

Block: Blut und Immunsystem

Woche 6: Praktikum: Zusammenwirken der Zellen des Immunsystems am Beispiel der Allergie

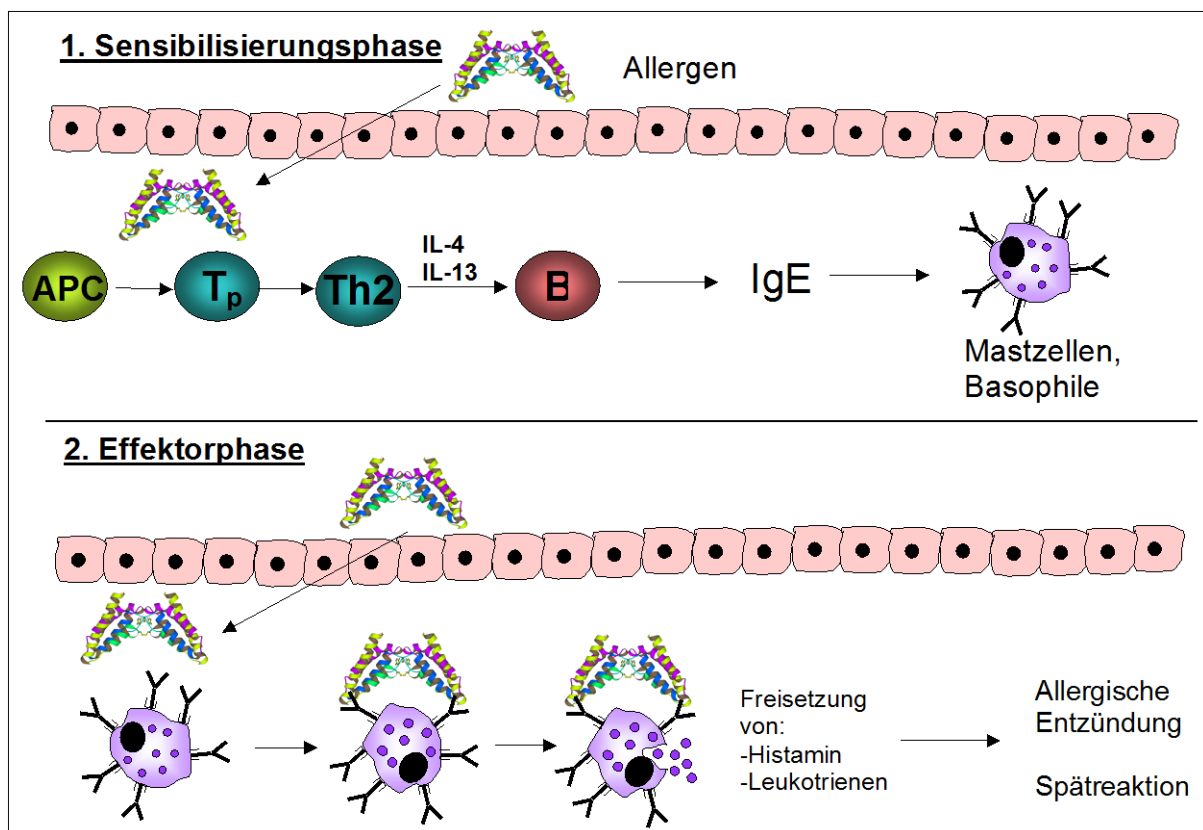
Durchgeführt von der Experimentellen Pneumologie (Prof. Bufe)

In diesem Praktikum werden 2 Beispiele für die Messung/Beurteilung der allergischen Typ-I-Reaktion vorgeführt:

- 1) Einführung Typ I Allergie
- 2) „In-vitro“: Immunglobulin-E (IgE) Bestimmung im Serum (S. 6-12)
- 3) „In-vivo“: Allergen-Pricktest auf der menschlichen Haut (S. 13-16)

Einleitung:

Typ I-Allergie: IgE-vermittelt, richtet sich gegen lösliche Antigene (allergische Sofortreaktion)

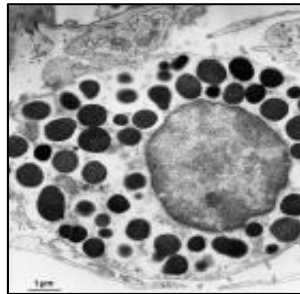
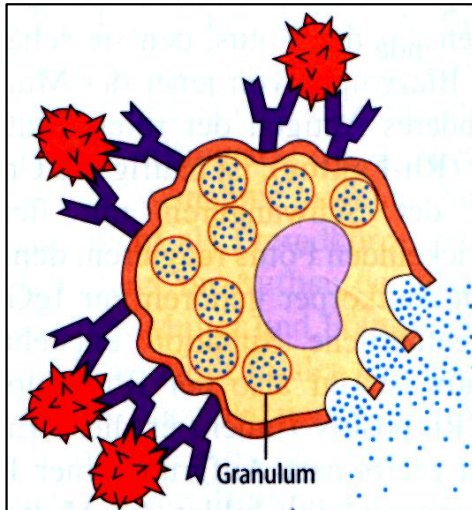


Dieses Schema zeigt den Ablauf einer Typ I-allergischen Reaktion.

Zunächst wird in der Sensibilisierungsphase unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 aus Th2-Zellen (T-Helfer Zellen, Typ 2) Allergen-spezifisches IgE gebildet. Hoch-affine Rezeptoren für IgE (Fc ϵ RI) finden sich v.a. auf Mastzellen (Gewebe) und Basophilen Granulozyten (Blut). Diese hochaffinen Rezeptoren für IgE binden zuverlässig alle IgE-Moleküle aus dem Serum.

