

# Klinische Studie mit einem neuen In-vitro-Test-System

P.-G. von Wahl, W. Kersten  
Institut für Umwelt- und Arbeitsmedizin, Moers

Clinical study to  
compare a new  
in-vitro test

## Zusammenfassung

Zwei In-vitro-Methoden zur Bestimmung des spezifischen IgE im Humanserum, das Innogenetics AllergoScan-System und das CAP-System Pharmacia, wurden an einem großen Patientenkollektiv mit bekannten allergischen Sensibilisierungen miteinander verglichen.

Es wurden sowohl die Resultate der Hautreaktion der Patienten mit den In-vitro-Ergebnissen korreliert verglichen als auch die Meßresultate der beiden Systeme direkt in Bezug gesetzt.

Es zeigte sich, daß die Sensitivität der Nitrozellulosemembran gegenüber dem CAP im Vergleich mit der positiven Hautsensibilisierung signifikant niedriger ist. Im Vergleich zur Hautreaktion zeigten CAP- und AllergoScan-System dagegen fast identische Spezifitäten.

Der Vergleich zu einem anderen Screening-Testsystem (CLA) zeigte eine ähnlich gute Sensitivität, jedoch in der Beurteilung der Spezifität im Vergleich zum CAP-System eine erheblich höhere Übereinstimmung.

Das AllergoScan-Nitrozellulose-System ist für ein Allergenscreening gut geeignet, auch wenn es die Einzelallergenbestimmung nicht ersetzen kann.

## Summary

Two in-vitro methods for determining specific IgE levels in human serum, the AllergoScan system (Innogenetics) and the CAP-System (Pharmacia), were compared in a large patient population with known allergic sensitization.

The skin reactions of the patients were correlated with the results of the in-vivo assays, and the reading of the two systems were directly compared.

It was shown that the sensitivity of the nitrocellulose membrane is significantly lower than that of the CAP with reference to positive skin sensitization. Conversely,

when compared with the skin reaction, the specificity of both systems proved virtually identical.

Compared with a second screening test system (CLA), AllergoScan showed similar sensitivity but much higher specificity for the examined allergens.

The nitrocellulose AllergoScan system is eminently suitable for allergy screening, even if it is no substitute for single allergen determination.

## Einleitung

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, spezifisches IgE im Serum bei allergischen Erkrankungen zu bestimmen. Unterschiede bei den bestehenden Systemen liegen in der Allergenkopplung an eine Trägermatrix (solid phase), den Enzymsystemen zur Detektion der Antikörper, der Markierung der Antikörper und der Auswertesysteme.

Die Firma Innogenetics GmbH (Heiden) entwickelte ein System zur quantitativen Messung von spezifischem Human-IgE, das moderne Computertechnologien und Enzymsysteme zur Antikörperdetektion verknüpft und das seit September 1997 auf dem deutschen Markt ist.

## Systemcharakterisierung

Die Solidphase besteht aus einem Nitrozelluloseträger, auf dem wäßrige Allergenextrakte über einen speziellen „Lineprinter“ als Banden aufgetragen werden. Durch einen Stabilisierungszusatz verfließen die Allergenbanden nicht, sondern bleiben als scharfe Linie auf der Nitrozellulose bestehen. Die Träger werden anschließend getrocknet, geschnitten und in einen Trog auf einem speziellen Kunststoffchip eingeklebt.

Eine Aktivierung der Nitrozellulose z.B. durch CnBr, wird nicht durchgeführt. Trotzdem bietet die passive Adhäsion der Allergene in der Nitrozellulose eine genügende Stabilität, so daß Waschvorgänge keine Veränderung des Musters mit sich bringen können,

Schlüsselwörter:  
AllergoScan, CAP,  
In-vitro-Diagnostik,  
spezifisches IgE

Key words:  
AllergoScan, CAP,  
in-vitro diagnostic,  
specific IgE

Korrespondenzadresse:  
Dr. med. P.-G. von Wahl,  
Institut für Umwelt- und  
Arbeitsmedizin,  
Uerdinger Str. 3,  
D-47441 Moers.

wie es auch beim Immunoblotting typisch ist. Die Proteine werden über ein Streptavidin-Biotin-System auf der Nitrozellulose sichtbar gemacht, so daß die mit dem Humanserum spezifisch reagierenden Antigene erfaßt werden können (Dunn et al. 1988). Erstmals wurde von Guesdon et al. (1979) ein derartiges Detektionssystem zur Bestimmung eines primären Antikörpers durch einen biotinierten zweiten Antikörper eingesetzt.

