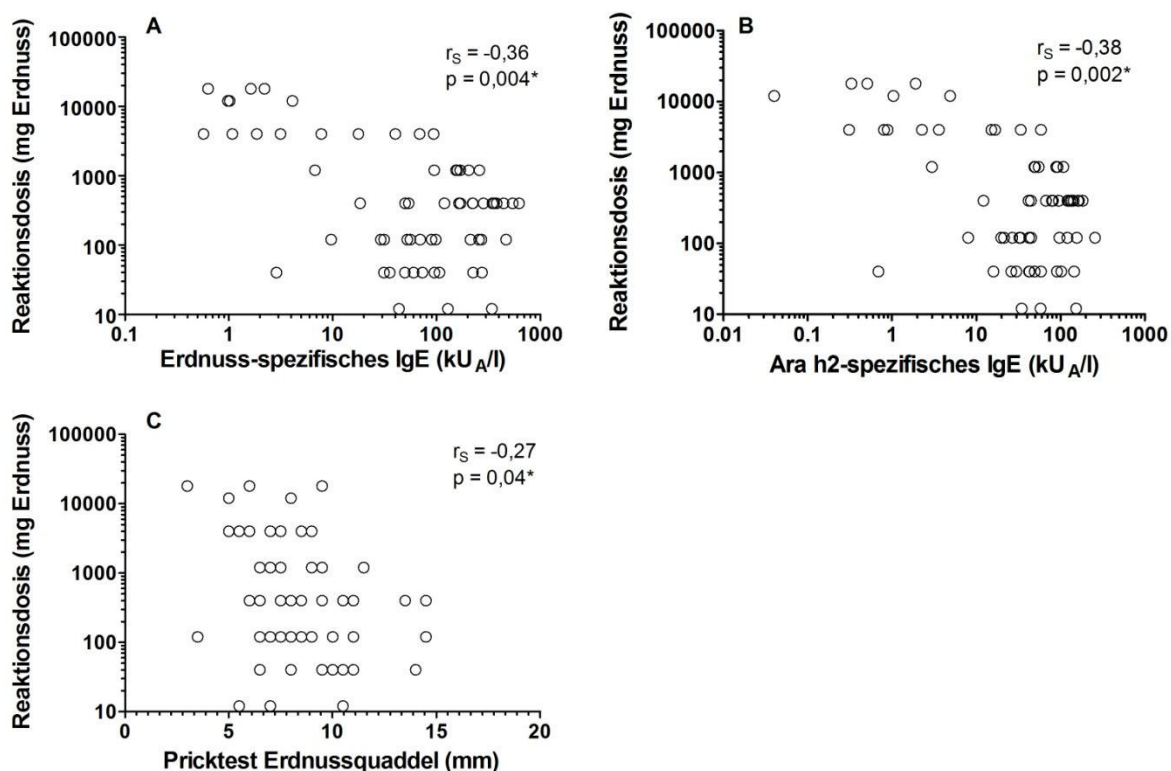


Abb. 17: Korrelationen von Allergen-spezifischen Sensibilisierungsmarkern und Reaktionsdosis der allergischen Reaktion unter oraler Provokation (12-18.000 mg ganze Erdnuss). r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. * Signifikante Korrelation ($p < 0,05$). **A:** Erdnuss-spezifisches IgE (kU_A/l) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **B:** Ara h2-spezifisches IgE (kU_A/l) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **C:** Erdnussquaddel im Pricktest (mm) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss).

3.4.2. Korrelation Allergen-spezifischer Basophilenaktivierung und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation

Die Erdnuss-spezifischen Parameter der Basophilenaktivierung ließen sich z.T. schwach bis moderat invers mit der Reaktionsdosis korrelieren: je höher die BA nach Stimulation mit niedrigen Erdnussdosen (0,0005 µg/ml oder 0,05 µg/ml) und je größer die Basophilen-Sensitivität (CD-sens), desto niedriger die Reaktionsdosis unter Provokation (Abb. 18). Kein Zusammenhang konnte hingegen zwischen der BA nach Stimulation mit höheren Erdnussdosen (5 µg/ml oder 500 µg/ml Erdnuss) oder der maximalen BA (CDmax) und der Reaktionsdosis gefunden werden (Tab. 13).

3.4.3. Korrelation von Allergen-spezifischer T-Zell-Aktivierung und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation

Die Produktion der T_{h2}-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 nach in vitro-Stimulation von PBMCs mit Erdnuss korrelierte ebenso wie die des IL-2 schwach bis moderat invers mit der Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation (Abb. 19). Reaktionsdosis und T_{h1}-Zytokin-Produktion nach in vitro-Erdnussstimulation (IFN-γ, TNF-α) standen dagegen in keinem signifikanten Zusammenhang. Je mehr die PBMCs ein T_{h2}-spezifisches Zytokinmuster produzierten, desto eher lag die Reaktionsdosis des Patienten bei niedrigen Erdnussdosen unter oraler Provokation. Entsprechend zeigte auch der T_{h2}/T_{h1}-Quotient (IL4-/IFN-γ-Produktion bzw. IL5-/IFN-γ-Produktion) eine schwach inverse Korrelation zur Reaktionsdosis (Tab. 13).

3.4.4. Korrelation von Allergen-unspezifischer Laborparameter und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation

Eosinophile und Basophilen Granulozyten korrelierten schwach invers mit der Reaktionsdosis unter oraler Provokation (Tab. 13). Weder das Gesamt-IgE, noch die Basophilenaktivierung nach Stimulation mit RPMI, fMLP bzw. FcεRI, noch die PBMC-Zytokinproduktion nach Stimulation mit RPMI bzw. PHA ließen sich zur Reaktionsdosis korrelieren (Tab. 13).

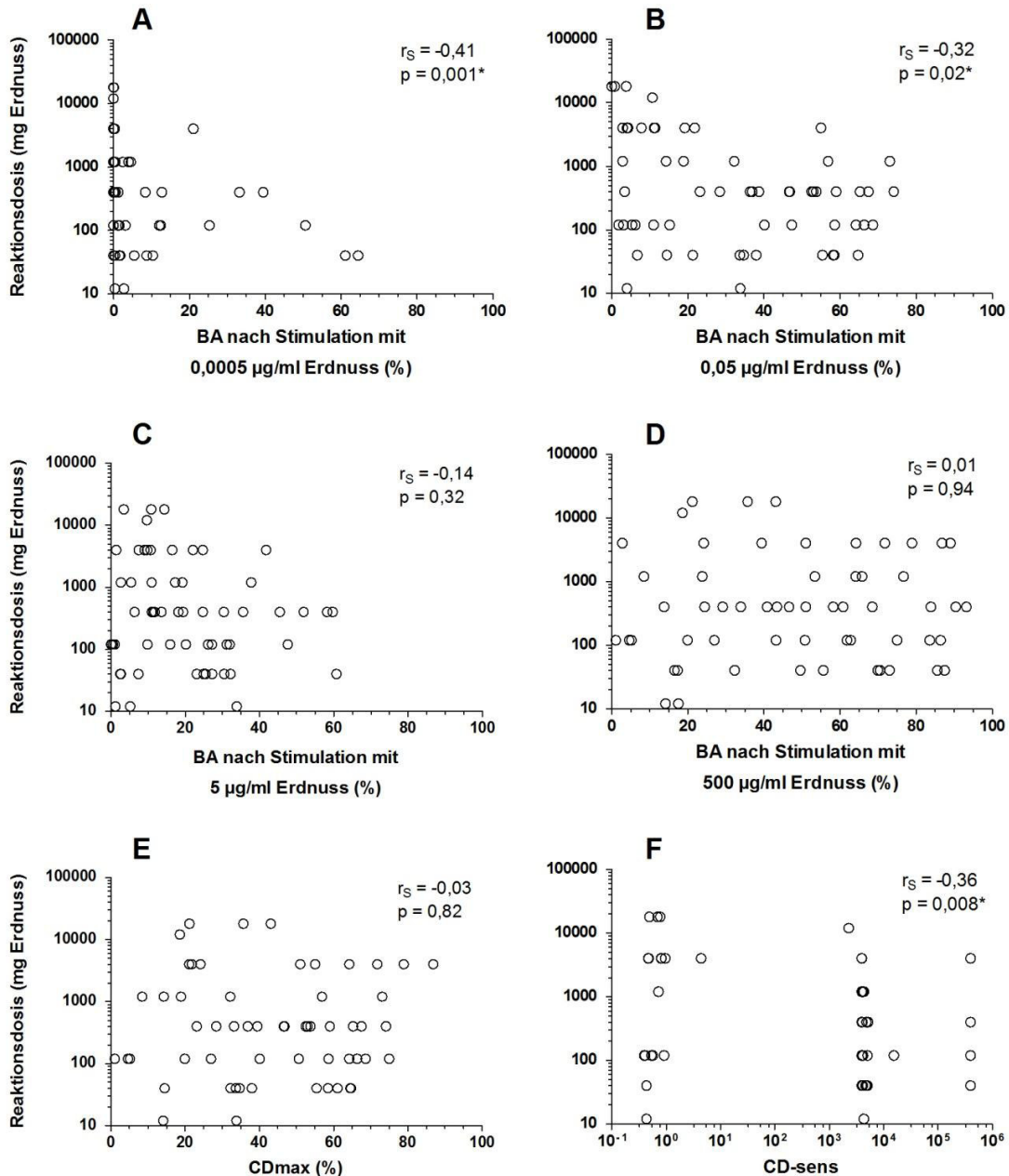


Abb. 18: Korrelationen von Erdnuss-spezifischen Parametern der Basophilenaktivierung und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. * Signifikante Korrelation ($p < 0,05$). Korrelation von **A**: BA nach in vitro-Stimulation mit 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (%) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **B**: BA nach in vitro-Stimulation mit 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (%) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **C**: BA nach in vitro-Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (%) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **D**: BA nach in vitro-Stimulation mit 500 $\mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (%) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **E**: CDmax (= maximale BA bei einer der vier dnusskonzentrationen) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss) und **F**: CD-sens (= $1 / \text{Erdnuss-Konzentration bei } \frac{1}{2} \text{ CDmax} \times 100$) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss).

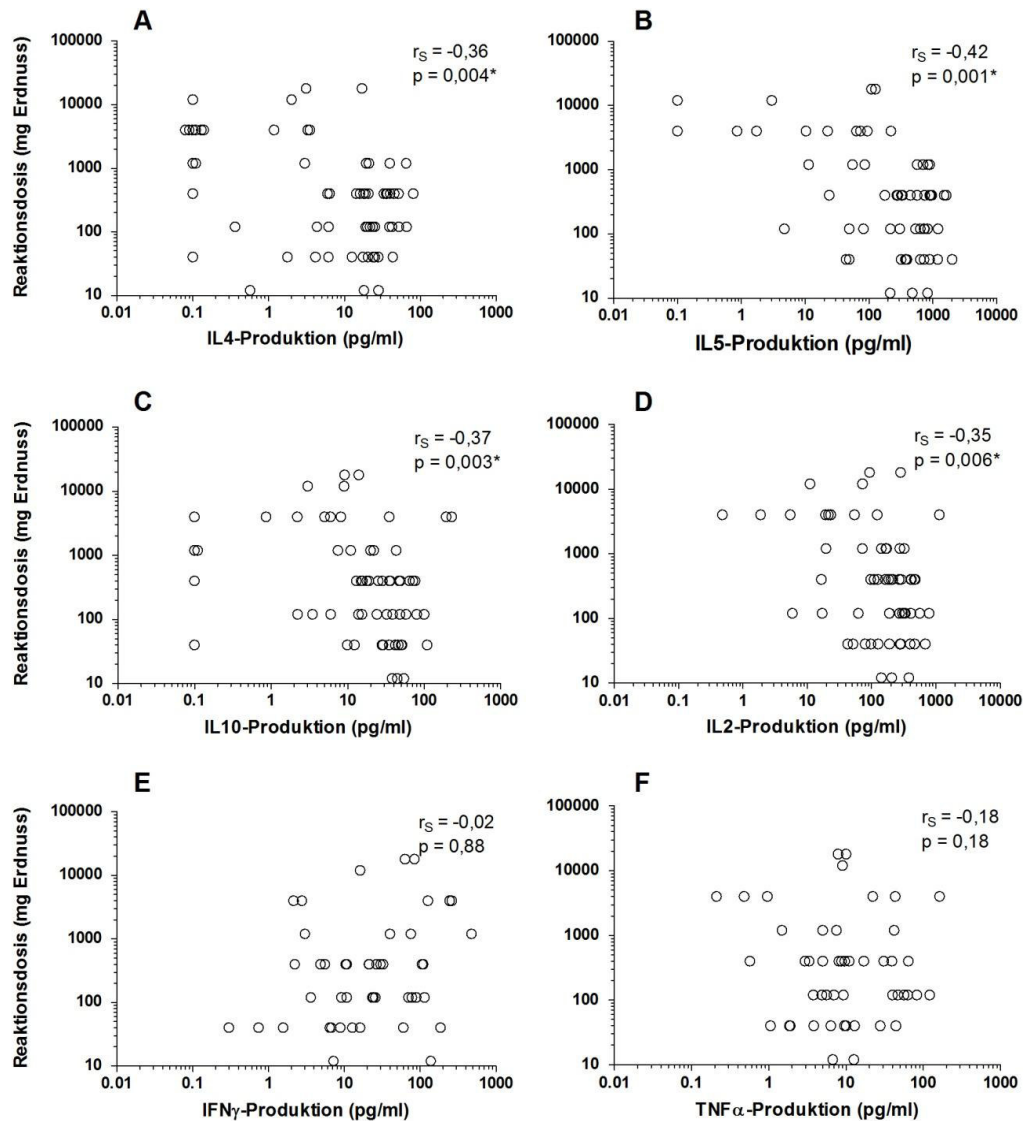


Abb. 19: Korrelationen von Erdnuss-spezifischer Zytokinproduktion und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. * Signifikante Korrelation ($p < 0,05$). PBMCs wurden mit $50 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zytokinproduktion mittels Cytometric Bead Array gemessen. Korrelation von **A**: IL-4-Produktion nach in vitro-Stimulation mit $50 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (pg/ml) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **B**: IL-5-Produktion nach in vitro-Stimulation mit $50 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (pg/ml) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **C**: IL-10-Produktion nach in vitro-Stimulation mit $50 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (pg/ml) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **D**: IL-2-Produktion nach in vitro-Stimulation mit $50 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (pg/ml) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss), **E**: $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nach in vitro-Stimulation mit $50 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (pg/ml) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss) und **F**: $\text{TNF}\alpha$ -Produktion nach in vitro-Stimulation mit $50 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt (pg/ml) und Reaktionsdosis (mg ganze Erdnuss).

3.5. Korrelation von Laborparametern und Schweregrad

Weder die getesteten Allergen-spezifischen Sensibilisierungsmarker (Erdnuss-spezifisches IgE, Ara h2-spezifisches IgE, Erdnussquaddelgröße im Pricktest) noch die Parameter der Basophilenaktivierung und die PBMC-Zytokinproduktion nach in vitro-Erdnussstimulation korrelierten zum Schweregrad nach Sampson [102] unter oraler Provokation (Abb. 20 und Abb. 21, Tab. 13) (restliche Daten nicht gezeigt). Unter Anwendung der alternativen Schweregradschemata nach Mueller [103], nach Astier [104] und nach van der Zee [105] oder nach Korrelation der Anzahl betroffener Organsysteme zeigte sich ebenfalls keine Korrelation (Daten nicht gezeigt).

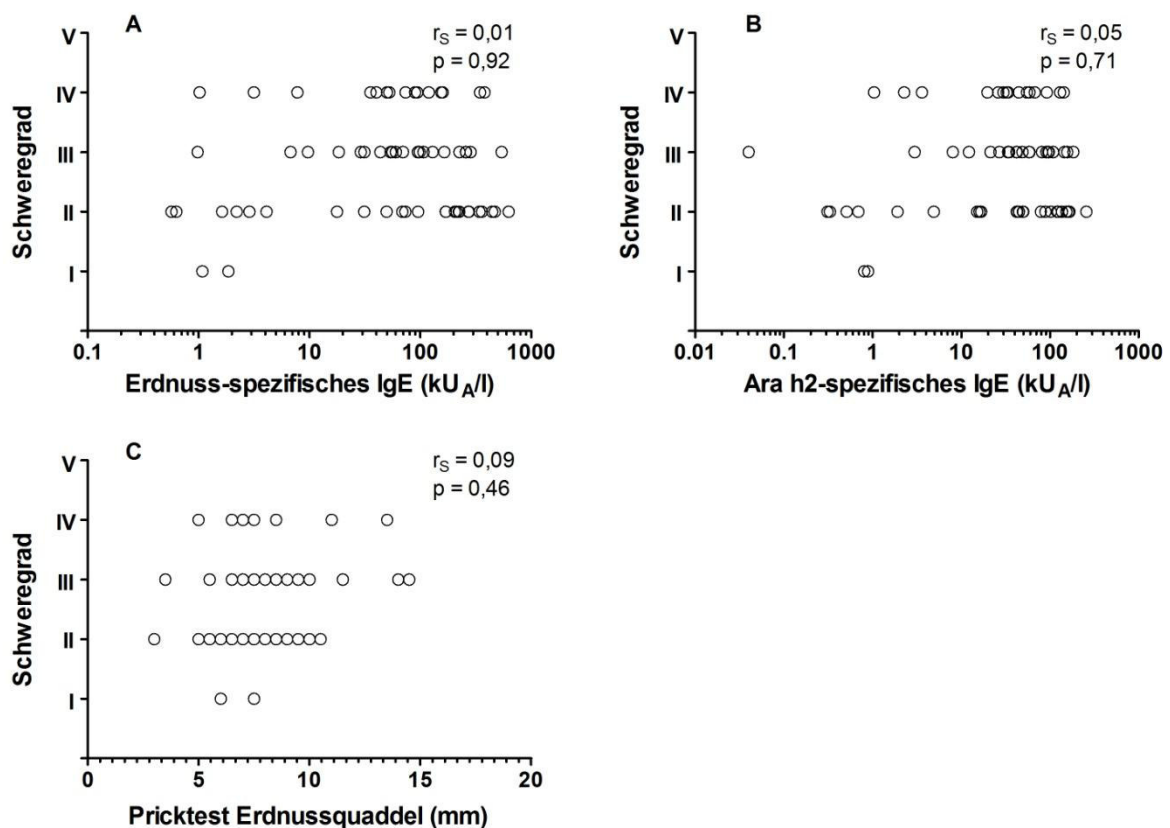


Abb. 20: Korrelationen von Allergen-spezifischen Sensibilisierungsmarkern und Schweregrad der allergischen Reaktion nach Sampson [102] unter oraler Provokation. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. * Signifikante Korrelation ($p < 0,05$). **A:** Erdnuss-spezifisches IgE (kUA/l) und Schweregrad nach Sampson, **B:** Ara h2-spezifisches IgE (kUA/l) und Schweregrad nach Sampson, **C:** Erdnussquaddel im Pricktest (mm) und Schweregrad nach Sampson.