Der nächste Schritt in der allergischen Reaktion ist nun durch die Effektorfunktion der Mastzellen bedingt. Wenn zwei Membran gebundene IgE-Antikörper gleichzeitig ein Allergen binden, so werden diese Rezeptoren „kruzvernetzt“. Dadurch wird ein

Signal ins Zellinnere weitergeleitet, das die Zelle dazu bringt, ihre Mediatoren, die in Granula gespeichert in der Zelle vorliegen, auszuschütten. Der Inhalt dieser Granula ist für die eigentliche allergische Reaktion verantwortlich:



EM-Aufnahme einer Mastzelle

Degranulation einer Mastzelle/eines basophilen Granulozyten nach Kreuzvernetzung der Rezeptoren durch ein Allergen

Wirkung der verschiedenen Mediatoren:

Histamin	Erhöhung der Durchblutung und der Gefäßdurchlässigkeit	Rötung, Quaddelbildung, Juckreiz
Proteasen	Gewebeschäden	Umbau der Bindegewebsmatrix
Lipidmediatoren	Kontraktion der glatten Muskulatur, Schleimsekretion	Bronchiokonstriktion

Es gibt hauptsächlich zwei Aufenthaltsorte für Mastzellen: Die Schleimhaut-Mastzellen sitzen unterhalb der Schleimhäute der Atemwege und des Magen-Darmtraktes, die Bindegewebsmastzellen im durchbluteten Bindegewebe. Die Reaktion des Organismus hängt v.a. davon ab, welche Mastzellen aktiviert werden.

Unter der Haut aktivierte Bindegewebsmastzellen führen zu einer lokalen Entzündungsreaktion (Ödeme, Anlocken von Entzündungszellen).

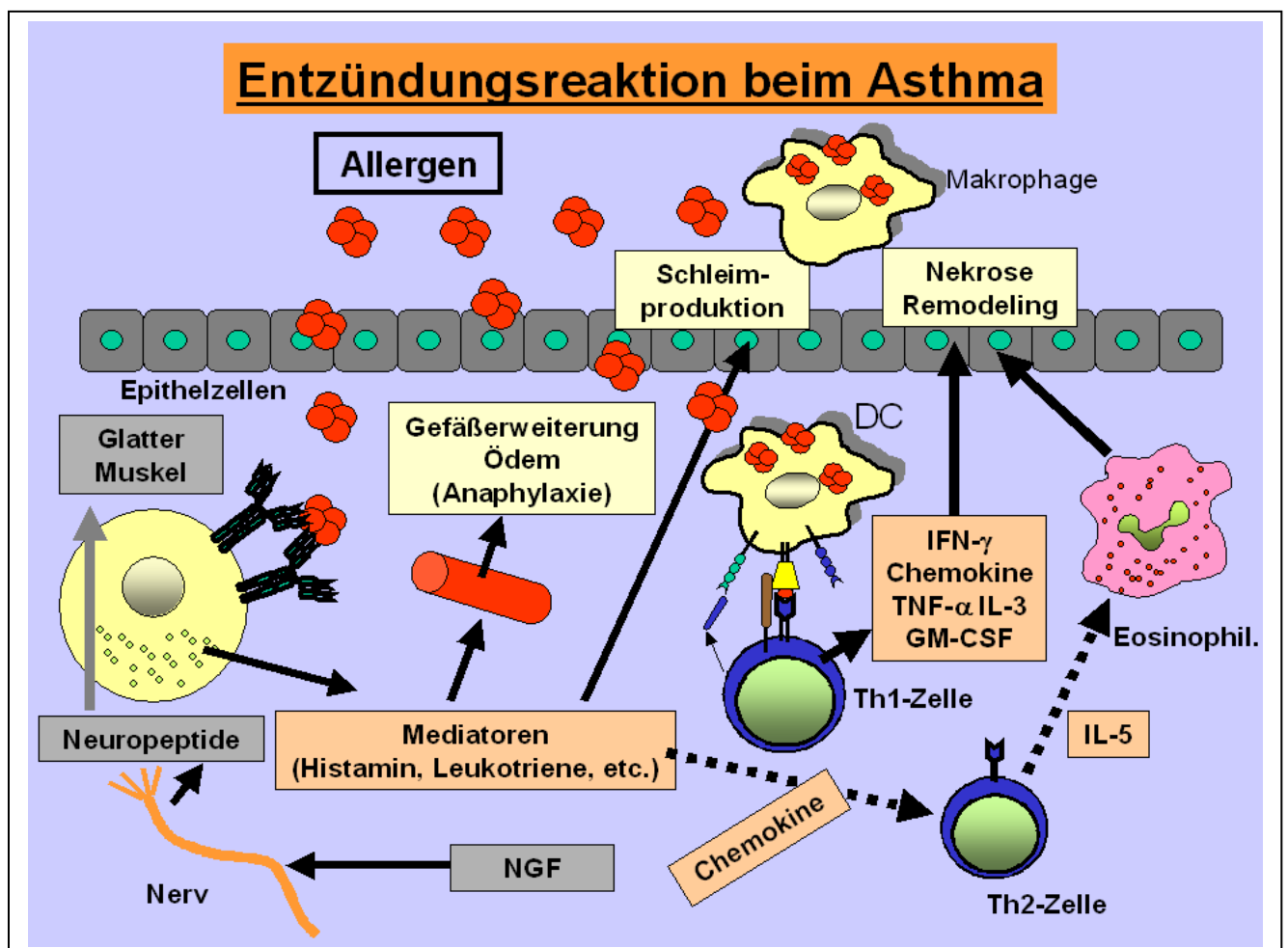
Über die Atemwege aufgenommene Allergene aktivieren die Schleimhautmastzellen in der Lunge und den oberen Atemwegen, und es kommt zu vermehrter Schleimbildung, dem Influx von Entzündungszellen mit Schwellung der Schleimhaut, damit Verengung der Atemwege und letztlich auch dem Zusammenziehen der glatten Muskulatur mit der Folge einer Überempfindlichkeit der Atemwege für unspezifische

Reize wie Kälte, Schadstoffe, Methacholin etc. Das ganze nennt man dann Asthma bronchiale.