Als Allergene können sowohl handelsübliche Prick-Testlösungen oder aber selbstextrahierte Proteine verwendet werden, wobei die Extrakte, wie es industriell üblich ist, anhand einer für das jeweilige Allergen hauseigenen Serumreferenz kontrolliert werden.

Insgesamt kann die Trägermatrix maximal 20 Allergene aufnehmen, die in einem Abstand von ca. 1 mm voneinander getrennt vorliegen.

In folgenden Schritten wird der Test abgearbeitet: Die Nitrozellulosemembran im Trog wird mit 400 µl Serum für 45 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem

Washvorgang mit einer normalen Multipipette über einen PBS-Puffer, wird der Chip ebenfalls für 45 Minuten mit einem Detektor-Antikörper inkubiert, bei dem es sich um ein biotiniertes, monoklonales Maus-Anti-IgE handelt, das mit den vorhandenen Human-IgE an den Allergenbanden ein Sandwich bildet.

Nach einem weiteren Washvorgang wird mit einer Streptavidinkonjugatlösung (400 µl) für 20 Minuten die Membran erneut inkubiert. Das Streptavidin ist hierbei an alkalischer Phosphatase konjugiert und dockt an das Biotin des Detektorantikörpers an.

Nach dieser Inkubation wird die Membran wiederum gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit einer BCIP/NBT-Lösung versetzt. Die alkalische Phosphatase setzt diesen Farbstoff um, so daß purpur-schwarze Präzipitate über den Allergenbanden ausfallen.

Dabei ist die Schärfe der Präzipitate auf den Allergenbanden sehr hoch und erinnert an das Muster eines Western-Blots. Eine Beeinflussung der Nachbarbanden bei hohen spezifischen IgE-Werten ist nicht gegeben, auch findet kein „Auslaufen“ der Präzipitate auf den Allergenbanden statt.

Die Intensität der Präzipitate korreliert mit der Menge an spezifischen IgE-Antikörpern im Serum, entsprechend den marktüblichen In-vitro-Systemen, die über Kolorimetrie oder Fluoreszenz ausgewertet werden. Hier wird jedoch keine Lösung gemessen, sondern eine geschwärzte Oberfläche, wie es auch bei Filmen mit dosierter Belichtung der Fall ist.

Die Auswertung der Chips und die Berechnung der Menge an spezifischem IgE geschieht über ein Computersystem. Hierzu werden die Schwärzungen der Präzipitate nach 256 Graustufen über einen Scanner digitalisiert und die ermittelten Graustufen für jedes Serum an einer Graustufenstandardreihe, die für jedes zu untersuchende Serum auf der Membran jeweils mit erstellt wird, verglichen und ausgewertet.

Dazu wird eine Standardreihe aus biotinierten Rinderserumalbumin auf jede Membran als Referenzkurve geprintet, deren Verdünnungen am IgE-Gehalt des Lieschgrases und der Hausstaubmilbe *Derm. pteronyssinus* mittels einer In-house-Referenz angepaßt wird. Diese Referenz wird im CAP-System (Pharmacia) kontrolliert. Der WHO-Standard für das Gesamt-IgE wird jedoch nicht verwendet.

Jede Standardkurve wird intern durch das EDV-Programm dahingehend geprüft, ob bestimmte Grenzen, die produktionstechnisch vorkalibriert sind, eingehalten werden. Bei

Tab. 1: Allergenkombinationen des inhalativen Chips und des Nahrungsmittelchips

inhalativer Chip	Nahrungsmittelchip
Birke	Haselnuß
Erle	Erdnuß
Hasel	Walnuß
Eiche	Mandel
Gräsermischung	Milch
Roggenpollen	Eiklar
Belfuß	Eigelb
Wegerich	Kasein
<i>Derm. pteronyssinus</i>	Kartoffel
<i>Derm. farinae</i>	Sellerie
Hundeepithelien	Karotte
Katzenepithelien	Tomate
Pferdeepithelien	Kabeljau
Meerschweinchen	Krabbe
Hamster	Pfirsich
Kaninchen	Apfel
Aspergillus	Sojabohne
Cladosporium	Weizenmehl
Penicillium	Sesam
Alternaria	Roggenmehl

bestehenden Abweichungen wird der Anwender durch das Programm informiert, daß bestimmte Standards außerhalb der Grenzen liegen und wie hoch die Abweichung ist. Somit wird automatisch kontrolliert, ob die Meßergebnisse valide sind.