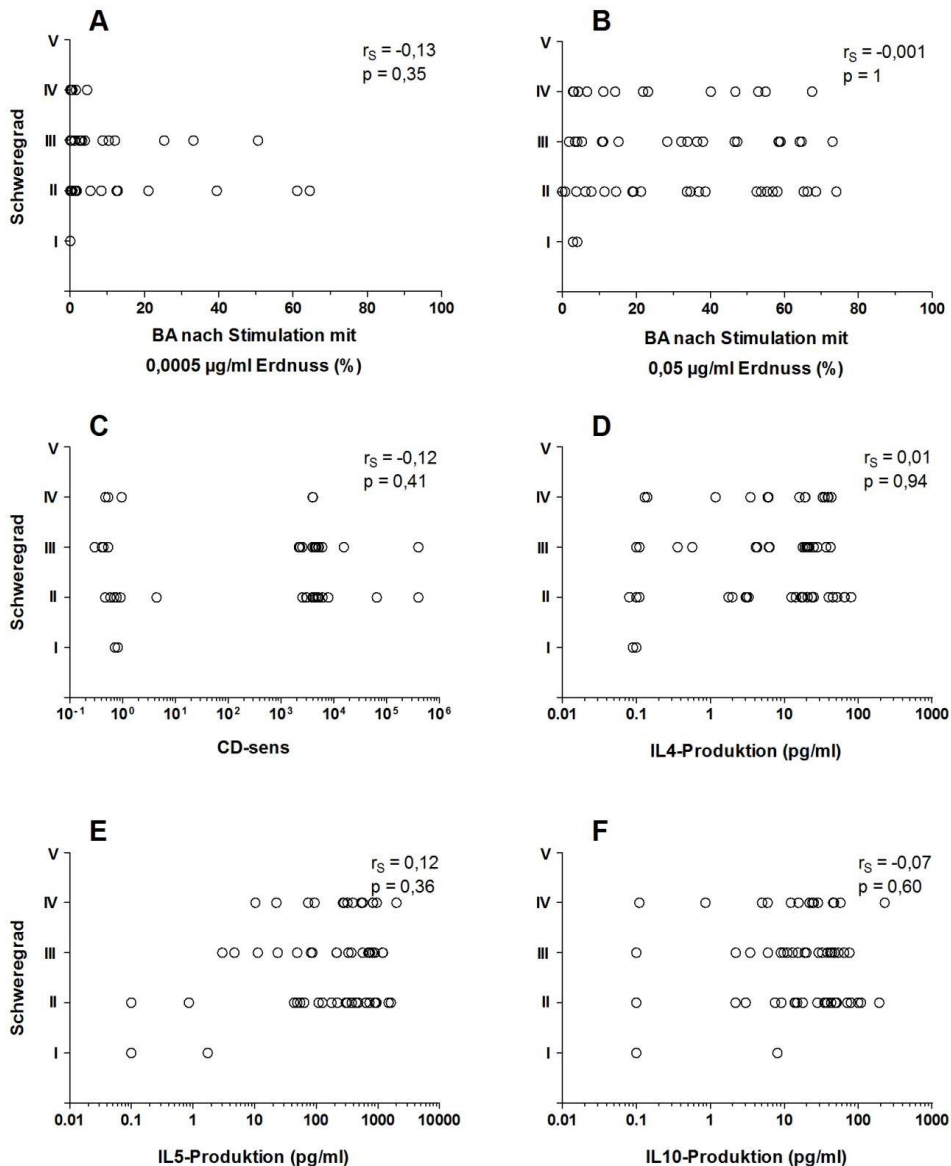


Abb. 21: Korrelationen von Erdnuss-spezifischer Basophilenaktivierung (A-C) bzw. Zytokinproduktion (D-F) und Schweregrad der allergischen Reaktion nach Sampson [102] unter oraler Provokation. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. p = statistische Signifikanz. Korrelation von **A**: BA nach in vitro-Stimulation mit 0,0005 µg/ml Erdnussextrakt (%) und Schweregrad nach Sampson, **B**: BA nach in vitro-Stimulation mit 0,05 µg/ml Erdnussextrakt (%) und Schweregrad nach Sampson und **C**: CD-sens (= 1 / Erdnuss-Konzentration bei $\frac{1}{2}$ CDmax x 100) und Schweregrad nach Sampson. Korrelation von **D**: IL-4-Produktion im Zellüberstand nach PBMC-in-vitro-Stimulation mit 50 µg/ml Erdnussextrakt (pg/ml) und Schweregrad nach Sampson, **E**: IL-5-Produktion im Zellüberstand nach PBMC-in-vitro-Stimulation mit 50 µg/ml Erdnussextrakt (pg/ml) und Schweregrad nach Sampson und **F**: IL-10-Produktion im Zellüberstand nach PBMC-in-vitro-Stimulation mit 50 µg/ml Erdnussextrakt (pg/ml) und Schweregrad nach Sampson.

Tab. 13: Korrelationen von Laborparametern der Sensibilisierung, Basophilenaktivierung und Zytokinprofil sowohl zu Reaktionsdosis als auch zum Schweregrad der allergischen Reaktion nach Sampson [102] unter offener Erdnussprovokation. r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient. Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) sind **fett** gekennzeichnet.

Parameter	Reaktionsdosis		Schweregrad		
	r_s	p	r_s	p	
Erdnuss-spezifisches IgE (kU _A /l)	-0,36	0,004	0,01	0,92	
Ara h2-spezifisches IgE (kU _A /l)	-0,38	0,002	0,05	0,71	
Gesamt-IgE (kU _A /l)	-0,12	0,34	-0,13	0,33	
Erdnussquaddel im Pricktest (mm)	-0,27	0,04	0,09	0,46	
Eosinophile Granulozyten (/nl)	-0,27	0,03	0,04	0,80	
Basophile Granulozyten (/nl)	-0,30	0,02	0,13	0,32	
BA nach RPMI-Stimulation (%)	-0,27	0,03	0,03	0,81	
BA nach anti-FcεRI-Stimulation (%)	-0,05	0,68	-0,20	0,13	
BA nach fMLP-Stimulation (%)	-0,21	0,11	0,21	0,10	
BA nach 0,0005 µg/ml Erdnuss-Stimulation (%)	-0,41	0,001	-0,13	0,35	
BA nach 0,5 µg/ml Erdnuss-Stimulation (%)	-0,32	0,02	-0,001	1	
BA nach 5 µg/ml Erdnuss-Stimulation (%)	-0,14	0,32	-0,21	0,12	
BA nach 500 µg/ml Erdnuss-Stimulation (%)	0,01	0,94	-0,19	0,16	
CDmax (%)	-0,03	0,82	-0,24	0,08	
CD-sens	-0,36	0,008	-0,12	0,41	
Messung im	IL-4-Produktion (pg/ml)	-0,36	0,004	0,01	0,94
Zellüberstand nach	IL-5-Produktion (pg/ml)	-0,42	0,001	0,12	0,36
PBMC-in-vitro-	IL-10-Produktion (pg/ml)	-0,37	0,0003	-0,07	0,6
Stimulation mit	IL-2-Produktion (pg/ml)	-0,35	0,006	0,13	0,32
50 µg/ml	IFN γ -Produktion (pg/ml)	-0,02	0,88	0,09	0,50
Erdnussextrakt	TNF α -Produktion (pg/ml)	-0,18	0,18	-0,06	0,66
(pg/ml)	IL-4-/IFNγ-Produktion	-0,32	0,01	0,01	0,96
	IL-5-/IFNγ-Produktion	-0,27	0,03	0,04	0,75

3.6. Gruppenvergleich

3.6.1. Reaktionsdosisgruppen

48 der 63 Studienteilnehmer zeigten unter oraler Erdnussprovokation bei einer Reaktionsdosis von kleiner oder gleich 1200 mg Erdnuss objektive allergische Symptome („niedrige Reaktionsdosis“), die übrigen 15 Patienten reagierten bei einer Dosis von größer oder gleich 4000 mg („hohe Reaktionsdosis“). Zwischen diesen beiden Gruppen bestand kein Unterschied hinsichtlich Geschlecht, Alter, Familienanamnese für atopische Erkrankungen oder dem Vorliegen weiterer Erkrankungen aus dem allergischen Formenkreis (Tab. 14). Auch die Anzahl der berichteten allergischen Reaktionen auf akzidentellen Erdnussverzehr vor Studienbeginn war in beiden Gruppen ähnlich. Beim Betrachten der Reaktionsschwere dieser „akzidentellen Reaktionen“ zeigte sich jedoch, dass Kinder, die unter Provokation bei niedriger Reaktionsdosis reagierten in der Vorgeschichte signifikant schwerer auf akzidentellen Erdnussverzehr reagiert hatten (Schweregrad nach Sampson $p = 0,01$, Mann-Whitney-U), unabhängig vom verwendeten Schweregradschema (Daten nicht gezeigt), (Tab. 14). Außerdem zeigten Kinder mit niedriger Reaktionsdosis höhere Werte für Sensibilisierungsparameter wie Erdnuss- bzw. Ara h2-spezifisches IgE und Hautpricktest sowie eine höhere Gesamtzahl an Eosinophilen und Basophilen im peripheren Blut als Kinder mit einer Reaktionsdosis von ≥ 4000 mg (Tab. 14), (Abb. 22).

Im Basophilenaktivierungstest lag die Basophilen-Sensitivität (CD-sens) und die BA nach Stimulation mit geringen Erdnussdosen in der Gruppe der Kinder mit „niedriger Reaktionsdosis“ signifikant höher als in der Gruppe „hohe Reaktionsdosis“. Die maximale BA (CDmax) hingegen unterschied sich nicht in beiden Gruppen (Tab. 15).

Die PBMCs der Kinder der Gruppe „niedrige Reaktionsdosis“ produzierten nach Stimulation mit Erdnuss signifikant mehr IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 als die der Kinder der Gruppe „hohe Reaktionsdosis“, wohingegen sich die erdnusspezifische IFN γ - und TNF- α -Produktion in beiden Gruppen nicht unterschied (Tab. 15).

Tab. 14: Vergleich der Reaktionsdosisgruppen der Studienteilnehmer (n=63) I. Es wurden die Gruppen „niedrige Reaktionsdosis“ (= Reaktionsdosis unter Provokation kleiner/gleich 1200 mg) und „hohe Reaktionsdosis“ (= Reaktionsdosis unter Provokation größer/gleich 4000 mg) unterschieden und die Studienteilnehmer entsprechend ihrer Reaktion unter oraler Erdnussprovokation zugeordnet. Signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-U bzw. Fischer-Yates sind **fett** gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Parameter	Niedrige Reaktionsdosis	Hohe Reaktionsdosis	p
	≤ 1200 mg, n=48	≥ 4000 mg, n=15	
	%	%	
Geschlecht männlich	65	53	0,545
Asthma/ bronchiale Hyperreaktivität	60	33	0,081
Allergische Rhinitis	50	51	1
Atopische Dermatitis	67	67	1
Vorliegen anderer NM-Allergien	38	40	1
Akzidentelle Erdnussingestion	96	93	0,564
	Median (Min.-Max.)	Median (Min.-Max.)	p
Alter (Jahre)	8 (3-16)	5 (3-18)	0,366
Reaktionsdosis (mg)	120 (12-1200)	4000 (4000-18000)	< 0,001
Schweregrad der schwersten allergischen Reaktion unter Provokation (Sampson [102])	III (II-IV)	II (I-IV)	0,355
Anzahl akzidenteller Erdnussingestionen	2 (0-6)	1 (0-3)	0,054
Schweregrad der schwersten allergischen Reaktion nach akzidentellem Erdnussverzehr (Sampson [102])	IV (I-V)	II (I-IV)	0,014
Erdnuss-spezifisches IgE (kU_A/l)	124 (2,8-624)	2,2 (0,6-93,8)	< 0,001
Ara h2-spezifisches IgE (kU_A/l)	58,3 (0,7-256)	1,9 (0,04-58,6)	< 0,001
Gesamt-IgE (kU_A/l)	397 (59,4-2869)	185 (7,8-1419)	0,126
Erdnussquaddel im Pricktest (mm)	8,5 (3,5-14,5)	7 (3-9,5)	0,002
Eosinophile Granulozyten (/nl)	0,51 (0,13-1,5)	0,37 (0,1-0,85)	0,025
Basophile Granulozyten (/nl)	0,04 (0,01-0,12)	0,03 (0,01-0,05)	0,049

Tab. 15: Vergleich der Reaktionsdosisgruppen der Studienteilnehmer (n=63) II. Es wurden die Gruppen „niedrige Reaktionsdosis“ (= Reaktionsdosis unter Provokation kleiner/gleich 1200 mg) und „hohe Reaktionsdosis“ (= Reaktionsdosis unter Provokation größer/gleich 4000 mg) unterschieden und die Studienteilnehmer entsprechend ihrer Reaktion unter oraler Erdnussprovokation zugeordnet. Signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-U bzw. Fischer-Yates sind **fett** gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Parameter		Niedrige Reaktionsdosis ≤ 1200 mg, n=48 Median (Min.-Max.)	Hohe Reaktionsdosis ≥ 4000 mg, n=15 Median (Min.-Max.)	p
BA nach RPMI-Stimulation (%)		0,2 (0-13)	0,1 (0-6)	0,011
BA nach anti-Fc ϵ RI-Stimulation (%)		78 (6-94)	58 (17-95)	0,260
BA nach fMLP-Stimulation (%)		15 (0,1-85)	8 (0-35)	0,055
BA nach 0,0005 μg/ml Erdnuss-Stimulation (%)		2 (0-65)	0 (0-21)	0,001
BA nach 0,5 μg/ml Erdnuss-Stimulation (%)		39 (2-74)	8 (0-55)	0,001
BA nach 5 μ g/ml Erdnuss-Stimulation (%)		19 (0-61)	11 (1-42)	0,136
BA nach 500 μ g/ml Erdnuss-Stimulation (%)		51 (1-93)	43 (3-89)	0,985
CDmax (%)		43 (1-75)	43 (19-87)	0,783
CD-sens		4021 (0,4-400000)	0,8 (0,5-400000)	0,006
Im Zell- überstand nach PBMC- in-vitro- Stimula- tion mit 50 μ g/ml Erdnuss- extrakt.	IL-4-Produktion (pg/ml)	21 (0-81)	0 (0-17)	< 0,001
	IL-5-Produktion (pg/ml)	553 (5-2006)	23 (0-222)	< 0,001
	IL-10-Produktion (pg/ml)	29 (0-109)	8 (0-229)	0,026
	IL-2-Produktion (pg/ml)	196 (6-788)	23 (0,5-1131)	0,001
	IFN γ -Produktion (pg/ml)	11 (0-476)	3 (0-261)	0,797
	TNF α -Produktion (pg/ml)	7 (0-121)	1 (0-163)	0,326
	IL-4-/IFNγ-Produktion	2,23 (0-651)	0 (0-20)	0,002
	IL-5-/IFNγ-Produktion	59,12 (0,12-9568)	1,5 (0-735)	< 0,001

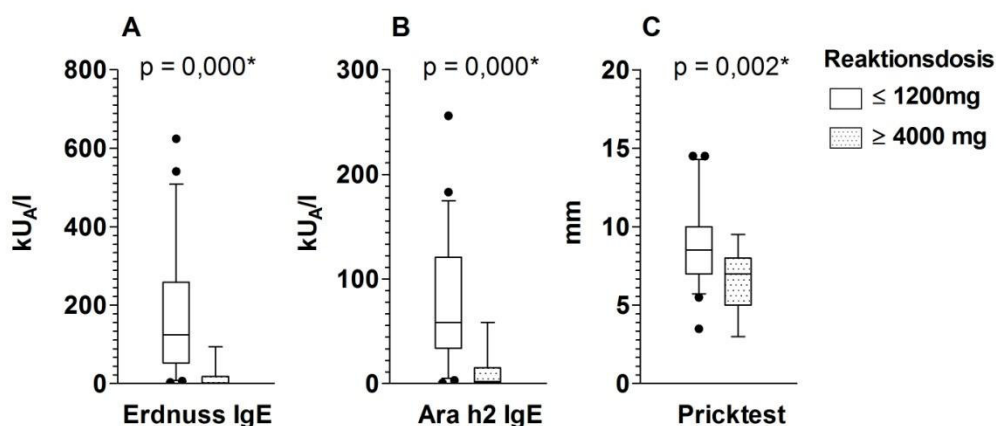


Abb. 22: Vergleich der Allergen-spezifischen Sensibilisierungsmarker in den Reaktionsdosisgruppen „niedrige Reaktionsdosis“ (= Reaktionsdosis unter Provokation kleiner/gleich 1200 mg, □) und „hohe Reaktionsdosis“ (= Reaktionsdosis unter Provokation größer/gleich 4000 mg, ▨). Box-and-Whisker-Plot, unterer und oberer Whisker markieren die 5. bzw. 95. Perzentile. * Signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U).