Allergene aus der Nahrung aktivieren die Schleimhautmastzellen im Verdauungstrakt, es kommt zu Durchfall und Erbrechen. Außerdem werden sie mit dem Blut im Körper, besonders in der Haut, verteilt und führen zu Nesselsucht (Urtikaria).

Allergene im Blut (z.B. Insektengift) aktivieren Bindegewebsmastzellen im ganzen Körper und basophile Granulozyten. Wenn es zur systemischen (körperweiten) Freisetzung von Histamin kommt, bewirkt dies eine sog. systemische Anaphylaxie (anaphylaktischer Schock). Durch plötzliches Versacken von Flüssigkeiten in der Peripherie sinkt der Blutdruck akut ab, und es kann begleitend zur Hypotonie zur Tachykardie, zum Sauerstoffmangel und sehr schnell zur Bewusstlosigkeit und dem Tod führen.

Spätreaktion: Durch die Aktivität der von Mastzellen freigesetzten Leukotriene und IL-8 werden Th2-Zellen in den Bereich der Entzündung gelockt, die ihrerseits IL-5 freisetzen und so Eosinophile Zellen anlocken. Diese Spätreaktion kommt erst 8-24h nach der ersten Sofort-Reaktion zustande. Die Eosinophilen Zellen setzen Eosinophiles Kationische Protein (ECP) und Major basic protein (MBP) frei. ECP ist einer Rnase, MBP eine Protease. Beide schädigen direkt das bronchiale Epithel. Des weiteren werden auch Th1 Zellen angelockt, die über Interferon-Gamma Freisetzung die lokalen Makrophagen stimulieren. Diese versuchen so die Allergene abzubauen. Die weitere Aktivierung der Th1-Zellen sorgt aber auch für den Umbau der Mukosazellen zu Fibroblasten, sogenanntes Remodelling als langfristige Folge beim Asthma. Th1-Zellen setzen auch neural growth factor (NGF) frei. So werden die Nervenzellen zur Freisetzung von Neuropeptiden angeregt, die ihrerseits die glatte Muskulatur überempfindlich und reizbar machen.

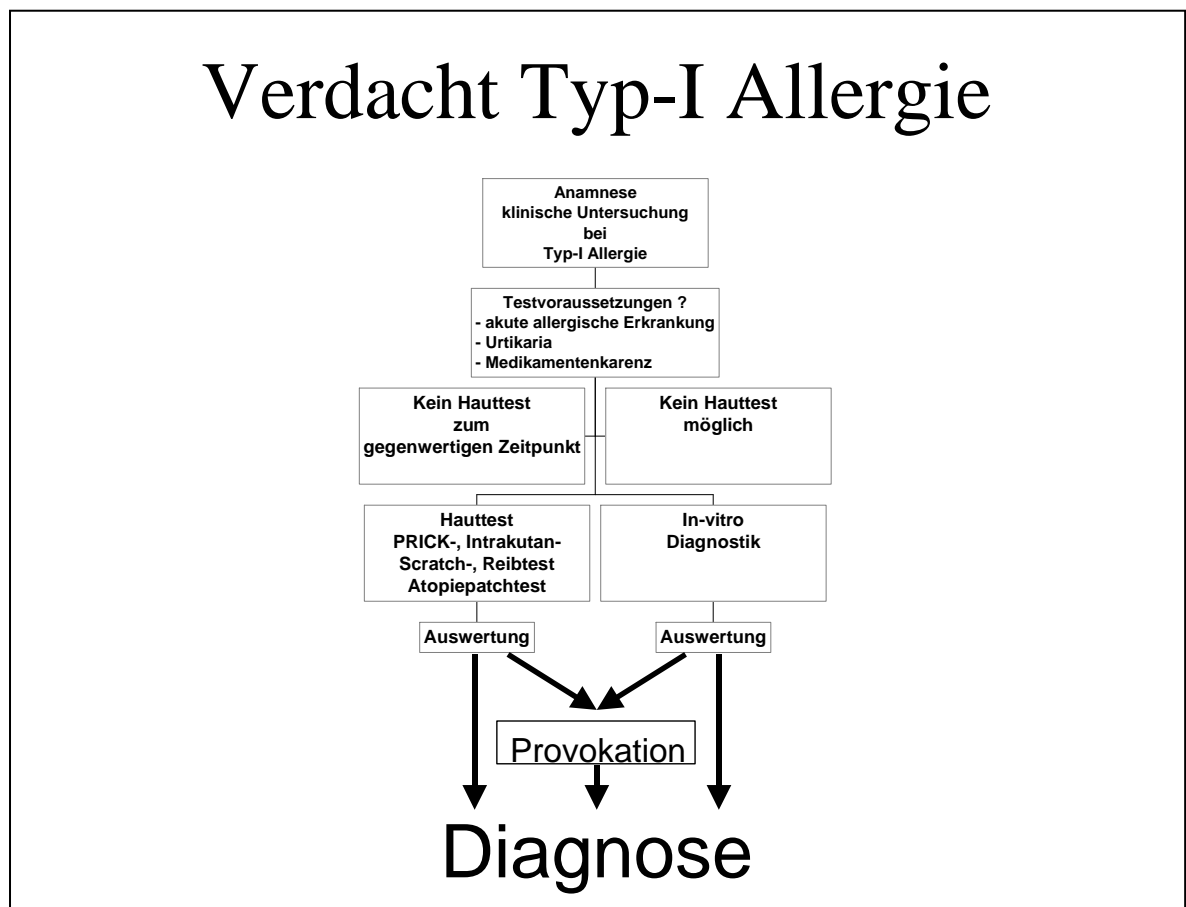


Allgemeine Kriterien für die Allergiediagnostik

Für die Diagnostik bei dem Verdacht auf eine Allergie bestehen grundsätzliche Kriterien, die in dem unten dargestellten Flussdiagramm zusammengefasst sind.