Bei der Berechnung der Grauwerte der Allergenbanden ist das Programm derart gestaltet, daß jeder Allergenbande nach dem Scannen ein Grauwert zugewiesen wird, wobei der individuelle Hintergrund der Nitrozellulose oberhalb und unterhalb der Allergenbanden bei jedem Allergenprint berücksichtigt wird. Damit kann ein eventuell vorhandenes unspezifisches „Hintergrundrauschen“ in der Berechnung berücksichtigt werden. Die Präzision ist so hoch, daß nur die Mitte der präzipitierten Banden ausgewertet werden.

Trotz dieser hohen Präzision in der Auswertung können Flachbettscanner jeglicher Bauart verwendet werden, da das Programm den Scanner automatisch kalibriert, eventuell vorhandene Helligkeitsunterschiede berücksichtigt und die zu erwartende Position der Allergenbanden über „Normchips“ evaluiert.

Es werden derzeit zwei Chips sowohl mit inhalativen als auch mit nutritiven Allergenen als feste Allergenkombinationen angeboten, mit denen sich die in Tab. 1 aufgeführten Allergene (Pollen, Milben, Tiere, Nahrungsmittel) auf spezifischen IgE-Antikörper innerhalb von 21/2 Stunden im Humanserum untersuchen lassen.

Die Allergene auf den Chips wurden so gewählt, daß im inhalativen Bereich alle relevanten Allergene erfaßt werden. Im Nahrungsmittelchip beschränkte man sich dagegen auf die typischen „Schlüsselallergene“ des Pollenallergikers (z.B. Karotte, Sellerie, Soja, Erduß und verschiedene Nüsse) sowie auf typische Proteine (Ei, Milch, Fisch etc.).

### Klinische Studie

Im Rahmen einer klinischen Studie wurden 196 Seren von Patienten mit einer allergischen Atemwegserkrankung, die zuvor über den Hauttest (Testlösungen HAL, Düsseldorf) und über die routinemäßige In-vitro-Diagnostik (CAP-System, Pharmacia, Freiburg) untersucht wurden, retrospektiv mit dem Innogenetics AllergoScan-Test auf spezifische IgE-Antikörper im inhalativen Chip statistisch zur Sensitivität und Spezifität der Testverfahren verglichen.

Zusätzlich wurden die im Prick-Hauttest festgestellten Hautreaktionen mit den Antikörperbestimmungen der beiden System verglichen.

Tab. 2: Vergleich der Sensitivität und Spezifität des AllergoScan-Systems zur Hauttestung (Hauttest = goldener Standard) in Prozent.

	Sensitivität	Spezifität
Birke	89,7	80,4
Hasel	84,8	69,5
Erle	83,3	82,6
Grasmischung	88,3	92,0
Roggen	78,5	94,4
Beifuß	79,6	86,6
Wegerich	63,3	79,3
Derm. pteronyssinus	67,0	82,0
Derm. farinae	69,8	85,2
Hund	65,6	87,5
Katze	87,7	68,7
Pferd	72,2	100
Aspergillus	60,0	78,9
Cladosporium	100	100
Penicillium	33,3	75,0
Alternaria	84,0	100
Eiche	93,1	100
Mittelwert	76,5	86,0

Tab. 3: Vergleich der Sensitivität und Spezifität des CAP-Systems zur Hauttestung in Prozent (Hauttest = goldener Standard).

	Sensitivität	Spezifität
Birke	95,8	88,8
Hasel	96,0	88,8
Erle	94,6	90,0
Grasmischung	91,3	90,0
Roggen	87,0	90,0
Beifuß	90,0	91,7
Wegerich	88,8	100
Derm. pteronyssinus	88,6	83,4
Derm. farinae	87,9	79,4
Hund	86,2	83,3
Katze	95,8	94,4
Pferd	100	100
Aspergillus	100	75,0
Cladosporium	100	75,0
Alternaria	88	100
Mittelwert	92,6	88,6

Dazu wurden alle spezifischen IgE-Antikörperklassen im CAP-, AllergoScan- und CLA-System 1 als positiv eingruppiert; die Hautreaktion wurde nach den Kriterien von Werner und Ruppert (1979) festgestellt, wobei die Hautreaktion zur Vereinfachung der statistischen Berechnungen als positiv oder negativ bewertet wurde.

Darüber hinaus wurden die Ergebnisse mit einem identisch angelegten In-vitro-Vergleich mit dem CLA-System (ADL, Freiburg), der Ende 1996 durchgeführt wurde (Kersten et al., 1998), mit den dort ermittelten Werte für die verschiedenen Allergene in Bezug gesetzt.