3.6.2. Schweregradgruppen

Mit einem Schweregrad nach Sampson [102] von I bis III unter Erdnussprovokation reagierten 47 von 63 Patienten, 16 Patienten reagierten mit einem Schweregrad größer als III. Beide Gruppen unterschieden sich in keinem der o.g. anamnestischen, klinischen, Basophilen- oder Zytokin-Parameter voneinander. Es bestand lediglich ein signifikanter Unterschied bezüglich einer eventuell erhaltenen Therapie unter der Provokation: 30 % der Patienten mit einer Reaktionsschwere Grad I-III erhielten eine Therapie unter Provokation versus 94% der Kinder mit einer Reaktion $>$ Grad III ($p = 0,000$).

3.7. Korrelationen von Markern der Basophilenaktivierung und anderen Markern der Sensibilisierung und T-Zell-Aktivierung

3.7.1. Korrelation von Markern der Erdnuss-spezifischen Basophilenaktivierung und Erdnuss-spezif. Sensibilisierungsmarkern sowie Erdnuss-spezif. Zytokinproduktion

Die serologischen Marker für Erdnusspezifische Sensibilisierung (Erdnuss-spezifisches IgE, Ara h2-spezifisches IgE) korrelierten schwach bis gut mit den Erdnuss-spezifischen Parametern der Basophilenaktivierung (Tab. 16). Je höher der Erdnusspezifische IgE-Wert des Patienten lag, desto stärker war die BA nach Stimulation mit niedrigen Erdnusskonzentrationen und umso höher war die Basophilen-Sensitivität (CD-sens), ein Zusammenhang, der sich mit Ara h2-

spezifischem IgE noch deutlicher zeigte. Die Basophilenaktivierung nach Stimulation mit der höchsten Erdnusskonzentration (500 µg/ml) zeigte hingegen zu keinem der beiden serologischen Sensibilisierungsmarkern eine signifikante Korrelation (Tab. 16). Die Größe der Erdnussquaddel im Hautpricktest zeigte nur zur Basophilen-Sensitivität (CD-sens) eine schwache Korrelation, jedoch zu keinem weiteren Parameter der Basophilenaktivierung (Tab. 16).

Die Basophilenaktivierung nach Stimulation mit niedrigen Erdnusskonzentrationen (0,0005 µg/ml und 0,05 µg/ml Erdnussextrakt) und die Basophilen-Sensitivität (CD-sens) korrelierten schwach mit der Erdnuss-spezifischen Produktion von IL-4 und IL-5 durch PBMCs. Eine Korrelation zwischen der Erdnuss-spezifischen T_{H1}-Zytokin-Produktion (IFN-γ, TNF-α) und Parametern der Erdnuss-spezifischen Basophilenaktivierung konnte bis auf eine schwache inverse Korrelation von der Erdnuss-spezifischen IFN-γ-Produktion und CD-sens nicht nachgewiesen werden (Tab. 16).

Tab. 16: Korrelationen von Erdnuss-spezifischer Basophilenaktivierung (BA) und Markern der Erdnuss-spezifischen Sensibilisierung sowie Erdnuss-spezifischer PBMC-Zytokinproduktion. Dargestellt als r_s = Spearman-Korrelationskoeffizient signifikanter Korrelationen ($p < 0,05$). n.s. = nicht signifikant (r_s -Wert nicht gezeigt).

Parameter		BA (%) nach Stimulation mit Erdnussextrakt der Konzentration:				CDmax (%) CD-sens	
		0,0005 µg/ml	0,5 µg/ml	5 µg/ml	500 µg/ml		
Erdnuss-spezifisches IgE (kU _A /l)		0,38	0,51	0,35	n.s.	n.s.	0,49
Ara h2-spezifisches IgE (kU _A /l)		0,45	0,60	0,43	n.s.	n.s.	0,54
Erdnussquaddel im Pricktest (mm)		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,27
Im Zellüberstand nach PBMC-in-vitro-Stimulation mit 50 µg/ml Erdnuss-extrakt.	IL-4-Produktion (pg/ml)	0,32	0,31	n.s.	n.s.	n.s.	0,30
	IL-5-Produktion (pg/ml)	0,31	0,34	n.s.	n.s.	n.s.	0,33
	IL-10-Produktion (pg/ml)	n.s.	n.s.	0,31	n.s.	n.s.	n.s.
	IL-2-Produktion (pg/ml)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	IFNγ-Produktion (pg/ml)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,27
	TNFα-Produktion (pg/ml)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	IL-4-/IFNγ-Produktion	n.s.	0,36	n.s.	n.s.	n.s.	0,26
IL-5-/IFNγ-Produktion	n.s.	0,33	n.s.	n.s.	n.s.	0,35	

3.7.2. Korrelation von Markern der Allergen-unspezifischen Basophilenaktivierung und Erdnuss-spezifischen Sensibilisierungsmarkern sowie Erdnuss-spezifischen Zytokinproduktion

Die Basophilenaktivierung (BA) nach Stimulation mit der Negativkontrolle (RPMI) korrelierte nicht mit Markern der Erdnuss-spezifischen Sensibilisierung (Daten nicht gezeigt), wohingegen die BA nach Stimulation mit fMLP als IgE-unabhängiger Positivkontrolle schwach mit der Erdnussquaddelgröße im Pricktest korrelierte ($r_s=0,37$, $p=0,003$). Die BA nach Stimulation mit der IgE-abhängigen Positivkontrolle, anti-FcεRI, zeigte eine schwache Korrelation mit den serologischen Erdnuss-spezifischen Sensibilisierungsmarkern, Erdnuss-spezifisches IgE ($r_s=0,35$, $p=0,005$) und Ara h2-spezifisches IgE ($r_s=0,38$, $p=0,003$).

Die maximale BA bei einer der getesteten Erdnussextrakt-Konzentrationen (CDmax) korrelierte weder zu Erdnuss-spezifischen Sensibilisierungsmarkern, noch zu Erdnuss-spezifischen PBMC-Zytokin-Produktion (Tab. 16). Die interindividuelle Spannbreite der Basophilenaktivierung und damit auch die der maximalen BA ist groß, bedingt durch die individuell unterschiedlich stark ausgeprägte intrazelluläre Signalübermittlung der Basophilen [21] und daher nicht Allergen-spezifisch bedingt. Demzufolge repräsentiert CDmax als Parameter der maximalen Basophilenaktivierung eher Allergen-unspezifische Zellaktivierung bei optimaler IgE-vermittelter Basophilenaktivierung, vergleichbar mit anti-FcεRI-Stimulation.

Eine Korrelation der Parameter der Allergen-unspezifischen Basophilenaktivierung mit der Erdnuss-spezif. PBMC-Zytokinproduktion konnte nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.7.3. Korrelation von Markern der BA und Allergen-unspezif. Sensibilisierungsmarkern

Das allergenunspecifische Gesamt-IgE korrelierte moderat zur Basophilenaktivierung nach Stimulation mit 0,05 µg/ml, 5 µg/ml und 500 µg/ml Erdnussextrakt ($r_s=0,41$, $p=0,002$, $r_s=0,41$, $p=0,001$, $r_s=0,50$ und $p < 0,001$), zur maximalen BA nach Stimulation mit Erdnuss (CDmax, $r_s=0,45$, $p < 0,001$), zur Basophilen-Sensitivität (CD-sens, $r_s=0,40$, $p=0,002$) und zur BA nach Stimulation mit anti-FcεRI ($r_s=0,49$, $p < 0,001$).

Während die Zahl Eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut schwach mit der BA nach Stimulation mit 0,0005 µg/ml, 0,05 µg/ml und 500 µg/ml Erdnussextrakt ($r_s=0,31$, $p=0,017$, $r_s=0,34$, $p=0,010$ und $r_s=0,28$, $p=0,032$), mit der maximalen BA nach Stimulation mit Erdnuss (CDmax, $r_s=0,27$, $p=0,043$) und mit der Basophilen-Sensitivität (CD-sens, $r_s=0,26$, $p=0,047$) korrelierten, zeigte die Zahl Basophiler Granulozyten im peripheren Blut keine Korrelation mit Markern der Basophilenaktivierung (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1. Methodik

4.1.1. Studienpopulation

Für die vorliegende Arbeit wurden Patienten rekrutiert, die an einer Interventionsstudie zur Oralen Immuntherapie (OIT) bei Erdnussallergie teilnehmen wollten. Die Studienpopulation glich somit nicht einer normalverteilten Population erdnussallergischer Kinder, sondern repräsentierte vielmehr eine „Hochrisiko-Gruppe“ von Erdnussallergikern, die bereits eine oder mehrere z.T. schwere allergische Reaktionen nach akzidenteller Erdnussexposition vor Studienbeginn erfahren hatten. Dieser Umstand steigert deren Motivation an Studien zu neuen Therapiemethoden teilzunehmen [124]. 90 % der Studienteilnehmer hatte mindestens einmal mit allergischen Symptomen nach ungewolltem Erdnussverzehr reagiert, wovon fast zwei Drittel der Patienten (32/56) mindestens einmal mit einer Grad IV- oder Grad V-Reaktion (Schweregrad nach Sampson et al. [102]) reagiert hatten (siehe 3.1.1.). Dass diese Zahlen höher lagen als in gewöhnlichen Populationen von erdnussallergischen Kindern, zeigte der Vergleich mit einer retrospektiven Studie an 782 US-amerikanischen erdnussallergischen Kindern [67]. Über einen Beobachtungszeitraum von 5 Jahren hatten in dieser Studie insgesamt (vor oder nach Diagnosestellung der Allergie) 58 % der Patienten mindestens eine akzidentelle allergische Reaktionen nach Erdnusskontakt erlitten, nach Diagnosestellung der Erdnussallergie waren es 31 % der Patienten. Schwere allergische Symptome (entsprechend dem Schweregrad IV oder V nach Sampson et al. [102] in vorliegender Arbeit) zeigten sich bei einem Viertel dieser akzidentellen Reaktionen [67].

Die Hälfte der Studienteilnehmer vorliegender Arbeit zählte darüber hinaus zur Gruppe der Hochrisiko-Erdnussallergiker, da sie an Asthma bronchiale bzw. bronchialer Hyperreagibilität erkrankt waren und somit ein höheres Risiko für eine anaphylaktische Reaktion nach Erdnusskontakt hatten [52].

In dieser Arbeit litten 67 % der Patienten an Atopischer Dermatitis, 51 % an Allergischer Rhinokonjunktivitis, 54 % an Asthma bzw. bronchialer Hyperreagibilität und 38 % an weiteren Nahrungsmittelallergien (siehe 3.1.1.). Diese Verteilung an Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis ist ähnlich dem in Studien zur Prävalenz der Erdnussallergie gefundenen Auftreten atopischer Erkrankungen in der erdnussallergischen Population [50, 54]. Ein ähnliches Muster zeigten auch die Studienpopulationen zweier niederländischen Studien mit 126 erdnussallergischen Kindern zu Einflussfaktoren auf die Reaktionsdosis unter oraler

Erdnussprovokation [105] bzw. mit 22 erdnussallergischen Kindern zur Bestimmung individueller Schwellenwerte [125].

Die Sensibilisierung auf Erdnuss lag in vorliegender Arbeit im Median bei 74 kU_A/l erdnusspezifisches IgE (siehe Tab. 7) und damit höher als in anderen veröffentlichten Studien zur Schwellenwertbestimmung oder oralen Provokation bei Erdnussallergikern. So lag das erdnusspezifische IgE in diesen Studien zwischen 5,6 kU_A/l und 36 kU_A/l [42, 45, 90, 91, 105, 125, 126]. Die mediane Quaddelgröße von 8 mm im Hautpricktest (siehe Tab. 7) war vergleichbar mit den Ergebnissen einer Studie an 40 erdnussallergischen Kindern und Erwachsenen (mediane Quaddelgröße im Erdnuss-Hautpricktest 9 mm) [90] und einer Studie mit 27 Erdnussallergikern (mittlere Erdnussquaddelgröße im Pricktest 10,1 mm bei Kindern mit Anaphylaxie unter offener oraler Erdnussprovokation (= Reaktion des kardiovaskulären und/oder respiratorischen Systems und zusätzlich eines weiteren Organsystems)) [126]. Dang et al. zeigten in 100 erdnussallergischen Kleinkindern ebenfalls ein mit vorliegender Arbeit vergleichbares Ergebnis im Hautpricktest (mittlere erdnusspezifische Quaddelgröße 8,67 mm), jedoch ein deutlich geringeres Erdnuss- und Ara h2-spezifisches IgE (Median 4,9 kU_A/l und 1,88 kU_A/l) [127].

Die Studienpopulation dieser Arbeit wich also in mehrfacher Hinsicht von der normalverteilten Population erdnussallergischer Patienten ab. Vor diesem Hintergrund wurde mit dem vorliegendem Studienkollektiv von 63 Patienten eine der größten Gruppen von Kindern mit Erdnussallergie untersucht, die ein besonders hohes Risiko für das Auftreten schwerer allergischer Reaktionen unter oraler Provokation und im alltäglichen Leben haben.

4.1.2. Orale Provokation

In dieser Arbeit wurde für die orale Erdnussprovokation ein modifiziertes Protokoll verwendet, das ein Steigerungsintervall zwischen den einzelnen Dosierungsschritten von zwei Stunden, anstelle der üblichen 15 bis 30 Minuten, vorsah (siehe 2.3.1.). Hierunter reagierten mehr als zwei Drittel der Patienten erst nach 30 oder mehr Minuten nach Gabe der entsprechenden Erdnussdosis mit objektiven allergischen Symptomen vom Soforttyp. Im Median lag die Zeit bis zum Auftreten von allergischen Symptomen bei 55 Minuten, 8 der 15 Patienten mit Grad-IV-Symptomen zeigten diese erst 55 bis 110 Minuten nach Verzehr der individuellen Erdnussdosis (siehe 3.2.2.). Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass ein Provokationsprotokoll mit Steigerungsintervallen von 2 Stunden zur präziseren Bestimmung individueller Schwellenwerte beitragen könnte. Kürzere Steigerungsintervalle können wegen kumulativer Effekte falsch hohe

Schwellenwerte ergeben, wenn die allergische Reaktion irrtümlicherweise der schon verabreichten höheren Dosis zugeordnet wird.

Überdies wurden die Umstände akzidenteller Erdnussexposition im Alltag des Patienten durch ein längeres Steigerungsintervall unter Provokationstestung möglicherweise besser nachgeahmt, da die Patienten im privaten Umfeld im Falle der akzidentellen Erdnussexposition zumeist punktuell Erdnusskontakt ausgesetzt sind. Vor diesem Hintergrund müsste zur Bestimmung der tatsächlichen Reaktionsschwelle bei akzidenteller Reaktion u.U. ein Provokationsprotokoll mit Verabreichung von nur einer Erdnussdosis pro Tag vorgesehen werden. Dies wäre im klinischen Alltag jedoch nicht praktikabel. Auch aus diesem Grund eignet sich ein Steigerungsintervall von zwei Stunden möglicherweise besser zu Bestimmung individueller Reaktionsschwellen.

Ein Nachteil vorliegender Arbeit ist, dass keine DBPCFC sondern eine offene, nicht-geblindete Erdnussprovokation durchgeführt worden ist (siehe 2.3.1.). Nach den Leitlinien der DGAKI und des PRACTALL Consensus Reports ist u.a. unter Erwartung allergischer Soforttypreaktionen die Durchführung einer offenen Provokation als Alternative zur DBPCFC möglich und bei Auftreten objektiver allergischer Soforttypreaktionen als Diagnostikum ausreichend [83, 128]. In dieser Arbeit war die Definition der allergischen Reaktion unter Provokation, gleichbedeutend mit den Abbruchkriterien der Provokation, sehr eng gefasst (Angioödem, ≥ 3 Nicht-Kontakt-Urtikaria, Erbrechen > 10 Minuten nach Erdnussgabe, Diarrhoe, Rhinokonjunktivitis, Heiserkeit, trockener oder bellender Husten, Pfeifen/Giemen, Peak-Flow-Abfall, Stridor, Dyspnoe, Zyanose, Atemstillstand, Tachykardie, Bradykardie, Arrhythmie, arterielle Hypotonie, Kreislaufstillstand, Bewusstseinsverlust, siehe Tab. 3). Nur eindeutig objektive allergische Reaktionen zählten für den Abbruch der Provokation und damit für die Bestimmung der individuellen Reaktionsschwelle, wobei alle Provokationen von derselben allergologisch erfahrenen Studienärztin begleitet wurden und die Entscheidung zum Provokationsabbruch in jedem Fall bei eben dieser Ärztin lag. Hierdurch wurden abweichende Beurteilung der allergischen Symptome durch verschiedene Ärzte und beobachterabhängige Auslegung der Abbruchkriterien ausgeschlossen.