Den wichtigsten Teil bestimmt die Krankengeschichte, die Anamnese, mit der durch Dokumentation der Art und des Verlaufs der Symptome, die Dauer derselben, ihre Stärke und die klinische Beeinträchtigung die Basis für die weitere Diagnostik gelegt wird. Besteht der dringende Verdacht auf eine Typ-I Allergie, müssen die Testvoraussetzungen für einen Hauttest geprüft werden. Besteht keine Kontraindikation, wird ein Hauttest (PRICK-, Intrakutan-, Scratch-, Reibe-, Atopiepatchtest. Ist ein Hauttest zur Zeit oder überhaupt nicht möglich, ist der Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern indiziert (in-vitro-Diagnostik). In Einzelfällen kann mal ein Basophilen-Freisetzungstest notwendig sein. Wenn Hauttestung möglich ist, kann der IgE-Nachweis auch nötig sein, wenn der Befund nicht eindeutig ist oder im Widerspruch zur Anamnese steht.

Sollten beide Untersuchungen keine eindeutige Zuordnung der Symptome zu einer Typ-1 Allergie ermöglichen, wird eine Provokationstestung am Erfolgsorgan empfohlen: oculäre, nasale oder gar bronchiale Provokation. Hierfür gibt es vorgeschriebene Verfahrensweisen, die in den einschlägigen Lehrbüchern nachgelesen werden können.



IgE-Messung:

Allgemeines

Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE) kommen im Serum im Vergleich zu den anderen Immunglobulinklassen in wesentlich geringerer Konzentration vor. Sie besitzen die Fähigkeit, über die Bindung an selektive hoch- oder niedrig affine zelluläre Rezeptoren spezifische Reaktionen des Immunsystems auszulösen. Sie unterscheiden sich strukturell von IgG-Antikörpern durch eine zusätzliche sog. CH-Region der konstanten Region der schweren Kette.

Für die Erstellung der Standardkurve zur Bestimmung des Gesamt IgE ist ein internationaler WHO-Standard verfügbar und ermöglicht eine absolute Konzentrationsbestimmung von Gesamt IgE.

Indikation

- Im Zusammenhang mit der Bestimmung von spezifischem IgE: als Hinweis für das Vorliegen einer atopischen Disposition in Verbindung mit dem spezifischen IgE, als Interpretationshilfe für die Beurteilung der spezifischen IgE-Titer
- in besonderen Fällen zur ergänzenden Diagnostik von Erkrankungen, die mit Atopie assoziiert sein können: Urtikaria, Quincke-Ödem, eosinophile Gastroenteritis, unklare Exantheme, Verdacht auf Arzneimittel-Allergien.
- bei weiteren Erkrankungen im Rahmen der Differenzialdiagnostik: (bei eosinophilen Lungeninfiltraten, allergischer Alveolitis (z. B. bei Farmerlunge oder Taubenzüchterkrankheit) oder Vaskulitiden wie der Wegenerschen Granulomatose und dem Churg-Strauss-Syndrom.)
- zur Diagnostik und Therapiekontrolle: bei Parasitosen, besonders bei unklarer Bluteosinophilie und negativem Parasitenbefund, z. B. Filariose, Trichinose, Toxocariasis, Capillaria philippensis, tropische Eosinophilie.
- im Rahmen der Diagnostik angeborener oder erworbener Immundefekte: T-Zell-Defekte oder Hyper-IgE Syndrom.

Das Gesamt-IgE kann in Serum, Plasma oder Sekreten untersucht werden.

Verfahren:

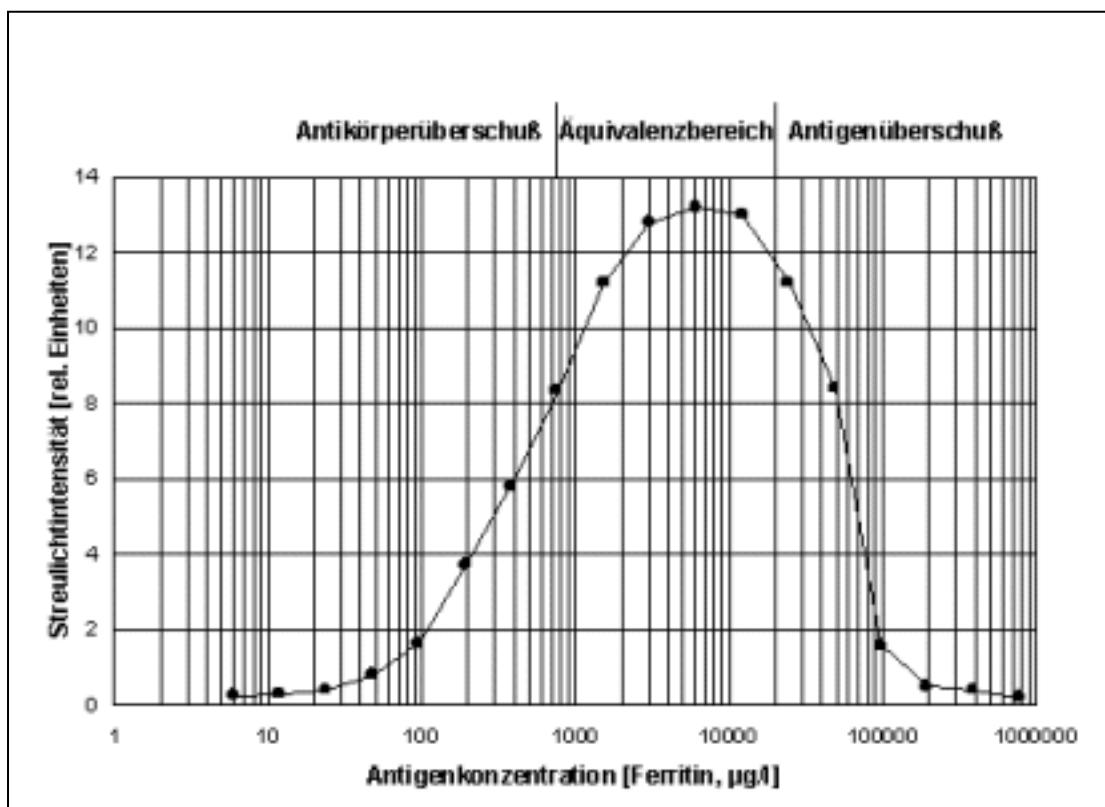
- Nephelometrie
- Immunoassays mit kompetitiven oder immunometrischen Verfahren und Anwendung eines Enzym-, Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder radioaktiv markierten Anti-IgE-Reaktionspartners