Die Spezifität und Sensitivität wurde wie folgt berechnet:

- Sensitivität (%):  $\text{Positive Proben} \times 100 / \text{positive Proben im CAP-System bzw. im Hauttest}$ ,
- Spezifität (%):  $\text{Negative Proben} \times 100 / \text{negative Proben im CAP-System bzw. im Hauttest}$ .

Da der Vergleich retrospektiv zur normalen Routinediagnostik durchgeführt und das AllergoScan-System nicht primär eingesetzt wurde, konnten nicht alle Resultate der Chips

mit den Haut- bzw. In-vitro-Ergebnissen korreliert werden.

Es wurden mit dem inhalativen Chip insgesamt folgende Einzelallergenvergleiche durchgeführt: 1404 HAUT./AllergoScan-Vergleiche, 1065 Haut./CAP-Vergleiche und 1428 CAP./AllergoScan-Vergleiche.

Zur Durchführung der Korrelationen wurden als untere Grenze 15 Meßvergleiche durchgeführt, so daß einige Allergene – aufgrund zu geringem Aufkommens – nicht berücksichtigt werden konnten.

### Ergebnisse

Als Goldstandard wurde bei den Vergleichen der Ergebnisse zum einen die Hautreaktion gewählt und das AllergoScan und das CAP-System zu dieser Reaktion in Bezug gesetzt. Zum anderen wurde für den Vergleich der ermittelten Konzentrationen allergenspezifischen IgE das CAP-System (Yman 1990) als goldener Standard verwendet und das AllergoScan-System damit verglichen.

Während die Sensitivität des AllergoScan-Chips ca. 11% unterhalb der des CAP-Systems liegt, kommt die Spezifität des Chips der den CAP-Bestimmungen in bezug zur Hauttestung sehr nahe (Tab. 2 und 3). Beide Systeme erreichen einen ähnlichen Mittelwert, bei vielen Allergenen finden sich sogar gleiche Spezifitäten, so daß falsch positive Ergebnisse selten zu finden waren.

Die lineare Korrelation zwischen CAP und AllergoScan der Klassen ergab generell eine gute Übereinstimmung für alle inhalativen Allergene des Chips (Tab. 4).

Als Vergleich dazu sind aus einer anderen Arbeit die Korrelationsergebnisse des CLA-System zum CAP bei denselben Allergene aufgeführt (Kersten et al. 1998).

Es fällt auf, daß, bis auf die Baumpollen, das AllergoScan eine bessere Übereinstimmung gegenüber den CAP-Meßwerten zeigt als das CLA-System, wenn man die Bestimmungen des CAP bei diesem Vergleich als „goldenen In-vitro-Standard“ sieht.

Die Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität des Chips und des CLA im Vergleich zeigt die Tab. 5. Generell läßt sich die Tendenz einer ähnlichen Sensitivität der beiden Systeme im Vergleich zum CAP-System ablesen.

Jedoch ist bei den Schimmelpilzallergenen die Sensitivität im CLA deutlich erniedrigt, so daß sich für das Chip-System dadurch ein höherer Mittelwert errechnen läßt.

Auffällig ist die deutlich höhere Spezifität des AllergoScan-„Chips“, d.h. die Zahl der falsch positiven Ergebnisse – gegenüber dem

Tab. 4: Pearson-Korrelation nach „CAP“-Klassen der Ergebnisse des AllergoScan- und CLA-System zum CAP-System ( $p > 0,001$ ).

	Korrelation AllergoScan./CAP	Korrelation CLA./CAP
Birke	0,76	0,85
Hasel	0,77	0,85
Erle	0,72	0,9
Grasmischung	0,88	0,83
Roggen	0,80	0,80
Beifuß	0,79	0,85
Wegerich	0,68	0,55
Derm. pteronyssinus	0,82	0,79
Derm. farinae	0,84	0,85
Hund	0,66	0,67
Katze	0,81	0,91
Pferd	0,79	0,38
Kaninchen	0,89	0,75
Aspergillus	0,59	0,08
Cladosporium	0,86	0,30
Penicillium	0,58	0,59
Alternaria	0,87	0,49
Mittelwert	0,77	0,67

CAP-System gerechnet – war signifikant geringer als im CLA-Test (88,6% versus 74,4% im Mittel).

Eine Beeinflussung der Meßergebnisse durch hohes Gesamt-IgE oder hämolytisches oder lipämisches Serum konnte nicht festgestellt werden. Dieses ist beim CLA-Petten-System problematisch und führte zu häufig falsch positiven Resultaten im bezug zu anderen Meßsystemen (Kersten et al. 1998).