Die Patienten wurden nur dann provoziert, wenn vorher durch eine klinische Untersuchung eine Infektion ausgeschlossen worden war und koexistierende atopische Erkrankungen stabil waren, da diesen Faktoren das Ergebnis der oralen Provokation maßgeblich beeinflussen können [83, 96].

In dieser Arbeit zeigten 65 % der Kinder unter oraler Erdnussprovokation objektive allergische Symptome der Haut, 35 % Symptome der unteren Atemwege und 48 % gastrointestinale Symptome (siehe 3.2.3.). Ähnliche Reaktionen unter Provokation erhoben van der Zee et al. bei der Analyse der DBPCFC-Daten von 126 erdnussallergischen Kindern mit Hautsymptomen in 65 % der Patienten und Symptomen des Gastrointestinaltraktes in 54 % der Kinder [105]. Abweichend zu den Reaktionen in der hier vorliegenden Studie war jedoch der Anteil an Kindern, die mit Symptomen der unteren Atemwege reagiert hatte. Mit 8 % war dieser bei van der Zee et al. deutlich geringer als in vorliegender Arbeit, obwohl der Anteil an Kindern mit Asthma bronchiale bei van der Zee et al. mit 79 % größer war (versus 54 % in vorliegender Studienpopulation, siehe 3.1.1.) [105]. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte eine abweichende Zuordnung respiratorischer Symptome zu oberen bzw. unteren Atemwegen sein. Van der Zee et al. definierten Symptome der unteren Atemwege als Symptome der „Lungen“, ohne diese näher zu beschreiben [105]. In vorliegender Arbeit wurden z.B. trockener Husten, Dyspnoe, Pfeifen/Giemen zu Symptomen der unteren Atemwege gezählt. Mit der Symptomverteilung in vorliegender Arbeit vergleichbare Ergebnisse zeigten auch Taylor et al. bei der Auswertung von 286 DBPCFCs erdnussallergischer Kinder und Erwachsener: Es reagierten 32 % der Patienten mit Symptomen der unteren Atemwege und 48 % mit Symptomen des Gastrointestinaltraktes (Bauchschmerzen, Erbrechen, Diarrhoe) [99]. Ein ähnlicher Anteil an gastrointestinalen Reaktionen (54%, objektive und subjektive Symptome) fand sich auch bei Wensing et al. in 26 erdnussallergischen Erwachsenen [91]. Die Symptomverteilung unter offener Erdnussprovokation in der Studienpopulation vorliegender Arbeit war demzufolge vergleichbar mit bisher veröffentlichten Ergebnissen aus der Analyse von DBPCFC-Daten erdnussallergischer Patienten.

Für die qualitative Auswertung der klinischen Symptome (= Schwere der allergischen Reaktion) unter oraler Erdnussprovokation existiert in der Literatur eine Vielzahl an Graduierungssystemen und es gibt kein einheitliches Schweregradsystem, das zur Beurteilung der Reaktionsschwere unter oraler Nahrungsmittelprovokation empfohlen wird. In dieser Arbeit wurde ein von Sampson et al. vorgeschlagenes fünfstufiges Schweregradschema für nahrungsmittelinduzierte Anaphylaxie verwendet [102], das ähnlich von Benhamou et al., Rolinck-Werninghaus et al. und Eller et al. angewandt wurde [86, 87, 129]. Anhand dieses Schweregradsystems lag der Schweregrad der Reaktion unter oraler Erdnussprovokation in der hier vorliegenden Studie im Median bei III (siehe 3.2.3. und Tab. 10). Limitiert ist dieses Schweregradsystem dadurch, dass „Multi-Organ-Reaktionen“, also Reaktionen, die mehrere Organsysteme betreffen, nicht

gesondert berücksichtigt werden. Mueller et al, Astier et al. und Van der Zee et al. verwendeten jeweils eigene Schweregrade (siehe 2.3.3.), wobei Mueller eine dreistufige Schweregradeinteilung (milde/moderate/schwere Reaktion) der anaphylaktischen Reaktion bei Insektengiftallergie entwickelt hatte, die die Reaktionsschwere abhängig vom betroffenen Organsystem definierte [103] und von einigen Autoren auch in Studien zur oralen Nahrungsmittelprovokation verwendet wurde. Das System zur Einteilung der Schwere der allergischen Reaktion unter oraler Provokation von Astier et al. berücksichtigt u.a. die Anzahl betroffener Organsysteme [104] und van der Zee et al. verwendeten einen Schweregradindex, der sowohl die Anzahl der betroffenen Organsysteme beinhaltet, als auch die Reaktionsschwere ähnlich wie bei Mueller et al. abhängig davon beurteilt, welches Organsystem betroffen ist [105]. Zum Vergleich der verschiedenen Schweregradsysteme wurden die Ergebnisse der oralen Erdnussprovokationen vorliegender Studienpopulation mit den Schweregradsystemen von Mueller et al. [103], Astier et al. [104] und van der Zee et al. [105] analysiert und der Schweregradverteilung nach Sampson et al. [102] gegenübergestellt. Die Anwendung der Schweregrade nach Mueller et al. und Astier et al. lieferte ein mit dem Sampson-Grad vergleichbares Bild (Median Grad II von maximal III bzw. Grad III von maximal V). Die Anwendung der Schweregradeinteilung nach van der Zee et al. ergab hingegen einen niedrigeren medianen Schwereindex (Index 3 von maximal 12) (siehe Tab. 11). Dennoch änderte sich das Ergebnis der weiteren Analyse der Studiendaten in Hinblick auf die Berechnung von Korrelationen mit anamnestischen und immunologischen Parametern nicht, unabhängig davon welches Schweregradsystem der Berechnung der Reaktionsschwere zugrunde lag (Daten nicht gezeigt). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Schweregradeinteilung nach Sampson et al. [102] eine mit anderen veröffentlichten Schweregradsystemen [103-105] vergleichbare Aussagekraft besitzt.

4.1.3. Basophilenaktivierungstest (BAT)

Immunologische Testverfahren, die auf der *in vitro*-Aktivierung Basophiler Granulozyten basieren und die Analyse der Effektorzellen ermöglichen, sind in vielerlei Hinsicht vorteilhaft, bergen jedoch auch einige Fallstricke in Methodik und Interpretation [21, 115, 130-132]. Der Basophilenaktivierungstest mittels Durchflusszytometrie, wie in vorliegender Studie angewandt, ist eines dieser Testverfahren. Zu seinen Vorteilen zählt die vergleichsweise einfache Materialgewinnung, da Basophile mit einem Anteil von ca. 1 % an der Leukozytenpopulation frei im peripheren Blut zirkulieren. Trotz dieses geringen Anteils der Basophilen an der

Gesamtzellzahl, kann der BAT in heparinisiertem Vollblut ohne vorangehende aufwendige Zellisolation durchgeführt werden, wenn entsprechende Basophilen-spezifische Oberflächenmarker zur Identifizierung der Basophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie eingesetzt werden. So liefert der BAT Ergebnisse schon nach einer verhältnismäßig kurzen Analysezeit (2 bis 3 Stunden) und aus einem kleinen Probenvolumen (ca. 1 ml) [131] (siehe 2.7.4.).

Der Basophilenaktivierungstest hat sich allerdings bislang nicht als diagnostisches Instrument etablieren können und auch in der Forschung stellt er keine Standardtestmethode dar, sodass kein einheitliches Protokoll zur Durchführung des Tests existiert. Bisher konnte eine Vielzahl an Aktivierungsmarkern für Basophile Granulozyten identifiziert werden, die Anwendung im BAT finden können. Die verschiedenen Marker repräsentieren jedoch unterschiedliche Zellaktivierungswege und stehen nicht zwangsläufig mit der allergenspezifischen Mediatorausschüttung nach Kreuzvernetzung der IgE-tragenden FcεRI-Rezeptoren der Basophilen Granulozyten in Verbindung. Die häufigsten verwendeten Marker sind die Oberflächenproteine CD63, CD203c und CD69, wobei jedes dieser Proteine aufgrund andere Stimuli hochreguliert werden kann: Die CD63-Expression auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten ist assoziiert mit der sogenannten „anaphylaktischen Degranulation“ mit Histaminausschüttung nach Allergenkontakt. Dvorak et al. identifizierten daneben jedoch noch die sogenannte „Piecemeal-Degranulation“, die mit Histaminsekretion und nur geringer CD63-Hochregulation einhergeht [133]. CD203c wird durch unterschiedliche Stimuli, u.a. Interleukin-3 (IL-3), vermehrt auf der Zellmembran Basophiler exprimiert und ist u.U. bei kontinuierlicher Allergenexposition in vivo schon maximal hochreguliert, was die Aussagekraft bezüglich allergenspezifischer Basophilenaktivierung einschränkt. Darüber hinaus fanden Shreffler et al. bei Nahrungsmittelallergikern und bei Patienten mit Atopischer Dermatitis eine besonders hohe CD203c-Expression [130]. Das Oberflächenprotein CD69 wird nach Zytokinkontakt, z.B. mit IL-3, auf der Zellmembran Basophiler Granulozyten vermehrt exprimiert [134]. In vorliegender Arbeit wurden zunächst CD63 und CD203c als Aktivierungsmarker der Basophilen Granulozyten eingesetzt. Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft des Proteins CD203c als Aktivierungsmarker und der deutlichen CD63-Hochregulation nach Basophilenstimulation wurde jedoch auf eine weitere Auswertung bezüglich der CD203c-Hochregulation verzichtet.

Einige kommerziell erhältliche BAT-Testkits sehen die Zugabe von IL-3 zur Steigerung der Basophilenantwort im Test vor. Dies kann bei diagnostischen Fragestellungen hilfreich sein, erschwert jedoch die Ergebnisinterpretation in mechanistischen Studien. So können

beispielsweise Veränderungen der Basophilenaktivierung über die Zeit bei Verwendung eines BAT-Protokolls mit IL-3-Zusatz bedingt sein durch eine veränderte IgE-vermittelte Antwort oder aber durch eine veränderte Zellantwort auf IL-3 [131, 132]. Um diese Überlagerung zu umgehen wurde in vorliegender Studie von der zusätzlichen Stimulation mit IL-3 abgesehen.

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Gatingmethode zur Identifizierung Basophiler Granulozyten aus Vollblut anhand der Oberflächenmarker CD45 (exprimiert auf Leukozyten), CD123 (exprimiert auf Basophilen Granulozyten, Monozyten, Dendritischen Zellen, Eosinophilen) und HLA-DR (exprimiert auf Monozyten, Dendritischen Zellen, Eosinophilen) (siehe 2.7.4 und Abb. 9) ist in der Literatur weit verbreitet [131, 132]. Die Messung falsch positiver Basophilenaktivierung durch Aggregation von Basophilen Granulozyten und Thrombozyten, die beide bei Zellaktivierung CD63 auf ihrer Oberfläche exprimieren, kann durch diese Gatingmethode vermieden werden, da auf diese Weise nur CD63⁺ Zellen registriert werden, die gleichzeitig CD45⁺, CD123⁺, CD203c⁺ und HLA-DR⁻ sind.

Das Ergebnis des BAT, also die Antwort Basophiler Granulozyten nach in vitro-Stimulation mit Antigen, ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig. Zu diesen zählen u.a. die Dichte des IgE-Besatzes auf der Zelloberfläche, die „zelluläre Sensibilität“ der Basophilen (= Anzahl der IgE-Moleküle, die für 50% der maximalen Zellantwort benötigt werden [21]), die zelluläre Reaktivität (= maximale Zellantwort nach optimaler IgE-vermittelter Stimulation [21]) und auch die Konzentration des Antigens, weswegen es sinnvoll ist, mit mehreren Antigenkonzentrationen zu stimulieren [21, 132].

In der Literatur zum Basophilenaktivierungstest bei Nahrungsmittelallergikern findet sich eine Vielzahl an Parametern zur Auswertung des BAT. Nopp et al. verwendeten die Parameter CDmax (= maximaler prozentualer Anteil CD63⁺ Basophiler) und CD-sens (= Kehrwert der Allergenkonzentration, die 50 % der maximalen prozentualen CD63-Hochregulierung auslöst, multipliziert mit 100), die auch in vorliegender Arbeit zur Auswertung herangezogen wurden [118]. Wanich et al. stellten die Basophilenaktivierung als prozentualen Anteil CD63⁺ Basophiler nach den einzelnen von ihnen getesteten Allergenkonzentrationen dar [116] und Rubio et al. definierten einen Quotienten aus der Basophilenaktivierung nach Stimulation mit Kuhmilchprotein/Basophilenaktivierung nach Stimulation mit anti-FcεRI [120]. Aufgrund dieser nicht standardisierten Auswertung des BAT und auch durch die fehlende Standardisierung der Methodik lassen sie die Ergebnisse verschiedener BAT-Studien nur sehr eingeschränkt miteinander vergleichen.

Die Rate an Non-Respondern im Basophilenaktivierungstest (Basophilenaktivierung < 10 % nach Stimulation mit anti-FcεRI) lag in vorliegender Studie bei 5 % (n=3) (siehe 3.1.2.) und befindet sich somit im Rahmen der in der Literatur genannten Zahl von 10-20 % Non-Respondern bei auf Basophilen Granulozyten-basierten immunologischen Testverfahren [21, 132].

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Schwellenwerte

Mit dem Begriff Schwellenwert wird die individuelle Reaktionsschwelle eines Patienten bezeichnet bei deren Überschreitung allergische Symptome auftreten. Dieser Schwellenwert, das individuelle Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL), entspricht der Reaktionsdosis unter oraler Nahrungsmittelprovokation und kann tagesaktuell schwanken [96]. In vorliegender Studienpopulation lag die Reaktionsdosis unter Erdnussprovokation im Median bei 400 mg ganzer Erdnuss (entsprechend 100 mg Erdnussprotein), das LOAEL entsprechend der im Provokationsprotokoll vorgesehenen Erdnuss-Startdosis bei 12 mg Erdnuss (3 mg Erdnussprotein). Drei Patienten (5 %) reagierten bei dieser Dosis (siehe 3.2.1.). Ausgehend von individuellen Reaktionsschwellen einer Studienpopulation können mittels statistischer Modellrechnungen zur Wahrscheinlichkeitsverteilung Schwellenwerte berechnet werden, die für die gesamte Population der Erdnussallergiker gelten bzw. wahrscheinlich sind. Zur besseren Vergleichbarkeit und Einordnung dieser errechneten Schwellenwerte werden in der Regel Erwartungswerte wie ED₀₅ und ED₁₀, also die Reaktionsdosis, die bei 5 bzw. 10 % der Erdnussallergiker allergische Symptome hervorruft, angegeben (siehe 2.8.). In vorliegender Arbeit lag die berechnete ED₀₅ bei 1,95 mg Erdnussprotein (7,81 mg ganze Erdnuss) und die ED₁₀ bei 4,10 mg Erdnussprotein (16,41 mg ganze Erdnuss) (siehe 3.2.1.). Diese Werte liegen wesentlich niedriger als zuvor in einer dänischen Studie mit 165 erdnussallergischen Kindern und Erwachsenen mit positiver offener Provokation (Patienten < 4 Jahre, Startdosis 1 mg Erdnuss) oder positivem DBPCFC (Patienten ≥ 4 Jahre, Startdosis 85 mg Erdnuss) beschrieben [101]. Eller et al. berichteten in ihrer Studie eine ED₀₅ von 77 mg ganzer Erdnuss und eine ED₁₀ von 133,8 mg ganzer Erdnuss sowie ein LOAEL der Studienpopulation von 1 mg ganzer Erdnuss, bei der 8 Patienten (5 %) reagiert hatten. Die Patienten, die mittels DBPCFC provoziert worden waren, hatten eine verhältnismäßig hohe Startdosis von 85 mg Erdnuss erhalten, was möglicherweise die hohen Werte für ED₀₅ bzw. ED₁₀ erklären könnte [101].