Nephelometrie

Serum wird mit einem Anti-IgE Antikörper inkubiert. Es bilden sich „IgE-Anti-IgE-Komplexe“ in der Lösung. Die Antigen-Antikörper-Reaktion führt zur Bildung von Immunaggregaten, die nach Größe und Anzahl Licht streuen und bei höheren, ausgeglichenen Konzentrationen von Antigen und Antikörper präzipitieren Als Maß der Aggregatbildung kann man:

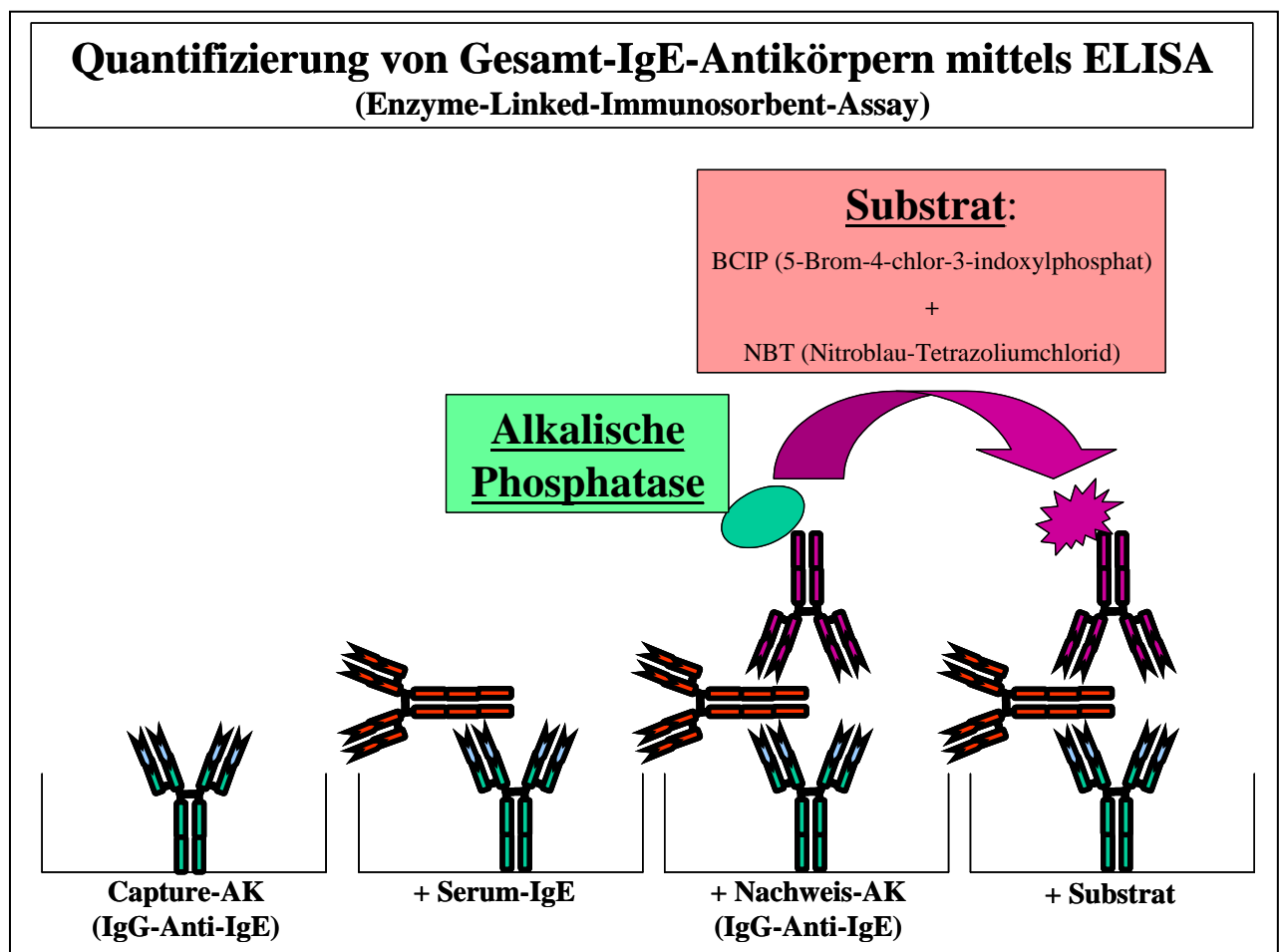
die Trübung der Lösung im durchfallenden Licht (Turbidimetrie, Trübungsmessung) analog der Absorptionsphotometrie messen, oder

die Intensität des Streulichts unter einem bestimmten Winkel zur Einfallrichtung des Lichts (**Nephelometrie**, Streulichtmessung) analog zur Fluorometrie.