Im Rahmen der Studie stellte sich heraus, daß die neue Nitrozellulosemembran mit den angewendeten Reagenzien unempfindlich gegenüber Abarbeitungsfehlern ist, was durch die in jeden Chip integrierte Kalibrierungskurve zu erklären ist. Weiter sind durch die vom Programm vorgegebenen Kontrollgrenzwerte der Standardkurve ein wichtiges Kontroll- und Qualitätsmerkmal des Systems.

Zu lange Inkubationszeiten beim Streptavidin-Konjugat führen zu einer deutlich höheren Präzipitatabeute, so daß die Standardkurve „zu hoch läuft“ und invalide Membranen vom System angezeigt werden. Ein Überschreiten der Zeiten bei der Serum- und der Antikörperinkubation führte zu keinen nennenswerten Effekten.

### Diskussion

Während ein Einzelallergensystem jeweils gezielt Allergene anspricht und untersucht, liefert die Nitrozellulosemembran in kurzer Zeit ein Informationspaket über die wichtigsten inhalativen und nutritiven Allergene, wenn auch nicht mit der hohen Sensitivität eines hochqualitativen Einzelplatzsystems. Ein derartiges Screening ist vor allem dann sinnvoll, wenn der Patient durch eine bestehende Medikation nicht testbar oder die Compliance eingeschränkt ist (bei Kindern) oder die Testareale auf der Haut durch Hauterkrankungen belegt sind. Hier müssen sogar primär serologische Untersuchungen die Hauttestungen ersetzen, was zu einer Kosteneinsparung führt, wenn man die möglichen Allergene nicht in Einzelbestimmung sondern als Reihe untersucht.

Ein derartiger Screening-Test kann daher dem etablierten Diagnosegang vor bzw. nach-

geschaltet werden, wenn eindeutige wegweisende Angaben nicht erhoben werden können.

Die Möglichkeit, ein großes Allergenspektrum in kurzer Zeit im Serum auf Antikörper zu untersuchen, darf jedoch nicht dazu führen, daß die Befunde unreflektiert übernommen werden und damit den Patienten nur an Hand der Serumanalyse zu einem behandlungsbedürftigen Allergiker zu machen. Daher gehört diese Untersuchungsmethode, wie jedes andere allergologische In-vitro-Verfahren, in die Hand des erfahrenen Allergologen, der die Ergebnisse auch entsprechend bewerten kann und sie mit den übrigen Befunden ganzheitlich einzuordnen vermag (Kersten et al., 1992).

Tab. 5: Vergleich der Sensitivität und Spezifität des AllergoScan-Systems und des CLA-Systems zum CAP-System (CAP = goldener Standard)

	Sensitivität AllergoScan ./ CAP	Spezifität AllergoScan ./ CAP	Sensitivität CLA ./ CAP	Spezifität CLA ./ CAP
Birke	87,9	86,7	93,9	75,0
Hasel	83,8	84,6	95,3	66,7
Erle	86,7	93,3	97,7	83,3
Grasmischung	94,8	86,1	97,1	57,1
Roggen	85,9	85,7	92,1	100
Beifuß	88,8	89,2	84,2	86,6
Wegerich	78,1	85,7	81,8	100
Derm. pteronyssinus	75,0	93,3	75,7	60,9
Derm. farinae	69,4	97,5	91,3	75
Hund	58,8	82,6	68,0	82,3
Katze	91,4	72,7	92,6	64,7
Pferd	57,1	93,7	56,2	58,3
Aspergillus	72,7	87,5	30,7	80,0
Cladosporium	66,6	92,3	40,0	71,4
Penicillium	62,5	95,8	62,5	69,2
Alternaria	87,5	91,3	60,0	60,0
Mittelwert	77,9	88,6	76,2	74,4

### Literatur:

1. Dunn MJ, Patel K: Detection of protein blots using avidin-biotin system.– In.: Walker JM (ed.): Methods in Molecular Biology, vol 3 (1988): 419–26
2. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem. Cytochem. 27 (1979): 1131–9
3. Kersten W, Stollewerk D, von Wahl PG: Überflüssige Diagnostik allergischer Erkrankungen.– Internistische Praxis 32 (1992): 41–7
4. Kersten W, Wahl P-G von: In-vitro-Vergleich des CLA-Systems (MAST) mit dem CAP-System. Internist. Praxis 38 (1998): 941–5
5. Werner M, Ruppert V: Praktische Allergiediagnostik – Stuttgart (1979)
6. Ymann L: Die neue Generation der Allergie-Testung: Pharmacia CAP-System. In-vitro Diagnostica Special, 2 (1990): 18–22