Blom et al. [72] hingegen identifizierten ähnliche Schwellenwerte wie jene vorliegender Arbeit. Sie analysierten die Daten von 135 niederländischen Kindern mit positivem Erdnuss-DBPCFC. Mit einer Startdosis von 0,2 mg bzw. 1,7 mg Erdnussprotein und einem Steigerungsintervall von 30 Minuten errechneten die Autoren unter alleiniger Berücksichtigung objektiver Symptome zur Definition der individuellen Reaktionsdosis eine ED_{05} von 1,6 mg Erdnussprotein und eine ED_{10} von 4,4 mg Erdnussprotein bezogen auf die gesamte Studienpopulation [72]. Auch Taylor et al. [99] ermittelten in einer anderen Studie in 286 französischen Kindern und Erwachsenen mit positivem Erdnuss-DBPCFC eine ED_{05} von 1,8 mg Erdnussprotein und eine ED_{10} von 3,6 mg Erdnussprotein. Das Provokationsprotokoll bei Taylor et al. sah ein Steigerungsintervall von 15 Minuten und eine Startdosis von 0,1 mg, 5 mg oder 10 mg ganzer Erdnuss vor, abhängig vom Schweregrad vorangegangener Reaktionen und dem Alter des Patienten [99]. Die Studienpopulationen bei Blom et al. und bei Taylor et al. beinhalteten auch Patienten mit anaphylaktischen Reaktionen in der Vorgeschichte und stellten in dieser Hinsicht eine mit der Patientengruppe vorliegender Arbeit vergleichbare Population dar. Obwohl in beiden Studien [72, 99] ein Steigerungsintervall von 15 bzw. 30 Minuten verwendet worden war, wurden ähnlich niedrige Schwellenwerte ermittelt wie in vorliegender Arbeit unter einem Provokationsprotokoll mit zweistündigem Steigerungsintervall. In Anbetracht dessen, dass mehr als zwei Drittel der Patienten dieser hier vorliegenden Arbeit erst nach 30 Minuten allergische Reaktionen zeigten (siehe 3.2.2.), liegen die realen Schwellenwerte der Studienpopulationen von Taylor et al. und Blom et al. möglicherweise noch niedriger. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zur Neuberechnung von Referenzwerten für das australische VITAL-Konzept zur Allergenkennzeichnung in Lebensmitteln berichteten Taylor et al. [135] unter Zusammenschau von 18 Datensätzen oraler Erdnussprovokationen bei 584 erdnussallergischen Kindern eine ED_{01} von 0,27 mg Erdnussprotein bzw. 0,34 mg Erdnussprotein, wenn die Kumulativdosis Berechnungsgrundlage war. Die ED_{05} lag in dieser Studie zwischen 1 und 2 mg Erdnussprotein und damit in einem ähnlichen Bereich wie in der hier vorliegenden Arbeit [135].

Die Frage, ob Patienten mit Anaphylaxie in der Anamnese generell geringere Reaktionsschwellen aufweisen als Erdnussallergiker ohne schwere Reaktionen in der Vorgeschichte lässt sich mit aktueller Datenlage nicht beantworten. Dennoch lieferten die Ergebnisse der Korrelationen zwischen Reaktionsdosis unter Provokation und akzidentellen Reaktionen in der hier vorliegenden Arbeit Anhaltspunkte für einen möglichen Zusammenhang zwischen Anaphylaxie und individuellem Schwellenwert (siehe unten 4.2.2.).

Individuelle No Observed Adverse Effect Levels (NOAELs), also die höchste Erdnusskonzentration, die bei Kontakt keine allergische Reaktion auslöst, konnten in vorliegender Studienpopulation nur für einen Teil der Patienten ermittelt werden. Da auch Patienten bei der ersten getesteten Dosis (12 mg Erdnuss bzw. 3 mg Erdnussprotein) reagiert hatten, konnte kein NOAEL für die gesamte Population berechnet werden. Wensing et al. zeigten in 26 erdnussallergischen Erwachsenen ein NOAEL von 0,03 mg Erdnussprotein [91] und Flinterman et al. in 22 erdnussallergischen Kindern ein NOAEL von 0,5 mg Erdnussprotein [125]. Aufgrund der geringen Patientenzahl können diese Werte nicht mit ausreichender Sicherheit auf die gesamte Population der Erdnussallergiker übertragen werden [136]. Dennoch liegen sie deutlich unter der Startdosis von 3 mg Erdnussprotein der Provokation in der hier vorliegenden Studie und zeigen, dass zur NOAEL-Bestimmung die erste Provokationsdosis hier hätte niedriger gewählt werden müssen. Die Durchführung einer solchen „Niedrigdosis-Provokation“ war jedoch im Hinblick darauf, dass die Erdnussprovokation in der rekrutierten Studienpopulation u.a. zur Bestimmung der Reaktionsschwellen als prä-OIT-Status diene, nicht beabsichtigt.

Vorteile der vorliegenden Arbeit bezüglich der Gültigkeit der berechneten ED₀₅ und ED₁₀ liegen in der vergleichsweise hohen Patientenzahl, die die statistisch minimal erforderliche Zahl von 29 Patienten zur Schwellenwertbestimmung für Populationen klar übersteigt [136], im Einschluss von Patienten mit Anaphylaxie in der Vorgeschichte in die Studienpopulation, die Verwendung eines Provokationsprotokolls mit einem 2-Stunden-Steigerungsintervall zwischen den einzelnen Erdnussgaben und auch in der Verwendung von gerösteten Erdnüssen als Provokationsmaterial, die häufig in der Nahrungsmittelindustrie verwendet werden und hohe Allergenität besitzen [46, 47].

4.2.2. Prädiktoren der Reaktion unter oraler Provokation

4.2.2.1. Reaktionsdosis und Schweregrad

In vorliegender Arbeit konnte keine Korrelation zwischen Reaktionsdosis und Reaktionsschwere unter oraler Erdnussprovokation gefunden werden. Dies zeigte sich unabhängig davon, ob die tatsächliche oder die kumulative individuelle Reaktionsdosis zur Berechnung verwendet wurde. Auch die Anwendung verschiedener publizierter Schweregradsysteme zur Bewertung der klinischen allergischen Reaktion unter oraler Provokation [102-105] auf die Daten dieser Arbeit erbrachte keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen den Parameter Dosis und Schwere der Reaktion (siehe 3.3.1. und Abb. 16).

Die Überlegung, dass Patienten, die schon bei Kontakt zu niedrigen Erdnussdosen allergisch reagieren, möglicherweise unter einer besonders ausgeprägten bzw. „schweren“ Allergie leiden, kann zu der Annahme führen, dass diese „schweren“ Allergiker auch besonders schwere allergische Reaktionen zeigen. In der Literatur finden sich jedoch nur sehr wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen Reaktionsdosis und Reaktionsschwere unter oraler Provokation untersuchen [86, 87, 91, 105, 129]. Bis auf die Studie von Wensing et al. [91] ist diesen Studien gemeinsam, dass sie ebenfalls keine eindeutige Assoziation zwischen Reaktionsdosis und Schwere der allergischen Reaktion unter Provokation zeigen können. Aufgrund unterschiedlicher Studiendesigns können diese Arbeiten nicht direkt mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit verglichen werden, dennoch unterstreichen sie die in dieser Arbeit gezeigte fehlende Korrelation zwischen Schweregrad und Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation. Benhamou et al. fanden in 35 hühnereiallergischen Kindern, deren klinische Reaktion unter Hühnerei-Provokation anhand des auch in vorliegender Arbeit verwendeten Schweregradsystems nach Sampson et al. [102] beurteilt worden war, keinen Unterschied hinsichtlich der Reaktionsdosis zwischen Kindern die mild/moderat oder schwer reagiert hatten [86]. Bei der Auswertung 1671 oraler Provokationen auf Kuhmilch, Hühnerei, Weizen und Soja in 869 Kindern konnten Rolinck-Werninghaus et al. in den 757 positiven Nahrungsmittelprovokationen unter Anwendung des Schweregrades nach Sampson et al. [102] ebenfalls keine Korrelation zwischen Reaktionsdosis und Schweregrad zeigen [87]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie aus Dänemark kam bei der Korrelation von Reaktionsdosis und -schwere unter Erdnussprovokation zu demselben Resultat [129]. In dieser Studie werteten Eller et al. die Daten von 175 positiven oralen Erdnussprovokationen, die offen oder als DBPCFC in Patienten im Alter von 1-26 Jahren durchgeführt worden waren, unter Anwendung des Schweregrades nach Sampson et al. [102] aus [129]. Im Gegensatz dazu weckten die Ergebnisse zweier niederländischer Studien von Wensing et al. [91] und van der Zee et al. [105] den Eindruck, es könnte eine Assoziation zwischen Reaktionsdosis und Schweregrad bestehen, doch wurde hier die Schwere akzidenteller Reaktionen in der Vorgeschichte in Bezug zur Reaktionsdosis unter Provokation gesetzt. Wensing et al. untersuchten die anamnestischen und klinischen Daten von 26 Erwachsenen mit positivem Erdnuss-DBPCFC. Die Reaktionsschwere anamnestisch berichteter akzidenteller Reaktionen auf Erdnussverzehr sowie die Reaktionsschwere unter oraler Erdnussprovokation wurde mittels des Schweregrades nach Mueller [103] in mild, moderat und schwer eingeteilt. Es zeigte sich, dass Patienten mit schweren allergischen Reaktionen in der Anamnese niedrigere Reaktionsschwellen hatten, als Patienten mit anamnestisch milden akzidentellen Reaktionen

($p=0,0001$). Patienten, die unter Provokation eine moderate bis schwere allergische Reaktion zeigten, hatten ebenso niedrigere Reaktionsschwellen als Patienten mit milder Reaktion unter Provokation ($p=0,027$) [91]. Die geringe Patientenzahl schränkte jedoch die Aussagekraft dieser Assoziation bei Wensing et al. stark ein und aufgrund der Rekrutierung erwachsener Patienten war ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit nicht möglich. Van der Zee et al. werteten positive Erdnuss-DBPCFCs und anamnestiche Daten von 126 Kindern mittels eines Schweregradindex von 0 bis 12 aus und fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Reaktionsschwere akzidenteller Reaktionen und Reaktionsdosis unter Provokation, wohl aber eine Tendenz zu niedrigeren Reaktionsdosen unter DBPCFC bei Kindern mit akzidentellen allergischen Reaktionen, die andere Organe als die Haut bzw. nicht nur die Haut betreffen ($p=0,06$) [105]. Ob sich dieser Trend statistisch belegen lässt, bleibt jedoch in weiteren Studien zu überprüfen.

In Zusammenschau mit der Ausgangsüberlegung, dass Patienten mit niedrigen Reaktionsschwellen unter Provokation eher zu schweren Reaktionen neigen, sind die Ergebnisse einer australischen Arbeitsgruppe interessant: Wainstein et al. [126] provozierten 55 Erdnussallergische bzw. -sensibilisierte Kinder mittels offener Erdnussprovokation. Das Provokationsprotokoll sah als Abbruchkriterien eine moderate bis schwere bzw. anaphylaktische Reaktion (definiert als Reaktion des kardiovaskulären und/oder respiratorischen Systems und mindestens eines weiteren Organsystems) vor. Bei Auftreten milder Reaktionen (Haut, Gastrointestinaltrakt) wurde die Provokation fortgeführt. Von den 27 Kindern mit positiver Erdnussprovokation reagierten 21 mit Anaphylaxie, wobei 3 Patienten initial eine anaphylaktische Reaktion zeigten, 5 Patienten zunächst eine milde Reaktion zeigten, die vor der nächsten Dosisgabe (Intervall 20 bis 30 Minuten) in einer Anaphylaxie resultierte, und 13 Patienten nach zunächst milder Reaktion und Fortführung der Provokation bei einer höheren Dosis eine Anaphylaxie entwickelten [126]. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Reaktionsschwere unter Provokation ein sehr individueller Parameter ist, und dass die Reaktionsschwere bei einigen Patienten mit der Reaktionsdosis korreliert sein könnte, wobei hier allerdings kumulative Effekte, also das Auslösen allergischer Symptome durch Kumulation der verabreichten Erdnusseinzeldosen im Organismus (Kumulativedosis) bei Provokationsprotokollen mit kurzen Steigerungsintervallen und nicht allein durch die aktuell verabreichte Einzeldosis, berücksichtigt werden müssen.

4.2.2.2. Korrelation von Parametern aus Anamnese und der klinischen Reaktion unter oraler Provokation

Eine Korrelation zwischen Patientenalter und Reaktionsdosis oder -schwere unter Provokation konnte in vorliegender Studie nicht gefunden werden (siehe 3.3.2.). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Osterballe et al. [85] in einer Studie mit 56 dänischen Kindern mit atopischer Dermatitis, die mit Hühnerei oral provoziert worden waren. Die Schwellenwerte der positiven Hühnereiprovokationen in Kindern < 2 Jahren unterschieden sich nicht von denen der > 2-Jährigen [85]. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Arbeiten von van der Zee et al. [105] und Eller et al. [129] bei erdnussallergischen Patienten: Van der Zee et al. verwendeten in ihrer Studie mit 126 erdnussallergischen Kindern ein Cox-Regressionsmodell zur Berechnung der Hazard Ratio (HR), um den Zusammenhang zwischen Reaktionsdosis unter Provokation und anamnestischen bzw. klinischen Parametern zu analysieren. Es zeigte sich, dass Kinder > 10 Jahren eher bei niedrigen Erdnussdosen reagierten als jüngere Kinder (HR 1,89, $p=0,001$). Nach Einteilung der Kinder in drei Altersgruppen (< 5 Jahre, 5-10 Jahre, > 10 Jahre) zeigte sich außerdem die Tendenz, dass die kumulative Reaktionsdosis mit zunehmendem Alter sinkt (790 mg Erdnuss, 310 mg Erdnuss bzw. 70 mg Erdnuss) [105]. Eller et al. fanden bei der Auswertung von 175 positiven Erdnussprovokationen eine Korrelation zwischen Alter und Reaktionsschwere ($r_s=0,18$, $p=0,03$) und interpretierten diese im Sinne einer mit dem Alter zunehmenden Reaktionsschwere unter Provokation [129]. Dieser von Eller et al. gezeigte Zusammenhang scheint jedoch allenfalls ein sehr schwacher Zusammenhang zu sein. Nach den Kriterien vorliegender Arbeit wäre man bei einem Korrelationskoeffizienten $r_s < 0,2$ noch nicht von einer bestehenden Korrelation ausgegangen. Wenngleich Eller et al. dasselbe Schweregradsystem nach Sampson et al. [102] verwendeten wie in vorliegender Studie, so scheinen auch subjektive Symptome in die Schweregradvergabe mit eingeflossen zu sein [129]. Dieses könnte die zu vorliegender Arbeit unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Das von van der Zee et al. angewandte Cox-Regressionsmodell konnte in vorliegender Arbeit aufgrund der kleineren Patientenzahl nicht verwendet werden. Möglicherweise liegen hier die abweichenden Ergebnisse hinsichtlich des Zusammenhangs von Patientenalter und Reaktionsdosis begründet. In der hier vorliegenden Studie konnte jedoch das Patientenalter zur Anzahl bzw. zur Schwere allergischer Reaktionen infolge akzidentellen Erdnussverzehr korreliert werden ($r_s=0,31$, $p=0,01$ bzw. $r_s=0,34$, $p=0,01$) (siehe 3.3.2.). Die Aussagekraft des gefundenen Zusammenhangs zwischen Alter und Anzahl akzidenteller Reaktionen ist stark eingeschränkt, da die Anzahl akzidenteller Reaktionen als absoluter Wert dargestellt wurde und nicht in Relation zu einem

Zeitintervall gesetzt war. Außerdem wurden die Angaben über Anzahl und Schwere allergischer Reaktionen nach akzidentellem Erdnusskontakt retrospektiv im Rahmen des Anamnesegespräches der V₁-Untersuchung (Visite 1, siehe Abb. 6) erhoben und sind daher sehr abhängig von der Erinnerung der Eltern.

Außerdem wurde in vorliegender Studie eine inverse Korrelation sowohl zwischen Anzahl akzidenteller Reaktionen und der Reaktionsdosis unter Provokation gefunden ($r_s = -0,36$, $p = 0,004$), als auch zwischen dem Schweregrad akzidenteller Reaktionen und der Reaktionsdosis ($r_s = -0,28$, $p = 0,004$) (siehe 3.3.2. und Tab. 12). Der letztgenannte Zusammenhang zeigt sich auch nach Einteilung der Patienten anhand der Reaktionsdosis unter Provokation in zwei Gruppen (Reaktionsdosis ≤ 1200 mg bzw. Reaktionsdosis ≥ 4000 mg). Beide Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich des Schweregrades der jeweils schwersten akzidentellen Reaktion ($p = 0,014$) (siehe 3.6.1. und Tab. 14). Wie oben bereits diskutiert, lässt sich dieser Trend in den Studien von Wensing et al. [91] und van der Zee et al. [105] ebenfalls finden (s.o.).

Die Anzahl bzw. Schwere akzidenteller Reaktionen korrelierten in vorliegender Studie nicht mit der Reaktionsschwere unter Provokation (siehe 3.3.2.), ähnlich wie von Wainstein et al. beobachtet [126]. Hourihane et al. hingegen fanden bei der Auswertung anamnestischer Daten und positiver Erdnuss-DBPCFCs von 40 Kindern und Erwachsenen, dass die Schwere der jüngsten akzidentellen Reaktion mit dem Schweregrad unter oraler Provokation korrelierte ($r_s = 0,37$, $p = 0,03$) [90]. Allerdings verwendeten Hourihane et al. ein Schweregradsystem, das Reaktionsdosis und allergische Symptome miteinander kombiniert und somit Reaktionsdosis und -schwere in Einem reflektierte. Zusätzlich ist die Studienpopulation bei Hourihane et al. unterschiedlich zu der Patientengruppe, die in vorliegender Studie untersucht wurde, da teilweise Erwachsene untersucht wurden und der Sensibilisierungsgrad mit einem medianen erdnusspezifischen IgE von 5,65 kU_A/l deutlich niedriger lag als in vorliegender Studie [90]. Durch diese methodischen Abweichungen könnten die unterschiedlichen Ergebnisse beider Studien zu erklären sein.