Immunometrische Verfahren (Enzyme Linked Immunosorbent Assay / ELISA)

IgG-Anti IgE Antikörper werden an eine Mikrotiterplatte gekoppelt, die spezifisch IgE erkennen. Serum wird hinzugegeben. Die IgE-AK binden an den „Capture-AK“. Es wird gewaschen, die IgE-AK bleiben gebunden. Jetzt wird ein weiterer Anti-IgE-AK hinzugefügt, der das IgE aus dem Serum erkennt. Dieser „Nachweisantikörper“ hat ein Enzym, z.B. alkalische Phosphatase gekoppelt. Durch Substratzugabe, in diesem Fall ein Farbstoff, wird derselbe enzymatisch modifiziert und nimmt eine Farbe an, hier blau. Die Intensität der Farbe, gemessen mit einem Photometer ist proportional der nachgewiesenen IgE Antikörper.



Nachweis von Allergen-spezifischem IgE

Allgemeines

Spezifisches IgE beschreibt diejenige Fraktion der gesamten IgE-Antikörper im Serum, deren Spezifität gegenüber bestimmten Allergenen mit Hilfe von *in-vitro* Testverfahren bestimmt werden kann. Der Nachweis von sIgE bedeutet, dass eine spezifische Sensibilisierung gegenüber entsprechenden Allergenen vorliegt. Es muss anschließend überprüft werden, ob die gefundene Sensibilisierung von klinischer Relevanz ist. Das sIgE ist damit nur ein Parameter in der klassischen allergologischen Stufendiagnostik: Anamnese - Hauttestung - Laboruntersuchung - Provokation.

Die Qualität (z.B. Epitopmuster, Reinheitsgrad) der verwendeten Allergene spielt für die Bestimmung des spezifischen IgE eine zentrale Rolle.

Indikation

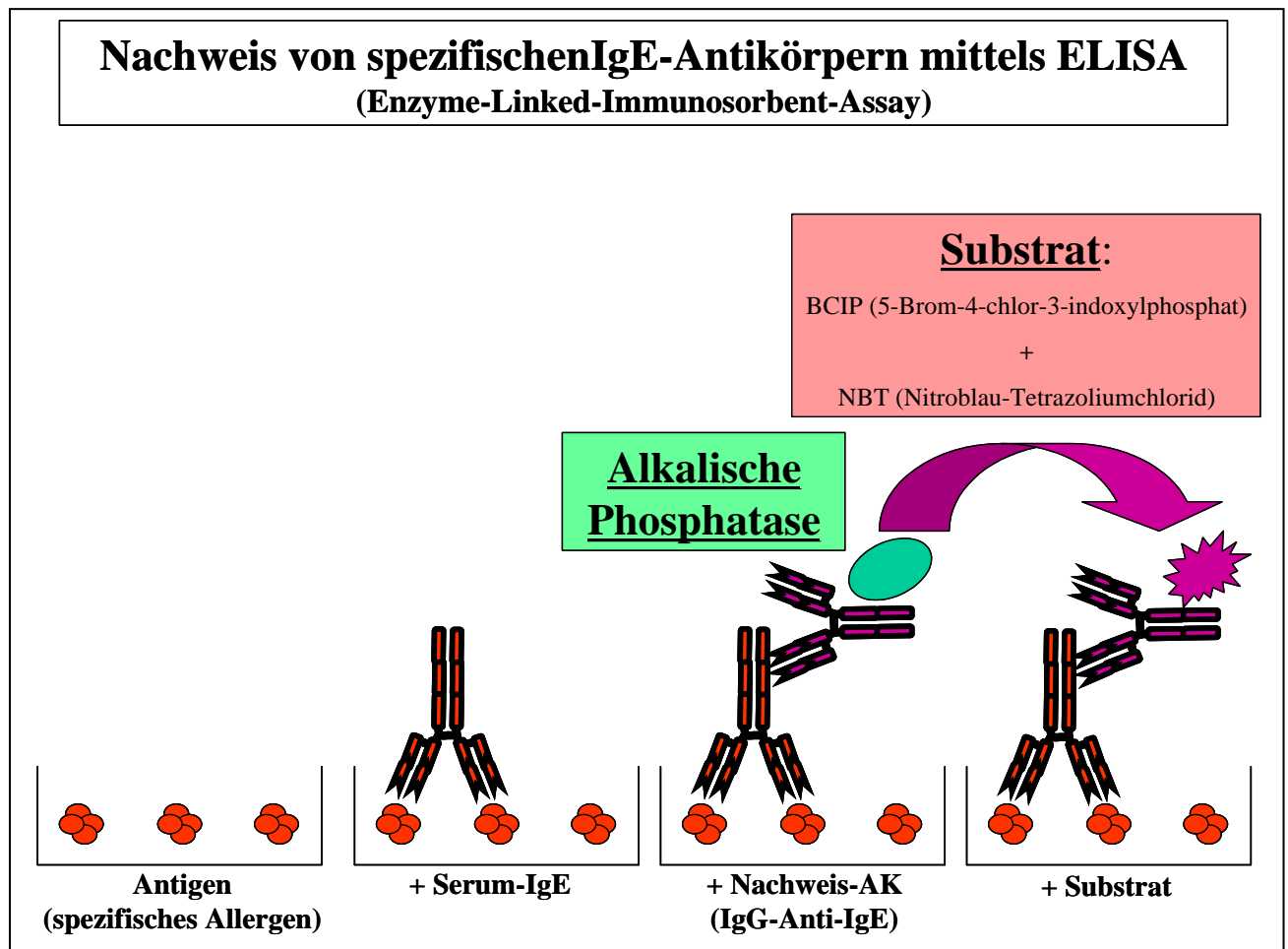
Die Bestimmung von sIgE im Serum und die Hauttestung sind in der Allergie-Diagnostik grundsätzlich als gleichwertig zu betrachten.