In vorliegender Arbeit wurden die Patienten anhand ihrer Reaktionsdosis unter Provokation in zwei Gruppen eingeteilt, der Grenzwert zwischen den beiden Gruppen wurde arbiträr festgesetzt („niedrige Reaktionsdosis“ = Reaktionsdosis ≤ 1200 mg, „hohe Reaktionsdosis“ = Reaktionsdosis ≥ 4000 mg, siehe 2.3.2.). Beide Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich ihres Alters, Geschlechts, dem Vorliegen von Asthma bronchiale, Atopischer Dermatitis, Allergischer Rhinitis, anderen Nahrungsmittelallergien oder einer positiven Familienanamnese für Atopie (siehe 3.6.1.). Diese Ergebnisse decken sich, trotz abweichender Methodik, mit den

Resultaten von Hourihane et al. [90] in 40 erdnussallergischen Kindern und Erwachsenen: die kumulative Reaktionsdosis unterschied sich auch bei Hourihane et al. weder beim Vergleich von Asthmatikern versus Nicht-Asthmatikern, noch beim Vergleich verschiedener Altersgruppen oder des Geschlechts [90]. Auch van der Zee et al. [105] fanden mittels Cox-Regressionsanalyse keine Assoziation zwischen Reaktionsdosis und Geschlecht, Vorliegen eines Asthma bronchiale oder Rhinitis. Sie konnten jedoch in ihrer Population erdnussallergischer Kinder die Abwesenheit einer Atopischen Dermatitis als Risikofaktor für Reaktionen bereits bei niedrigen Erdnussdosen identifizieren (HR=0,45, p=0,001) [105].

Die Patienten vorliegender Arbeit wurden außerdem anhand der Reaktionsschwere unter Provokation in zwei Gruppen eingeteilt. Auch hier wurde die Grenze zwischen den Gruppen willkürlich festgelegt („Schweregrad I-III“ bzw. „Schweregrad IV/V“, siehe 2.3.2.). Es fand sich keine Assoziation zwischen Reaktionsschwere und den untersuchten anamnestischen Parametern. Auch die Asthma bronchiale-Häufigkeit war in beiden Gruppen ähnlich hoch („Schweregrad I-III“: 57 %, „Schweregrad IV/V“: 56 %, siehe 3.6.2.). Dass das Vorliegen von Asthma bronchiale in vorliegender Studienpopulation nicht für das Auftreten schwerer Reaktionen prädestinierte, könnte in der von vornherein vergleichsweise hohen Anzahl an Asthmatikern in der untersuchten Patientengruppe begründet sein.

4.2.2.3. Korrelation von Erdnuss-Sensibilisierung und der klinischen Reaktion unter oraler Provokation

In vorliegender Studie korrelierte die Reaktionsdosis unter Erdnussprovokation invers mit der Sensibilisierung auf Erdnuss repräsentiert durch erdnusspezifisches IgE, Ara h2-spezifisches IgE und Hautpricktest ($r_s = -0,36$, $p = 0,004$ bzw. $r_s = -0,38$, $p = 0,0002$ bzw. $r_s = -0,27$, $p = 0,04$; siehe 3.4.1., Abb. 17, Tab. 13). Diese Assoziation zeigte sich auch im Vergleich der Patientengruppen mit einer Schwellendosis ≤ 1200 mg bzw. ≥ 4000 mg Erdnuss ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,001$ bzw. $p = 0,002$; siehe 3.6.1.). Eine Korrelation zwischen Höhe der Erdnussensibilisierung und Reaktionsschwere unter Provokation konnte dagegen nicht gezeigt werden (siehe 3.5. und 3.6.2.).

In einem Großteil der veröffentlichten Studien, die den Zusammenhang zwischen Sensibilisierungsparametern und Reaktionsdosis unter oraler Provokation untersuchen, konnte hingegen keine oder eine nur teilweise Assoziation der genannten Parameter gefunden werden [85-87, 89, 137]. Eine Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse könnte in den verwendeten Provokationsprotokollen zu finden sein. Die genannten Studien verwendeten Protokolle mit

Steigerungsintervallen von 15 bis 30 Minuten wohingegen das Protokoll vorliegender Studie Dosissteigerungen im Abstand von 120 Minuten vorsieht (siehe 2.3.1.). Somit repräsentieren die in den oben erwähnten Studien ermittelten Reaktionsschwellen u.U. kumulative Reaktionsdosen und sind nicht direkt vergleichbar mit den Reaktionsschwellen vorliegender Studienpopulation. Hinzukommt, dass Osterballe et al., Benhamou et al. und Rolinck-Werninghaus et al. [85-87] Patienten mit Hühnerei-, Kuhmilch-, Weizen- und Soja-Allergie untersuchten, die sich klinisch anders als die Erdnussallergie verhalten. Sicherer et al. [137] werteten positive Nahrungsmittelprovokationen auf Kuhmilch, Hühnerei, Erdnuss, Soja, Weizen und Fisch von 196 Kindern aus und fanden für Hühnerei, Kuhmilch, Soja und Weizen eine Assoziation zwischen Reaktionsdosis und allergenspezifischem IgE bzw. Hautpricktest. In den 24 positiven Erdnussprovokationen der Studie von Sicherer et al. konnte jedoch keine Korrelation der beiden Parameter gezeigt werden [137].

Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Reaktionsdosis und Erdnuss sensibilisierung wie in vorliegender Studie konnten Peeters et al., van der Zee et al. und Eller et al. [45, 105, 129] finden. In einer niederländischen Studie mit 30 erdnussallergischen Erwachsenen zeigten Peeters et al., dass Patienten mit niedriger DBPCFC-Reaktionsschwelle (0,1 bis 1 mg Erdnussmehl, 50 % Proteingehalt) ein höheres erdnusspezifisches IgE aufwiesen als Patienten mit hoher Reaktionsschwelle (10 bis 300 mg Erdnussmehl, 50 % Proteingehalt): 44 kU_A/l versus 4,7 kU_A/l, p=0,018, Berücksichtigung subjektiver und objektiver allergischer Symptome [45]. Van der Zee et al. konnten unter Verwendung eines Provokationsprotokolls mit sehr kleinen Dosierungsschritten von 6 mg bis 1,2 g ganzer Erdnuss anhand einer Regressionsanalyse ein hohes erdnusspezifisches IgE-Level als Prädiktor für niedrige Reaktionsdosen unter oraler Provokation identifizieren (HR 2,02, p=0,002) [105]. Schließlich fanden auch Eller et al. in erdnussallergischen Kindern und jungen Erwachsenen mit einer Reaktionsschwelle über 1 g Erdnuss eine ähnlich schwache, aber signifikante inverse Korrelation zwischen Reaktionsdosis unter Provokation und erdnusspezifischem IgE ($r_s = -0,41$, p=0,01) wie in der hier vorliegenden Arbeit [129].

In der Ergebniszusammenschau ergeben sich also im Fall der Erdnussallergie Hinweise, dass eine hohe Sensibilisierung im Erdnuss-spezifischen IgE als Prädiktor für das Auftreten klinischer allergischer Symptome schon bei niedrigen Allergendosen gelten kann.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen vorliegender Arbeit ist in der Literatur mehrfach eine Assoziation zwischen allergenspezifischem Sensibilisierungsgrad und der Reaktionsschwere

unter oraler Nahrungsmittelprovokation veröffentlicht worden [45, 86, 87, 90, 126, 129]: Benhamou et al. fanden bei Kindern mit V.a. Hühnereiallergie unter Verwendung des Sampson-Schweregrades und unter Einbeziehung negativer Nahrungsmittelprovokationen, dass ein hohes hühnereispezifisches IgE mit schwereren Reaktionen unter oraler Hühnereiprovokation assoziiert ist ($p=0,006$) [86]. Auf ähnliche Art und Weise konnten Rolinck-Werninghaus et al. [87] die Reaktionsschwere unter oraler Provokation mit Kuhmilch, Hühnerei und Weizen mit der Höhe des allergenspezifischen IgEs korrelieren ($r_s=0,48$, $r_s=0,56$ und $r_s=0,36$). Bei alleiniger Korrelation der Daten positiver Nahrungsmittelprovokationen hingegen fanden die Autoren eine derartige Korrelation nur für die Weizenallergie ($r_s=0,40$) [87]. Peeters et al. zeigten in erdnussallergischen Kindern und Erwachsenen unter Verwendung des Mueller-Schweregrades, dass Patienten mit milder oder moderater Reaktion unter Erdnussprovokation ein niedrigeres erdnusspezifisches IgE aufwiesen als Patienten mit schwerer Reaktion ($p=0,01$ bzw. $p=0,02$) [45]. Bei erdnussallergischen Erwachsenen konnten Hourihane et al. [90] unter Verwendung eines Schweregradsystems, dass Reaktionsdosis und Reaktionsschwere miteinander kombiniert, die Höhe des erdnusspezifischen IgEs mit dem Schweregrad unter Erdnussprovokation korrelieren ($r_s=0,766$, $p < 0,001$). Bei erdnussallergischen Kindern fanden die Autoren ebenfalls eine wenn auch weniger starke Korrelation dieser Parameter ($r_s=0,49$, $p=0,018$) [90]. Eller et al. zeigten in erdnussallergischen Kindern unter Verwendung des Sampson-Schweregrades und unter Einbeziehung negativer Provokationsergebnisse, dass hohe Schweregrade unter Provokation mit hohen erdnusspezifischen IgE-Titern korrelierten, wobei sie die beste Korrelation für Ara h2-spezifisches IgE fanden ($r_s=0,60$, $p < 0,0001$) [129]. Schließlich fanden Wainstein et al., dass Kinder, die unter oraler Erdnussprovokation mit Anaphylaxie reagiert hatten, eine stärkere Reaktion im Hautpricktest zeigten und einen höheren Erdnuss-spezifischen IgE-Titer aufwiesen als Kinder, die keine anaphylaktische Reaktion unter Provokation zeigten bzw. gar nicht reagiert hatten ($p < 0,0001$) [126]. Wie diese Auflistung zeigt, bestanden in den dargestellten Studien zum Teil erhebliche methodische Unterschiede zur hier vorliegenden Arbeit. So wurden in einigen Studien tolerante Patienten in die Datenanalyse einbezogen [86, 87, 129], andere hatten neben Kindern auch Erwachsene mit einbezogen [45, 90] oder es wurden Nahrungsmittelprovokationen auf andere Allergene als Erdnuss untersucht [86, 87] und verschiedene Schweregradsysteme verwendet, um die allergische Reaktion einzuteilen. Diese Unterschiede scheinen jedoch die abweichenden Ergebnisse nicht ausreichend zu erklären, da auch bei Anwendung unterschiedlicher Schweregradsysteme auf die Daten vorliegender Arbeit keine Korrelation zwischen Sensibilisierungsgrad und Reaktionsschwere unter Provokation

gefunden werden konnte (Daten nicht gezeigt). In einigen der veröffentlichten Studien wurden auch subjektive Symptome für die Beurteilung des Schweregrades unter oraler Provokation herangezogen. Da in vorliegender Arbeit jedoch streng nur objektive Symptome als Abbruchkriterium der Provokation zählten, wurde auch der Schweregrad nur anhand der aufgetretenen objektiven Symptome vergeben (siehe 2.3.2. und 2.3.3.). Hieraus ergibt sich trotz ähnlich aussagekräftiger Schweregradsysteme eine abweichende Einschätzung der Reaktionsschwere in den dargestellten Studien, wodurch die unterschiedlichen Studienergebnisse zum Teil begründet werden könnten.

Ebenso wie in vorliegender Arbeit fanden die Autoren Flinterman et al., Astier et al. und Sicherer et al. [89, 104, 137] in erdnussallergischen Studienpopulationen keine Assoziation zwischen Reaktionsschwere und allergenspezifischer Sensibilisierung: Flinterman et al. analysierten positive Erdnuss-DBPCFCs von 20 Kindern im Alter von 3 bis 15 Jahren und konnten unter Verwendung des Müller-Schweregrades weder die Hautpricktestreaktivität noch die Höhe des Erdnuss-spezifischen IgEs zur Reaktionsschwere unter Provokation korrelieren [89]. Auch Sicherer et al. fanden keine Korrelation zwischen Reaktionsschwere unter Provokation und dem Ergebnis im Hautpricktest bei den 24 Kindern mit positiver oraler Erdnussprovokation [137]. In einer französischen Studie mit 30 erdnussallergischen Kindern fehlte ebenfalls eine Korrelation zwischen Reaktionsschwere und Hautpricktest bzw. erdnusspezifischem IgE [104].

4.2.2.4. Korrelation von der Basophilenaktivierung, dem Allergen-spezifischen PBMC-Zytokinprofil und der klinischen Reaktion unter oraler Provokation

In vorliegender Studie konnten die Erdnuss-spezifische Basophilenaktivierung ebenso wie das von mit Erdnuss stimulierten PBMCs ausgeschüttete T_{H2} -Zytokinprofil invers mit der Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation korreliert werden (siehe 3.4.2. und 3.4.3., Abb. 18, Abb. 19 und Tab. 13). Dabei schien die Korrelation umso stärker, je Allergen-spezifischer die Basophilenstimulation erfolgte (je niedriger die Erdnussextraktkonzentrationen für die Stimulation gewählt wurden). Die beste inverse Korrelation zur Reaktionsdosis wurde bei der Messung von IL-5 im Überstand von Erdnuss-spezifischen, *in vitro* stimulierten PBMCs errechnet ($r_s = -0,42$, $p = 0,001$) bzw. bei der Messung der Basophilenaktivierung nach Stimulation mit der am niedrigsten verwendeten Erdnussextraktkonzentration ($0,0005 \mu\text{g/ml}$ Erdnussextrakt, $r_s = -0,41$, $p = 0,001$). Die T_{H1} -Zytokin-Ausschüttung nach Erdnuss-spezifischer PBMC-Stimulation ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) zeigte keine Korrelation zur Reaktionsdosis unter

Erdnussprovokation, wobei wie erwartet generell eine sehr niedrige Allergen-spezifische T_{H1} -Zytokinproduktion in der untersuchten Erdnuss-allergischen Population gemessen werden konnte (siehe 3.4.2. und 3.4.3., Abb. 18, Abb. 19 und Tab. 13). Zur Reaktionsschwere unter oraler Erdnussprovokation konnte weder die Basophilenaktivierung noch das Zytokinprofil nach PBMC-Stimulation mit Erdnussextrakt korreliert werden (siehe 3.5., Abb. 21 und Tab. 13).

In der Literatur finden sich nur wenige Studien, die Allergen-spezifische Basophilenaktivierung und klinische Reaktion unter oraler Nahrungsmittelprovokation miteinander korrelieren. Rubio et al. [120] analysierten diesen Zusammenhang in 112 Kuhmilch-allergischen Kindern, bei denen zur Reevaluierung ihrer Kuhmilchallergie eine offene Nahrungsmittelprovokation durchgeführt wurde. Die Diagnose der Kuhmilchallergie war aufgrund der Anamnese (mindestens eine Episode von Urtikaria oder Angioödem unmittelbar nach der ersten oder zweiten Exposition mit Kuhmilchprotein) und dem Vorliegen Allergen-spezifischer IgE-Antikörper sowie einem positiven Hautpricktest gestellt worden. Die Basophilenaktivierung (in % CD63-positiver Basophiler Granulozyten) der Patienten mit positiver Kuhmilchprovokation (n=36) korrelierte invers mit der Reaktionsdosis ($p=0,006$) [120]. Die Autoren Rubio et al. definierten BAT-Low- und BAT-High-Responder, je nachdem ob sich nach Allergen-unspezifischer Stimulation mit FcεRI-Antikörper eine niedrige oder hohe Basophilenantwort zeigte. Um diese Individualität der Basophilenantwort (siehe oben 4.1.3.) zu berücksichtigen, berechneten Rubio et al. das Verhältnis zwischen Allergen-spezifischer Basophilenaktivierung nach Stimulation mit Kuhmilchprotein und Allergen-unspezifischer Basophilenaktivierung nach Stimulation mit FcεRI-Antikörpern. Mit dieser Ratio zeigte sich die inverse Korrelation zwischen Basophilenaktivierung und Reaktionsdosis unter oraler Kuhmilchprovokation deutlicher ($p<0,0001$). Außerdem konnten die Autoren die Ratio der Basophilenaktivierung mit dem Schweregrad der klinischen Reaktion unter oraler Provokation korrelieren ($p < 0,0001$, Schweregrade: mild: Haut, oberer Respirationstrakt; moderat: Angioödem, Gastrointestinaltrakt; schwer: kardiovaskulär, unterer Respirationstrakt) [120]. Der von Rubio et al. gefundene inverse Zusammenhang zwischen Reaktionsdosis und Basophilenaktivierung ausgedrückt als prozentualer Anteil CD63-positiver Basophiler nach Stimulation mit Erdnussextrakt konnte auch in vorliegender Studie bei erdnussallergischen Kindern gefunden werden (siehe Tab. 13). Jedoch ergab die Verwendung der von Rubio et al. vorgeschlagenen Ratio der Basophilenaktivierung („Ratio BA“ = BA nach Stimulation mit 0,05 µg/ml Erdnussextrakt dividiert durch BA nach Stimulation mit FcεRI) keine wesentliche Verbesserung dieser Korrelation („Ratio BA“ versus Reaktionsdosis $r_s = -0,42$ $p=0,001$) bzw. keine Korrelation zur Reaktionsschwere unter

Erdnussprovokation („Ratio BA“ versus Schweregrad nach Sampson et al. [102] $r_s = -0,12$ $p = 0,38$).