Zur Bestimmung des sIgE werden primäre und sekundäre Indikationen unterschieden. Der primäre Nachweis von sIgE, d.h. Bestimmung vor anderen diagnostischen Maßnahmen wie der Hauttestung, ist indiziert bei:

Nachweismethoden

Es existieren zahlreiche Methoden zur Bestimmung des sIgE, die auf ähnlichen Prinzipien beruhen: spezifische Allergenextrakte und teils verfügbare rekombinante Allergene werden entweder an eine feste Phase gekoppelt oder als Flüssigallergene eingesetzt, an die Immunglobuline mit entsprechender Spezifität nach Inkubation binden (12). Im Falle der Verwendung von Festphasen sollten deren Oberfläche eine ausreichende Menge Aufnahme und eine Qualität der Allergene sicherstellen, so dass im Idealfall die Gesamtheit des sIgE gebunden werden kann. Nach Entfernen der ungebundenen Immunglobuline werden in einem anschließenden Inkubationsschritt radioaktiv, mit Fluoreszenz markierte oder enzymgekoppelte anti-IgE-Antikörper (AK) zugesetzt. Die gebundenen anti-IgE-Antikörper werden entweder durch direkte Bestimmung der Radioaktivität, der Fluoreszenzintensität oder nach Zusatz eines Substrats durch die Messung der enzymatisch eingeleiteten

Farbreaktion nachgewiesen. Die Quantifizierung gelingt durch eine auf bekannte sIgE-Mengen bezogene Eichkurve. Dabei werden eine dem WHO-Standard für Gesamt-IgE Werte angepasste Eichkurve zur Bestimmung der sIgE-Werte zugrunde gelegt oder künstlich-definierte Einheiten verwendet. Somit ist bis heute eine echte Quantifizierung des sIgE im eigentlichen Sinne nicht möglich.



Schnelltest zum Nachweis des spezifischen IgEs (Allergodip)

Einführung

Der Allergodip ist ein Test, mit dem auf einem Streifen spezifische IgE-Antikörper im Serum für bis zu neun verschiedene Allergene nachgewiesen werden kann. Der Test ein sogenannter Streifentest und damit lediglich semi-quantitativ. Am Ende gibt eine Farbskala die Möglichkeit Stärken von 0 bis 4 zu unterscheiden. Die verschiedenen Allergene sind nebeneinander auf Dextranmembran fixiert und können so von den variablen Regionen der AK detektiert werden. Der Nachweis der spezifischen Bindung der IgE-AK erfolgt mit einem sekundären Nachweis-AK der Klasse IgG, der selber im Bereich der konstanten Region ein Enzym gekoppelt hat, welches im dritten Schritt proportional zur Enzymkonzentration den Substratumsatz eines Farbstoffes induziert.

Testdurchführung:

1. Dipstick in das erste Teströhrchen mit der Patientenprobe (Serum oder Plasma) stellen. Alle Pads müssen mit Flüssigkeit bedeckt sein.

Inkubation: 3 STUNDEN

2. Dipstick entnehmen und unter kaltem, kräftigem Wasserstrahl waschen.

Waschen: 2 MINUTEN

3. Den abgespülten Dipstick in das zweite Teströhrchen mit Reagenz 1 stellen (Enzym gekoppelter 2.AK);

Inkubation: 18-20 STUNDEN

HIER BEGINNT DER PRAKTISCHE EINSTIEG DER STUDENTEN/INNEN

4. Drittes Teströhrchen bis zur Markierung mit Reagenz 2 aus der Tropfflasche füllen.

5. Dipstick aus dem zweiten Teströhrchen entnehmen und unter kaltem, kräftigen Wasserstrahl waschen.

Waschen: 2 MINUTEN

6. Den abgespülten Dipstick in das dritte Teströhrchen mit Reagenz 2 stellen.

Inkubation: 90 MINUTEN

7. Dipstick entnehmen und zwischen gefaltetem, saugfähigem Papiertuch trockentupfen.

8. Testfärbung mit der Farbskala vergleichen (Klasse 0-4) und den Dipstick auf der Papierkarte fixieren.

Dokumentation:

Testdatum:

Name der Testperson:

Ergebnisse:

Positivkontrolle: _____

Negativkontrolle: _____

Hausstaubmilbe (*D. pteron.*): _____

Schimmelpilz (*Alternaria tenuis*): _____

Katzenepithelien: _____

Hundepithelien: _____

Wegerichpollen: _____

Beifußpollen: _____

Birkenpollen: _____

Roggenpollen: _____

6-Gräserpollen-Mischung: _____

Gesamtbefund:

Interpretation

Prick-Test

Zusammenfassung

Das Prinzip der Hauttests bei IgE-vermittelter Soforttyp-Allergie besteht darin, das Allergen an die in der Dermis liegenden, IgE-Antikörper tragenden Mastzellen heranzubringen. Bei Mastzellaktivierung kommt es zu einer Freisetzung von Mediatoren; die im wesentlichen durch Histamin ausgelöste sichtbare Testreaktion zeigt sich als Quaddel und Rötung.

Die Indikation zum Hauttest ergibt sich bei Verdacht auf eine allergische Erkrankung vom Soforttyp. Systemische Reaktionen bei Hauttests sind sehr selten. Für diesen Fall muß eine Notfallversorgung verfügbar sein. Kontraindikationen sind Hautkrankheiten im Testfeld, ein deutlich beeinträchtigter Allgemeinzustand, schweres, therapeutisch nicht adäquat eingestelltes Asthma bronchiale. Für Tests, die mit dem erhöhten Risiko einer systemischen anaphylaktischen Reaktion behaftet sind, gelten eine Behandlung mit Betablockern oder Schwangerschaft als weitere Kontraindikationen. Im Einzelfall kann es aber erforderlich sein, Hauttests trotz Vorliegen von Kontraindikationen durchzuführen.

Hauttests können in jedem Lebensalter vorgenommen werden. Auswaschphasen von das Testergebnis möglicherweise verfälschenden Arzneistoffen sowie eine Refraktärperiode von etwa einer Woche nach einer akuten anaphylaktischen Reaktion sind zu berücksichtigen.

Der Pricktest ist die Methode der ersten Wahl. Der Intrakutantest ist sensitiver als der Pricktest und soll vor allem dann vorgenommen werden, wenn der Pricktest unauffällig ist.

Die Tests werden an der Volarseite der Unterarme durchgeführt, beim schmerzhafteren Intrakutantest ist auch der weniger empfindliche Rücken geeignet.

Zunächst sollen immer Tests mit standardisierten Extrakten vorgenommen werden. Auf andere Testsubstanzen soll nur dann ausgewichen werden, wenn standardisierte Testallergene nicht verfügbar sind oder Tests mit ihnen nicht weiterführend waren. Kommt es zu einer Testreaktion gegen selbst zubereitetes

Testmaterial, so müssen Kontrollpersonen mitgetestet werden, um unspezifische Reaktionen auszuschließen.

Die Ablesung erfolgt nach 15 bis 20 min. Als positive Testreaktion gilt beim Pricktest ein mittlerer Quaddeldurchmesser von > 3 mm, beim Intrakutantest von > 5 mm.

Trotz bestehender allergischer Reaktionslage können Hauttests negativ sein. Im Fall einer positiven Testreaktion sind durch Bezug auf die Anamnese und ggf. durch Provokationstests klinisch relevante von irrelevanten Testreaktionen zu unterscheiden. Aus einer klinisch stummen Sensibilisierung ergibt sich in aller Regel keine praktische Konsequenz.

Untersuchungsbedingungen:

Prick-Tests werden in der Regel an den Innenseiten der Unterarme, bzw. auf dem Rücken durchgeführt. Eine spezielle Hautreinigung bzw. Desinfektion vor dem Test ist nicht notwendig, es sei denn, die Haut ist sehr fettig (z.B. durch Creme). In diesem Fall sollte man sie vorher reinigen, da sonst die Allergenlösungen auf der Haut verlaufen. Das Hauttestareal sollte frei von krankhaften Veränderungen sein, was besonders bei Patienten mit Neurodermitis zu beachten ist. Als Testlösungen werden meist chemisch hergestellte Allergenextrakte benutzt. Man kann jedoch auch bei Nahrungsmitteln das Prick-to-Prick Verfahren anwenden, d.h. man prickt mit der Lanzette zuerst in das Nahrungsmittel und dann in die Haut.

Durchführung des Tests:

1. **Dokumentationsbogen ausfüllen.** Hier sollte genau vermerkt werden, was getestet wurde, von wem und wann bei welchem Patienten. Wir verwenden im Praktikum folgende Allergene: Gräser, Bäume, Katze, Milbe sowie NaCl 0,9%ig als Negativ-Kontrolle sowie Histamin als Positiv-Kontrolle.
2. **Den Arm beschriften.** Dabei sollte die Beschriftung unbedingt mit der Beschriftung auf der Flasche mit der Allergenlösung übereinstimmen, um Verwechslungen zu vermeiden. Bei niedrigen Außentemperaturen sollte der Patient ca. 20 Minuten bei Zimmerwärme bis zur Testung warten, um in der Haut einen normalen Durchblutungszustand zu sichern.
3. **Die Tropfen auftragen.** Der Abstand der Tropfen sollte mindestens 3 cm betragen und die Tropfen sollten am besten versetzt aufgetragen werden, um bei großflächigen Reaktionen unterscheiden zu können, von welchem Allergen sie stammen. Vom Handgelenk und Ellenbeuge wird ebenfalls ein Abstand von ca. 3 cm eingehalten. Allergenextrakte, die mehr als 6 Wochen über dem Verfallsdatum sind, sollten nicht mehr benutzt werden, da die Wirksamkeit herabgesetzt sein kann. **Wichtig:** Wenn in einem Prick-Test Allergene von unterschiedlichen Firmen benutzt werden, sollten auch Negativ und Positiv-Kontrolle der jeweiligen Firma benutzt werden.
4. **Pricken.** Dazu eine spezielle Prick-Lanzette benutzen. Diese haben eine 1 mm lange Spitze, mit der nur eine oberflächliche Hautverletzung gesetzt wird. Pro Einzeltest sollte eine neue Lanzette benutzt werden, um Allergenverschleppungen zu vermeiden. Zu jedem Test gehört eine Negativ-Kontrolle (Kochsalz), um falsch positive Befunde auszuschließen (diese muss immer negativ sein), und eine Positiv-Kontrolle (Histamin), die notwendig ist, um zu sehen, ob die Hautreagibilität herabgesetzt ist (z.B. bei Antihistaminika-Einnahme). Bei Einnahme von Antihistaminika sollte das Medikament ca. 1 Woche vor dem Test abgesetzt werden, da sonst der Test nicht funktioniert. Die Positiv-Kontrolle muss immer positiv sein. Zum „pricken“ mit der Lanzette kurz und mit gleichem Druck senkrecht durch den Tropfen stechen. Nach 15 Minuten kann der Test abgelesen werden.

5. **Beurteilung.** Es wird nur die Quaddel, nicht die Hautrötung bewertet, der Durchmesser der Quaddel wird in mm notiert. Der Test ist dann positiv, wenn die Quaddel größer oder gleich der Histaminquaddel ist. Ist die Quaddel ungleichmäßig in ihrer Form, werden jeweils die Breite und die Höhe in mm gemessen und notiert. Hautrötung und Quaddel verschwinden ca. 30 Minuten nach dem Test von selbst.

6. **Kontraindikationen.** Schwangerschaft. Während akuter Infektionen und akuter allergischer Reaktionen (jeweils 1 Woche Abstand). Wenn durch Medikamenteneinwirkung eine verminderte Reaktionsbereitschaft besteht (Antihistaminika-1 Woche, lokale Steroide im Testareal-2-3 Wochen, hochdosierte orale Steroide-Test nicht möglich, Betamimetika-24 Stunden).

DOKUMENTATION der Befunde auf Extrabögen