Homsak et al. [138] befragten 27 Erdnuss-sensibilisierte Kinder mit einer anamnestisch berichteten allergischen Reaktion auf Erdnusskontakt nach der Schwere dieser Reaktion und bestimmten die Basophilenantwort nach *in vitro*-Stimulation Basophiler Granulozyten mit Erdnussextrakt. Kinder, die von einer anaphylaktischen Reaktion nach Erdnusskontakt berichteten ($n=11$, Anaphylaxie-Definition nach [17]), zeigten eine höhere Basophilenaktivierung (CD63-positive Basophile, CD-sens $p < 0,0001$) als Kinder, die von einer milden allergischen Reaktion berichtet hatten (z.B. Verschlechterung einer Atopischen Dermatitis mit Juckreiz, Rötung, OAS, isolierte Bauchkrämpfe) [138]. Ein derartiger Zusammenhang konnte in vorliegender Studie nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Erklärung für die Diskrepanz der gefundenen Korrelationen zwischen Basophilenaktivierung und klinischer Reaktion unter oraler Nahrungsmittelprovokation könnte darin zu finden sein, dass die *in vitro*-Basophilenaktivierung möglicherweise nicht das Vollbild der allergischen Reaktion *in vivo* widerspiegelt. Der BAT testet die zelluläre Antwort auf Allergenkontakt von im Blut zirkulierenden Basophilen Granulozyten, der Schauplatz der allergischen Reaktion im Organismus befindet sich jedoch in der Regel im Gewebe der Lunge, des Gastrointestinaltraktes, der Haut etc., wo durch die Anwesenheit gewebständiger Immunzellen und weiterer lokaler Faktoren die Ausprägung der klinischen allergischen Reaktion beeinflusst wird. Die Basophilenaktivierung gemessen im BAT repräsentiert daher nur einen Teilaspekt der komplexen allergischen Immunantwort. Er könnte jedoch u.U. ein Indikator sein für die Empfindlichkeit eines Organismus mit klinisch relevanter Nahrungsmittelallergie auf geringe Allergendosierungen mit einer allergischen Reaktion zu reagieren. Hieraus ergäbe sich eventuell ein weiteres Einsatzgebiet des BAT als Instrument das allergene Potenzial von Allergenspuren in Nahrungsmitteln zu bewerten [139].

Der Zusammenhang zwischen bestehender Erdnuss-Allergie und einem erhöhten T_{h2} -Zytokin-Level gegenüber Nichtallergikern ist bekannt [140-143]. In den Daten der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass innerhalb der untersuchten Population erdnussallergischer Kinder die Erdnuss-spezifische T_{h2} -Zytokin-Produktion invers mit der Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation korrelierte (siehe 3.4.3. und Abb. 19). Hinsichtlich der Frage nach prädiktiven Markern für die klinische Reaktion unter oraler Erdnussprovokation ist dieser Zusammenhang jedoch von fraglicher diagnostischer Relevanz, da die T_h -Zell-Zytokin-Bestimmung mittels CBA ein zwar etabliertes aber auch relativ zeitaufwändiges und

kostenintensives Verfahren ist [144, 145] und sich daher aus praktischen Gründen weniger gut zur eventuell möglichen Vorhersage der klinischen Reaktion unter oraler Erdnussprovokation eignen würde.

4.2.2.5. Korrelation von Markern der Basophilenaktivierung und Markern der Sensibilisierung und T-Zell-Aktivierung

Der in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Basophilenaktivierungstest stellt ein noch relativ neues laborchemisches Verfahren zum Nachweis einer allergischen Sensibilisierung dar. Zur Einordnung der Ergebnisse des Basophilenaktivierungstests wurden in der vorliegenden Arbeit auch Korrelationen zwischen den einzelnen Markern der Basophilenaktivierung und anderen Markern der Sensibilisierung und T-Zell-Aktivierung untersucht (siehe 3.7.).

Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Erdnuss-spezifischer Basophilenaktivierung und den serologischen Sensibilisierungsmarkern Erdnuss- bzw. Ara h2-spezifisches IgE, nicht jedoch mit dem Hautpricktest (siehe 3.7.1.). Außerdem zeigte sich eine Korrelation der Erdnuss-spezifischen Basophilenaktivierung zum Anteil Eosinophiler Granulozyten im Blut (siehe 3.7.3.), wohingegen die Ergebnisse des Basophilenaktivierungstests keine Abhängigkeit vom Anteil Basophiler Granulozyten im Blut zeigten (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich ebenso eine Korrelation zwischen Erdnuss-spezifischer Basophilenaktivierung und T_{h2}-Zytokin-Produktion nach PBMC-Stimulation mit Erdnussextrakt (siehe 3.7.1. und Tab. 16).

Interessanterweise zeigten lediglich zwei Parameter der Basophilenaktivierung (CD-sens und Basophilenaktivierung nach Stimulation mit fMLP) eine Korrelation zur Quaddelgröße nach Erdnuss-Hautpricktest (siehe Tab. 16). Eine Erklärung hierfür liegt vermutlich in den unterschiedlichen Ansatzpunkten beider Testverfahren: Im Hautpricktest wird *in vivo* die allergische Reaktion gewebständiger Effektorzellen (v.a. Mastzellen) anhand einer klinisch fassbaren Reaktion (Quaddelgröße) getestet, wohingegen der BAT *in vitro* die Reaktion der im Blut zirkulierenden Basophilen Granulozyten mittels Immunchemie untersucht.

Allergen-unspezifische Marker der Basophilenaktivierung wie CDmax, Stimulation mit RPMI, anti-FcεRI oder fMLP zeigten dagegen lediglich eine Korrelation zur Höhe des Erdnuss- bzw. Ara h2-spezifischen sowie des gesamt-IgEs (siehe 3.7.2.). Die Basophilenaktivierung im BAT ist u.a. von der IgE-Dichte auf der Zelloberfläche Basophiler Granulozyten abhängig, die wiederum vom IgE-Gehalt des peripheren Blutes beeinflusst wird [21]. Dieser Zusammenhang spiegelt sich in den genannten Korrelationen vorliegender Arbeit wider.

Es existieren zurzeit nur wenige veröffentlichte Arbeiten über die Korrelation von Basophilenaktivierungstest und Allergen-spezifischem IgE-Titer oder Hautpricktest bei Nahrungsmittelallergie. Wanich et al. [116] untersuchten die Basophilenantwort Kuhmilch-allergischer Kinder, die entweder tolerant oder reaktiv gegenüber erhitzter Kuhmilch waren. Sie fanden dabei korrespondierende Ergebnisse zwischen Basophilenaktivierung, Quaddelgröße im Hautpricktest und Allergen-spezifischem IgE-Level [116].

Nopp et al. [118] korrelierten Hautpricktest, Allergen-spezifisches IgE und Basophilenaktivierungstest von 27 Patienten mit Lieschgras-Pollenallergie. Dabei fanden sie eine Korrelation zwischen CD-sens und SPT-sens des titrierten Hautpricktests ($r_s=0,50$ $p < 0,01$; SPT-sens = Kehrwert der Allergendosis, die eine Quaddel auslöst, die der Größe der Histaminquaddel entspricht, multipliziert mit 10.000) und eine Korrelation zwischen CD-sens und der relativen spezifischen IgE-Konzentration ($r_s=0,72$ $p < 0,001$; relative spezifische IgE-Konzentration = Anteil des spezifischen IgE am Gesamt-IgE). CDmax konnte weder zum Hautpricktest noch zum spezifischen IgE korreliert werden [118].

Um die Bedeutung der in vorliegender Studie gezeigten Assoziation zwischen Basophilenaktivierungstest und allergenspezifischen Sensibilisierungsparametern einordnen zu können, bedarf es demnach weiterer Analyse von Daten aus pro- oder retrospektiven klinischen Studien.

4.3. Zusammenfassung und Ausblick

Die hier vorliegende Arbeit konnte Erdnuss-Schwellenwerte unter oraler Provokation mit einem Provokationsprotokoll mit 2-stündigem Steigerungsintervall zwischen den einzelnen Erdnussgaben von 1,95 mg Erdnussprotein (ED₀₅) und 4,10 mg Erdnussprotein (ED₁₀) ermitteln. In Hinblick auf die Bestimmung genauer Erdnuss-Schwellenwerte (ED₀₅, ED₁₀) in einer erdnussallergischen Population sollten kumulative Dosiseffekte durch Provokationsprotokolle mit zu kurzen Steigerungsintervallen vermieden werden. Am besten wären hierzu möglicherweise sogenannte „one-shot challenge“-Protokolle (orale Einzeldosis-Provokationen) mit 24-Stunden-Intervallen zwischen den einzelnen Erdnussgaben zu verwenden. Klinische Studien zu diesen Einzeldosis-Provokationen sind zurzeit in Planung.

In der vorliegenden Studie konnten die Anzahl und Schwere vorangegangener akzidenteller Reaktionen, Erdnuss- bzw. Ara h2-spezifische IgE-Titer, die Quaddelgröße im Hautpricktest sowie die Erdnuss-spezifische Basophilenaktivierung im Basophilenaktivierungstest und ein T_{h2}-Zytokinprofil nach PBMC-Stimulation mit Erdnussextrakt als Prädiktoren für die Reaktionsdosis unter oraler Erdnussprovokation identifiziert werden. Für den Schweregrad unter oraler Erdnussprovokation konnte unter den getesteten Parametern kein Prädiktor gefunden werden. Die Bedeutung der genannten Prädiktoren für die Durchführung der Erdnussprovokation im klinischen Alltag wird nach gegenwärtiger Studienlage kontrovers diskutiert. Daher und v.a. auch aufgrund der Abwesenheit von Vorhersagewerten für die Schwere der klinischen allergischen Reaktion unter oraler Provokation gilt es nach wie vor, Provokationen bei Erdnussallergischen Kindern nur unter strenger Überwachung in stationärer Umgebung und unter Vorhaltung der entsprechenden Medikation durchzuführen.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Murphey KM, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- 2 Johansson SG, Bieber T, Dahl R, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(5): p. 832-6.
- 3 Schmitz R, Atzpodien K, Schlaud M. Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents. *Pediatr Allergy Immunol*, 2012. 23(8): p. 716-23.
- 4 Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 103(5 Pt 1): p. 717-28.
- 5 Lack G. Clinical practice. Food allergy. *N Engl J Med*, 2008. 359(12): p. 1252-60.
- 6 Nissen SP, Kjaer HF, Host A, Nielsen J, Halken S. The natural course of sensitization and allergic diseases from childhood to adulthood. *Pediatr Allergy Immunol*, 2013. 24(6): p. 549-55.
- 7 Spergel JM. From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2010. 105(2): p. 99-106; quiz 107-9, 117.
- 8 Skolnick HS, Conover-Walker MK, Koerner CB, et al. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 107(2): p. 367-74.
- 9 Wolf JL, Bye WA. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med*, 1984. 35: p. 95-112.
- 10 Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 115(1): p. 3-12.
- 11 Pabst O, Bernhardt G, Forster R. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J Leukoc Biol*, 2007. 82(4): p. 795-800.
- 12 Burks AW. Peanut allergy. *Lancet*, 2008. 371(9623): p. 1538-46.
- 13 Klimek L. Früherkennung allergischer Erkrankungen. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 2008. 87 Supplement 1: 32-53.
- 14 Husby S, Jensenius JC, Svehag SE. Passage of undegraded dietary antigen into the blood

- of healthy adults. Quantification, estimation of size distribution, and relation of uptake to levels of specific antibodies. *Scand J Immunol*, 1985. 22(1): p. 83-92.
- 15 Smith KM, Davidson JM, Garside P. T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology*, 2002. 106(2): p. 144-58.
- 16 Burks AW, Tang M, Sicherer S, et al. ICON: food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 129(4): p. 906-20.
- 17 Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(2): p. 391-7.
- 18 Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S73-80.
- 19 Ito Y, Satoh T, Takayama K, et al. Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases. *Allergy*, 2011. 66(8): p. 1107-13.
- 20 Showell HJ, Freer RJ, Zigmond SH, et al. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *J Exp Med*, 1976. 143(5): p. 1154-69.
- 21 Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, et al. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006. 141(1): p. 79-90.
- 22 Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA. Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med*, 1993. 177(3): p. 605-11.
- 23 Perrigoue JG, Saenz SA, Siracusa MC, et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*, 2009. 10(7): p. 697-705.
- 24 Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2009. 10(7): p. 706-12.

- 25 Sokol CL, Chu NQ, Yu S, et al. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*, 2009. 10(7): p. 713-20.
- 26 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989. 7: p. 145-73.
- 27 Pai SY, Truitt ML, Ho IC. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(7): p. 1993-8.
- 28 van Beek AA, Knol EF, de Vos P, et al. Recent developments in basophil research: do basophils initiate and perpetuate type 2 T-helper cell responses? *Int Arch Allergy Immunol*, 2013. 160(1): p. 7-17.
- 29 Suurmond J, Stoop JN, Rivellese F, et al. Activation of human basophils by combined toll-like receptor- and FcepsilonRI-triggering can promote Th2 skewing of naive T helper cells. *Eur J Immunol*, 2014. 44(2): p. 386-96.
- 30 Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol*, 2012. 5(3): p. 232-9.
- 31 Kim JS, Sampson HA. Food allergy: a glimpse into the inner workings of gut immunology. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012. 28(2): p. 99-103.
- 33 Souci SW, Fachmann W, Kraut H. Food Composition and Nutrition Tables/ Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen/ La composition des aliments Tableaux des valeurs nutritives. 7. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Medpharm Scientific Publishers, 2008.
- 34 Nwokolo E. Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In: Nwokolo E, Smart J [editor]: Food and Feed from Legumes and Oilseeds. 1st Edition. London: Chapman & Hall, 1996, pp 49-63.
- 35 Schoepke T. *Arachis hypogaea*. <http://www.plant-pictures.de/allgemei/koehler/koeh-161.jpg>. Stand: 05.12.2013.
- 36 Verma AK, Kumar S, Das M, Dwivedi PD. A comprehensive review of legume allergy. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013. 45(1): p. 30-46.
- 37 Radauer C, Nandy A, Ferreira F, et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*, 2014. 69(4): p. 413-9.
- 38 Mueller GA, Maleki SJ, Pedersen LC. The molecular basis of peanut allergy. *Curr Allergy*

- Asthma Rep, 2014. 14(5): p. 429.
- 39 WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. Official Allergen Nomenclature Database. Search results for "Arachis hypogaea". <http://www.allergen.org/search.php?Species=Arachis%20hypogaea>. Stand: 17.04.2014.
- 40 Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, et al. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 114(6): p. 1410-7.
- 41 Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, Knulst AC, Knol EF. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin Exp Allergy*, 2004. 34(4): p. 583-90.
- 42 Flinterman AE, van Hoffen E, den Hartog Jager CF, et al. Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time. *Clin Exp Allergy*, 2007. 37(8): p. 1221-8.
- 43 Pedrosa M, Boyano-Martinez T, Garcia-Ara MC, Caballero T, Quirce S. Peanut seed storage proteins are responsible for clinical reactivity in Spanish peanut-allergic children. *Pediatr Allergy Immunol*, 2012. 23(7): p. 654-9.
- 44 Koppelman SJ, Hefle SL, Taylor SL, de Jong GA. Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Mol Nutr Food Res*, 2010. 54(12): p. 1711-21.
- 45 Peeters KA, Koppelman SJ, van Hoffen E, et al. Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy? *Clin Exp Allergy*, 2007. 37(1): p. 108-15.
- 46 Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. 106(4): p. 763-8.
- 47 Beyer K, Morrow E, Li XM, et al. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 107(6): p. 1077-81.
- 48 Shreffler WG, Castro RR, Kucuk ZY, et al. The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. *J Immunol*, 2006. 177(6): p. 3677-85.

- 49 Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(6): p. 1203-7.
- 50 Ben-Shoshan M, Kagan RS, Alizadehfar R, et al. Is the prevalence of peanut allergy increasing? A 5-year follow-up study in children in Montreal. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. 123(4): p. 783-8.
- 51 Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, et al. Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 122(5): p. 984-91.
- 52 Mullins RJ, Dear KB, Tang ML. Characteristics of childhood peanut allergy in the Australian Capital Territory, 1995 to 2007. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. 123(3): p. 689-93.
- 53 Shek LP, Lee BW. Food allergy in Asia. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006. 6(3): p. 197-201.
- 54 Venter C, Hasan Arshad S, Grundy J, et al. Time trends in the prevalence of peanut allergy: three cohorts of children from the same geographical location in the UK. *Allergy*, 2010. 65(1): p. 103-8.
- 55 Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 107(1): p. 191-3.
- 56 Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(4): p. 1016-8.
- 57 Pumphrey RS, Gowland MH. Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(4): p. 1018-9.
- 58 Boulay A, Houghton J, Gancheva V, et al. A EuroPrevall review of factors affecting incidence of peanut allergy: priorities for research and policy. *Allergy*, 2008. 63(7): p. 797-809.
- 59 Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ*, 1996. 313(7056): p. 518-21.
- 60 Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med*, 2003. 348(11): p. 977-85.

- 61 Sicherer SH, Furlong TJ, Maes HH, et al. Genetics of peanut allergy: a twin study. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. 106(1 Pt 1): p. 53-6.
- 62 Hourihane JO, Aiken R, Briggs R, et al. The impact of government advice to pregnant mothers regarding peanut avoidance on the prevalence of peanut allergy in United Kingdom children at school entry. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(5): p. 1197-202.
- 63 Sicherer SH, Wood RA, Stablein D, et al. Maternal consumption of peanut during pregnancy is associated with peanut sensitization in atopic infants. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(6): p. 1191-7.
- 64 de Montis G, Gendrel D, Chemillier-Truong M, Dupont C. Sensitisation to peanut and vitamin D oily preparations. *Lancet*, 1993. 341(8857): p. 1411.
- 65 Perry TT, Conover-Walker MK, Pomes A, Chapman MD, Wood RA. Distribution of peanut allergen in the environment. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(5): p. 973-6.
- 66 Yu JW, Kagan R, Verreault N, et al. Accidental ingestions in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(2): p. 466-72.
- 67 Neuman-Sunshine DL, Eckman JA, Keet CA, et al. The natural history of persistent peanut allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2012. 108(5): p. 326-331 e3.
- 68 Nguyen-Luu NU, Ben-Shoshan M, Alizadehfar R, et al. Inadvertent exposures in children with peanut allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, 2012. 23(2): p. 133-9.
- 69 Hallett R, Haapanen LA, Teuber SS. Food allergies and kissing. *N Engl J Med*, 2002. 346(23): p. 1833-4.
- 70 Maloney JM, Chapman MD, Sicherer SH. Peanut allergen exposure through saliva: assessment and interventions to reduce exposure. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(3): p. 719-24.
- 71 Sicherer SH, Burks AW, Sampson HA. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics*, 1998. 102(1): p. e6.
- 72 Blom WM, Vlieg-Boerstra BJ, Kruizinga AG, et al. Threshold dose distributions for 5 major allergenic foods in children. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 131(1): p. 172-9.
- 73 Simonte SJ, Ma S, Mofidi S, Sicherer SH. Relevance of casual contact with peanut butter in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(1): p. 180-2.

- 74 Furlong TJ, DeSimone J, Sicherer SH. Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 108(5): p. 867-70.
- 75 Sicherer SH, Sampson HA. Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 120(3): p. 491-503; quiz 504-5.
- 76 Skripak JM, Wood RA. Peanut and tree nut allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*, 2008. 19(4): p. 368-73.
- 78 Hourihane JO, Roberts SA, Warner JO. Resolution of peanut allergy: case-control study. *BMJ*, 1998. 316(7140): p. 1271-5.
- 79 Scheewe S, Ahrens P, Beyer K, et al. Vorgehen bei Verdacht auf Erdnussallergie im Kindesalter. *Pädiatrische Allergologie in Klinik und Praxis*, 2009. 12. Jahrgang. Heft 2/2009: S. 36-39.
- 80 Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 103(6): p. 981-9.
- 81 Niggemann B, Beyer K. Diagnosis of food allergy in children: toward a standardization of food challenge. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007. 45(4): p. 399-404.
- 82 Niggemann B, Rolinck-Werninghaus C, Mehl A, et al. Controlled oral food challenges in children--when indicated, when superfluous? *Allergy*, 2005. 60(7): p. 865-70.
- 83 Sampson HA, Gerth van Wijk R, Bindslev-Jensen C, et al. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 130(6): p. 1260-74.
- 84 Niggemann B. When is an oral food challenge positive? *Allergy*, 2010. 65(1): p. 2-6.
- 85 Osterballe M, Bindslev-Jensen C. Threshold levels in food challenge and specific IgE in patients with egg allergy: is there a relationship? *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(1): p. 196-201.
- 86 Benhamou AH, Zamora SA, Eigenmann PA. Correlation between specific immunoglobulin E levels and the severity of reactions in egg allergic patients. *Pediatr Allergy Immunol*, 2008. 19(2): p. 173-9.
- 87 Rolinck-Werninghaus C, Niggemann B, Grabenhenrich L, Wahn U, Beyer K. Outcome of

- oral food challenges in children in relation to symptom-eliciting allergen dose and allergen-specific IgE. *Allergy*, 2012. 67(7): p. 951-7.
- 88 Peeters KA, Koppelman SJ, van Hoffen E, et al. Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy? *Clin Exp Allergy*, 2007. 37(1): p. 108-15.
- 89 Flinterman AE, van Hoffen E, den Hartog Jager CF, et al. Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time. *Clin Exp Allergy*, 2007. 37(8): p. 1221-8.
- 90 Hourihane JO, Grimshaw KE, Lewis SA, et al. Does severity of low-dose, double-blind, placebo-controlled food challenges reflect severity of allergic reactions to peanut in the community? *Clin Exp Allergy*, 2005. 35(9): p. 1227-33.
- 91 Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, et al. The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 110(6): p. 915-20.
- 92 Richtlinie 2007/68/EG der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten. *Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 310 vom 28.11.2007*: S. 11-14.
- 93 Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg. Nachweis von Lebensmittelallergenen. *Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg Jahresbericht 2005*. S. 152-156.
- 94 Hefle SL, Furlong TJ, Niemann L, et al. Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 120(1): p. 171-6.
- 95 Betschel SD, Vadas P. Ethanol is a requisite cofactor in anaphylaxis to spinach. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:S100.
- 96 Beyer K. Strategien zur Bestimmung von Schwellenwerten für Lebensmittelallergene aus klinischer Sicht. In: *Bundesinstitut für Risikobewertung (Hrsg.). Schwellenwerte zur Allergenkennzeichnung von Lebensmitteln – Expertengespräch im Rahmen der BMELV-Konferenz 2008 „Allergien: Bessere Information, höhere Lebensqualität“ am 15. Oktober*

- 2008 in Berlin. Tagungsband, Berlin 2009. S. 19-24.
- 97 Collett D. Modeling Survival Data in Medical Research. Second edition. Boca Raton, Florida, USA: Chapman and Hall/CRC Press, 1993. P. 391.
- 98 Taylor SL, Crevel RW, Sheffield D, Kabourek J, Baumert J. Threshold dose for peanut: risk characterization based upon published results from challenges of peanut-allergic individuals. *Food Chem Toxicol*, 2009. 47(6): p. 1198-204.
- 99 Taylor SL, Moneret-Vautrin DA, Crevel RW, et al. Threshold dose for peanut: Risk characterization based upon diagnostic oral challenge of a series of 286 peanut-allergic individuals. *Food Chem Toxicol*, 2010. 48(3): p. 814-9.
- 100 Blom WM, Vlieg-Boerstra BJ, Kruizinga AG, et al. Threshold dose distributions for 5 major allergenic foods in children. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 131(1): p. 172-9.
- 101 Eller E, Hansen TK, Bindslev-Jensen C. Clinical thresholds to egg, hazelnut, milk and peanut: results from a single-center study using standardized challenges. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2012. 108(5): p. 332-6.
- 102 Sampson HA. Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics*, 2003. 111(6 Pt 3): p. 1601-8.
- 103 Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res*, 1966. 3(4): p. 331-3.
- 104 Astier C, Morisset M, Roitel O, et al. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(1): p. 250-6.
- 105 van der Zee T, Dubois A, Kerkhof M, van der Heide S, Vlieg-Boerstra B. The eliciting dose of peanut in double-blind, placebo-controlled food challenges decreases with increasing age and specific IgE level in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 128(5): p. 1031-6.
- 106 Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlations between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE, and food challenges. *Allergy*, 1997. 52(10): p. 1031-5.
- 107 Henzgen M, Ballmer-Weber BK, Erdmann S, et al. Hauttestungen mit Nahrungsmittelallergenen. Leitlinie der Arbeitsgruppe Nahrungsmittelallergie der

- Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) und der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie (GPA) zusammen mit der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2008. 6(11): p. 983-8.
- 108 Rueff F, Bergmann KC, Brockow K, et al. Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttypreaktionen. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI). *Pneumologie*, 2011. 65(8): p. 484-95.
- 109 Burks AW, Williams LW, Connaughton C, et al. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol*, 1992. 90(6 Pt 1): p. 962-9.
- 110 Rothe G. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg). *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Schweiz: Karger, 2007, pp. 27-70.
- 111 Becton, Dickinson and Company. *Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung*. Heidelberg, Deutschland, 2005.
- 112 Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*, 1991. 88(3 Pt 1): p. 328-38.
- 113 Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy*, 2005. 3: p. 9.
- 114 Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, et al. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*, 2008. 6: p. 12.
- 115 de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008. 146(3): p. 177-89.
- 116 Wanich N, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA, Shreffler WG. Allergen-specific basophil suppression associated with clinical tolerance in patients with milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. 123(4): p. 789-94 e20.

- 117 Johansson SG, Nopp A, van Hage M, et al. Passive IgE-sensitization by blood transfusion. *Allergy*, 2005. 60(9): p. 1192-9.
- 118 Nopp A, Johansson SG, Ankerst J, et al. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy*, 2006. 61(3): p. 298-302.
- 119 Jones SM, Pons L, Roberts JL, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. 124(2): p. 292-300, 300 e1-97.
- 120 Rubio A, Vivinus-Nebot M, Bourrier T, et al. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*, 2011. 66(1): p. 92-100.
- 121 Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, et al. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy*, 2009. 39(8): p. 1234-45.
- 122 Blumchen K, Ulbricht H, Staden U, et al. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(1): p. 83-91 e1.
- 123 Lagrelius M, Jones P, Franck K, Gaines H. Cytokine detection by multiplex technology useful for assessing antigen specific cytokine profiles and kinetics in whole blood cultured up to seven days. *Cytokine*, 2006. 33(3): p. 156-65.
- 124 DunnGalvin A, Chang WC, Laubach S, et al. Profiling families enrolled in food allergy immunotherapy studies. *Pediatrics*, 2009. 124(3): p. e503-9.
- 125 Flinterman AE, Pasmans SG, Hoekstra MO, et al. Determination of no-observed-adverse-effect levels and eliciting doses in a representative group of peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(2): p. 448-54.
- 126 Wainstein BK, Studdert J, Ziegler M, Ziegler JB. Prediction of anaphylaxis during peanut food challenge: usefulness of the peanut skin prick test (SPT) and specific IgE level. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010. 21(4 Pt 1): p. 603-11.
- 127 Dang TD, Tang M, Choo S, et al. Increasing the accuracy of peanut allergy diagnosis by using Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. 129(4): p. 1056-63.
- 128 Niggemann B, Beyer K, Erdmann S, et al. Standardisierung von oralen Provokationstests bei Verdacht auf Nahrungsmittelallergie. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärztverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) sowie der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und

- Umweltmedizin (GPA). *Allergo J*, 2011. 20: p. 149-60.
- 129 Eller E, Bindslev-Jensen C. Clinical value of component-resolved diagnostics in peanut-allergic patients. *Allergy*, 2013. 68(2): p. 190-4.
- 130 Shreffler WG. Evaluation of basophil activation in food allergy: present and future applications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006. 6(3): p. 226-33.
- 131 Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, et al. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008. 74(4): p. 201-10.
- 132 MacGlashan DW, Jr. Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 132(4): p. 777-87.
- 133 Dvorak AM, Morgan ES, Lichtenstein LM, MacGlashan DW, Jr. Activated human basophils contain histamine in cytoplasmic vesicles. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994. 105(1): p. 8-11.
- 134 Yoshimura C, Yamaguchi M, Iikura M, et al. Activation markers of human basophils: CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 109(5): p. 817-23.
- 135 Taylor SL, Baumert JL, Kruizinga AG, et al. Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: report of the VITAL Expert Panel. *Food Chem Toxicol*, 2014. 63: p. 9-17.
- 136 Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, et al. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin Exp Allergy*, 2004. 34(5): p. 689-95.
- 137 Sicherer SH, Morrow EH, Sampson HA. Dose-response in double-blind, placebo-controlled oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. 105(3): p. 582-6.
- 138 Homsak M, Silar M, Berce V, et al. The relevance of basophil allergen sensitivity testing to distinguish between severe and mild peanut-allergic children. *Int Arch Allergy Immunol*, 2013. 162(4): p. 310-7.
- 139 Sabato V, van Hengel AJ, De Knop KJ, et al. Human basophils: a unique biological instrument to detect the allergenicity of food. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2011.

- 21(3): p. 179-84.
- 140 Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest*, 2003. 111(7): p. 1065-72.
- 141 Turcanu V, Winterbotham M, Kelleher P, Lack G. Peanut-specific B and T cell responses are correlated in peanut-allergic but not in non-allergic individuals. *Clin Exp Allergy*, 2008. 38(7): p. 1132-9.
- 142 Flinterman AE, Pasmans SG, den Hartog Jager CF, et al. T cell responses to major peanut allergens in children with and without peanut allergy. *Clin Exp Allergy*, 2010. 40(4): p. 590-7.
- 143 Dang TD, Tang ML, Koplin JJ, et al. Characterization of plasma cytokines in an infant population cohort of challenge-proven food allergy. *Allergy*, 2013. 68(10): p. 1233-40.
- 144 Chen R, Lowe L, Wilson JD, et al. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem*, 1999. 45(9): p. 1693-1694.
- 145 Carson RT, Vignali DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods*, 1999. 227(1-2): p. 41-52.

Danksagung

Sehr herzlich danke ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Kirsten Beyer, für die Überlassung des Themas, für die konstruktive und kritische Unterstützung und für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ich danke ganz besonders Frau Dr. med. habil. Katharina Blümchen für die umfassende und engagierte Betreuung und Begleitung sowie für die so produktive und unentwegte Hilfestellung auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne ihre konsequente Unterstützung wäre diese Dissertation in der hier vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Danke für das stets offene Ohr für kleine und größere Doktoranden-Sorgen, die wertvollen Ratschläge und die beständig motivierenden Worte in (fast) allen Lebenslagen!

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Allergielabors, Alexander Rohrbach, Gabriele Schulz, Margeret Oberreit, Petra Ellensohn (†) und Christine Seib für Anleitung, tatkräftige Unterstützung und die so angenehme Zusammenarbeit. Ebenso herzlichen Dank an Herrn John Beschorner für die Einarbeitung in die Methodik und Frau Valérie Trendelenburg für die frohe und gute Zusammenarbeit bei Datenakquise und -analyse. Herrn Dr. Konrad Neumann sei gedankt für die Hilfe in Fragen der Statistik.

Meiner Mutter, Frau Monika Beder, danke ich für das Lektorat der Arbeit, ihre verlässliche Unterstützung, geduldige Beratung und unermüdliche Motivation während der Promotion und weit darüber hinaus.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei allen Patienten und deren Eltern bedanken, die bereit waren an der vorliegenden Studie teilzunehmen.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V. sei an dieser Stelle für die finanzielle und ideelle Förderung während meines Studiums ebenfalls sehr herzlich gedankt. Insbesondere die konstruktiven Ratschläge von Frau Dr. Pamela Luckau waren eine sehr wertvolle Hilfe im Prozess der Niederschrift.

Abschließend bedanke ich mich sehr herzlich bei all jenen, die mich auf meinem Ausbildungs- und bisherigen Lebensweg begleitet haben, allen voran meinen Eltern, Monika und Konrad Beder, meinen Geschwistern und Freunden. Ich danke euch sehr für eure zuverlässige Begleitung, Anteilnahme, Geduld und Ermutigung in allen Höhen und Tiefen!

Lebenslauf

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

Publikationen/Vorträge

- 09/2014 Beyer K, Grabenhenrich L, Härtl M, **Beder A**, Kalb B, Ziegert M, Finger A, Harandi N, Schlags R, Gappa M, Puzzo L, Röblitz H, Millner-Uhlemann M, Büsing S, Ott H, Lange L, Niggemann B. Predictive values of component-specific IgE for the outcome of peanut and hazelnut food challenges in children. *Allergy*. 2015 Jan;70(1):90-8.
- 05/2014 Blumchen K, **Beder A**, Beschorner J, Ahrens F, Gruebl A, Hamelmann E, Hansen G, Heinzmann A, Nemat K, Niggemann B, Wahn U, Beyer K. Modified oral food challenge used with sensitization biomarkers provides more real-life clinical thresholds for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. 134(2): p. 390-8.
- 09/2011 **Beder A**, Beschorner J, Rohrbach A, Wahn U., Beyer K, Blümchen K. Korrelation zwischen der klinischen Reaktion unter oraler Nahrungsmittelprovokation und laborparametrischen Markern bei erdnussallergischen Kindern. Kongressvortrag. 6. Deutscher Allergiekongress, 8.-10. September 2011, Wiesbaden.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alena Beder, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Bestimmung klinischer Schwellenwerte und Identifikation prädiktiver Werte für die klinische Reaktion unter oraler Erdnussprovokation bei erdnussallergischen Kindern unter Verwendung eines modifizierten Provokationsprotokolls“

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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Neubrandenburg, 15.04.2015

.....
Alena Beder

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frau Alena Beder hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Blumchen K, **Beder A**, Beschorner J, Ahrens F, Gruebl A, Hamelmann E, Hansen G, Heinzmann A, Nemat K, Niggemann B, Wahn U, Beyer K. Modified oral food challenge used with sensitization biomarkers provides more real-life clinical thresholds for peanut allergy. J Allergy Clin Immunol, 2014. 134(2): p. 390-8.

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung, Laborarbeit, Datenanalyse und -auswertung.

Unterschrift, Datum und Stempel des der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin