

Möglichkeiten und Grenzen der *in-vitro*-Diagnostik bei der ASS-Intoleranz

Pfaar O, Dollner R, Klimek L, Hörmann K

Oliver Pfaar

Zentrum für Rhinologie und Allergologie der

Universitäts-Hals-Nasen-Ohrenklinik Mannheim,

Ruprecht-Karls-Universität, Mannheim-Heidelberg

An den Quellen 10

65183 Wiesbaden

Telefon: 0611-890 43 81

Telefax: 0611-890 43 82

Email: oliver.pfaar@hno-wiesbaden.de

Abstract

Überempfindlichkeitsreaktionen auf Acetylsalicylsäure und andere nicht-steroidale Antiphlogistika („Analgetika-Intoleranz“) sind in Kombination mit einer Polyposis nasi und einem Asthma bronchiale unter dem Begriff „Samter-Trias“ (Morbus Samter) bekannt. Die Erkrankung wird heute als eine progrediente, nicht-allergische (nicht IgE-medierte) Überempfindlichkeitsreaktion verstanden, die durch eine Dysbalance im Arachidonsäure-Metabolismus bedingt ist.

Durch die Einnahme von COX-I-Inhibitoren kommt es zu einer überschießenden Leukotrienproduktion sowie zu einer verminderten Gegenregulation durch Prostaglandin E₂ und hierdurch zu anaphylaktischen Reaktionen. Als Goldstandard in der Diagnostik der AIT gelten Provokationstests (oral, bronchial, nasal). Diese bedingen allerdings mögliche Komplikationen und sollten daher nur spezialisierten Zentren vorbehalten sein.

Seit Anfang der 90er Jahre wurden zudem in Kenntnis der pathophysiologischen Mechanismen dieser Erkrankung verschiedene *in-vitro*-Testverfahren entwickelt. Diese lassen sich in 3 methodisch unterschiedliche Gruppen gliedern: Mediator-Freisetzungstests, durchflusszytometrische Verfahren sowie kombinierte Testverfahren („Hybrid-Verfahren“, bestehend aus einer Kombination von Mediator-Freisetzungstest und Durchflusszytometrie).

Dieser Artikel gibt eine Übersicht über die verschiedenen *in-vitro*-Testverfahren, die bei der Diagnosefindung der AIT zur Anwendung kommen, sowie über Sensitivität und Spezifität der einzelnen Methoden anhand der derzeit vorliegenden Studienlage

Schlüsselwörter:

Aspirin-Intoleranz, Analgetika-Intoleranz, *In-vitro*-Testverfahren, Aspirin, CAST, Flow-CAST, ASPITest, AIT, CAST-Combi

Key words

Aspirin intolerance, AERD, in vitro testing, Aspirin, CAST, Flow-CAST, ASPITest, AIT, CAST-Combi

Einleitung

Die Acetylsalicylsäure-(ASS-)unverträglichkeit wurde bereits kurz nach Einführung von Aspirin® im Jahre 1899 durch Hirschberg als anaphylaktoide Reaktion beschrieben⁽¹⁾. Im Jahre 1922 berichteten Widal und Kollegen, dass ASS-Unverträglichkeit, nasale Polypen und Asthma bronchiale häufig gemeinsam auftreten⁽²⁾. Neben ASS, einer klassischen Salicylatverbindung, gehören zahlreiche andere Wirkstoffverbindungen (Pyrazolone, Antranilsäure-, Arylessigsäure-, Arylpropionsäure-, Oxicam- und Quinazolinonderivate) ebenfalls zur Gruppe der Cyclooxygenasehemmer und somit zu den nichtsteroidalen Antiphlogistika (engl. nonsteroidal anti-inflammatory drugs: NSAID).

Das Analgetika-Intoleranz-Syndrom (AIS) ist ein Symptomenkomplex, der meist mit nasalen Beschwerden wie Obstruktion, Rhinorrhoe, Hyposmie und einer rezidivierenden Polyposis nasi beginnt⁽³⁾. Im weiteren Verlauf können ein - in der Regel steroidpflichtiges - nicht allergisches Asthma bronchiale mit schweren Asthma-Anfällen nach der Einnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika hinzu kommen. Das Zusammentreffen von Acetylsalicylsäure-Unverträglichkeit, Polyposis nasi und Asthma bronchiale wird als Aspirin®-Trias oder Morbus Widal⁽²⁾, im angloamerikanischen Sprachgebiet als Samter's syndrome oder Samter's trias bezeichnet⁽⁴⁾. Darüber hinaus existiert auch eine kutane Form der Analgetikaintoleranz mit Urtikaria und Angioödem⁽⁵⁾.

Die Prävalenz der Analgetika- (Aspirin®-) Intoleranz in der Normalbevölkerung wird mit 0,5 bis 5,7% angegeben, bei Asthmatikern steigt die Zahl auf ca. 15%. Frauen sind häufiger (60-70%) von Analgetikaintoleranz betroffen als Männer, die Erkrankung kommt familiär gehäuft vor^(3;6;7). Darüber hinaus scheint die Dunkelziffer der Analgetika-Intoleranz hoch zu sein: in einer Studie der European Network of

Aspirin-induced Asthma⁽⁸⁾ mit 500 Asthma-Patienten ließ sich die bis dahin unbekannte Analgetika-Intoleranz bei 18% im Provokationstest nachweisen. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer Sinusitis konnte die Erkrankung sogar bei 34% nachgewiesen werden⁽⁸⁾.

Bei der Diagnosefindung gelten Provokationstests mit NSAIDs als Goldstandard und ein positives Testergebnis bildet die Grundlage der einzigen kausalen Therapiemöglichkeit, der sog. adaptiven Desaktivierung (AD)⁽⁵⁾. In einem Positionspapier der European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) sind Protokolle zur nasalen, oralen und bronchialen Provokation beschrieben worden⁽⁹⁾. Allerdings ist die Durchführung dieser Testungen spezialisierten Zentren mit intensivmedizinischem Hintergrund vorenthalten, da diese zum Teil sehr starke anaphylaktische Reaktionen ausbilden können.

Aus diesem Grund wurden in den letzten 15 Jahren funktionelle *in-vitro*-Testverfahren als mögliche Alternative zu den Provokationstests entwickelt mit dem Ziel, ex vivo auf zellulärer Ebene Intoleranzreaktionen gegen NSAIDs nachzuweisen⁽¹⁰⁾.

Pathophysiologie

Das ASS-Intoleranz-Syndrom (AIS) beruht nach derzeitigem Wissensstand nicht auf einem IgE-vermittelten Mechanismus, sondern auf Dysbalancen im Arachidonsäure-Stoffwechsel, welche durch die Aufnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) oder von Salicylaten aus der Nahrung verstärkt werden⁽¹¹⁾.

Arachidonsäure wird mittels Phospholipasen aus den Phospholipiden der Zellmembranen von Eosinophilen, Mastzellen und Leukozyten bereitgestellt. Über

Lipoxygenase und Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) werden wahlweise zwei Stoffwechselwege beschriftet, deren Produkte z. T. antagonistisch wirken (Abb .1). Über den "Cyclooxygenase-1-Stoffwechselweg" werden Prostaglandine gebildet, wie z.B. das Prostaglandin E₂ (PGE₂), welches broncho- und vasodilatativ wirkt⁽¹²⁾. Der "Cyclooxygenase-2-Stoffwechselweg" spielt in diesem Zusammenhang keine entscheidende Rolle, so dass die Patienten mit AIS in der Regel selektive COX-2-Inhibitoren gut vertragen⁽¹³⁾.

Über den "Lipoxygenase-Stoffwechselweg" werden peptid-Leukotriene (pLT) gebildet, die einen Bronchospasmus und eine verstärkte Schleimbildung bewirken. Die Bildung von pLT wird wiederum durch das PGE₂ über einen cAMP-bedingten Mechanismus gehemmt, daher wird PGE₂ in diesem Zusammenhang auch als broncho-protektiv angesehen⁽¹⁴⁾.

Bei Patienten mit einem AIS scheint zudem eine verstärkte Aktivität der Leukotrien C₄ (LTC₄)-Synthase vorzuliegen, was in der verstärkten Synthese von Peptid-Leukotrienen resultiert [28]. Bei diesen Patienten wurde nach Gabe von NSAIDs, die den Cyclooxygenase-Stoffwechselweg hemmen, ein sogenanntes „Shifting“ - ein ungebremster Wechsel - zum "Lipoxygenase-Stoffwechselweg " beschrieben⁽¹¹⁾.

Auf der Grundlage dieser pathophysiologischen Mechanismen bieten sich *in-vitro*-Tests zur Erfassung der charakteristischen Veränderungen des Arachidonsäure-metabolismus bei AIS als spezifische diagnostische Verfahren an. Die vorliegende Übersichtsarbeit stellt die verschiedenen methodischen Ansätze der *in-vitro*-Testverfahren dar und zieht einen Vergleich aufgrund der Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden⁽¹⁰⁾.

Testverfahren

Die aktuell verfügbaren *in-vitro* Testverfahren zur Diagnostik der ASA-Intoleranz lassen sich in drei methodisch unterschiedliche Gruppen gliedern: Mediator-Freisetzungstests, durchflusszytometrische Verfahren sowie kombinierte Testverfahren („Hybrid-Verfahren“, bestehend aus einer Kombination von Mediator-Freisetzungstest und Durchflusszytometrie).

a) Mediatorfreisetzungstest

Das Grundprinzip dieser Tests besteht darin, dass Leukozyten *ex-vivo* isoliert und *in-vitro* mit COX-1-Inhibitoren stimuliert werden und die dabei liberierten Mediatoren (als Marker der pathognomonischen Dysbalance des Arachidonsäure-Metabolismus) quantifiziert werden. Unterschiede finden sich bei den verschiedenen Testverfahren bezüglich der Auswahl der Marker-Mediatoren sowie in der Art der Quantifizierung. So haben die Auswahl der stimulatorischen Ko-Faktoren sowie deren Konzentration bei der Testung einen wesentlichen Einfluss auf die Testsensitivität und –spezifität. Unterschiede dieser Parameter finden sich allerdings auch in den publizierten Studien bei gleicher Basismethodik. Daher werden im folgenden nur die aktuellsten Studien als Referenz für die Testsensitivität und –spezifität herangezogen⁽¹⁵⁾.

Für einen der ältesten Mediatorenfreisetzungstests, den Histamin-Release-Assay (HRA), konnte als diagnostisches Verfahren bei der AIS nur eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 35% belegt werden⁽¹⁶⁾, so dass dieser Test für die Diagnostik der AIS nicht empfohlen werden kann⁽¹⁷⁾.

Zu den aktuell bedeutsamsten Mediatorfreisetzungstestverfahren sind der cellular allergen stimulation test (CAST), der Analgetikaintoleranztest (AIT) sowie der aspirin-sensitive patients identifications test (ASPI-Test) zu zählen, die im folgenden dargestellt werden.

Cellular allergen stimulation test (CAST-2000)

Dieser von der Fa. Bühlmann (Allschwil, Schweiz) angebotene Test ist der zur Zeit einzige kommerziell verfügbare und bekanntester funktioneller Assay.

Hierbei werden die Leukozyten aus dem peripheren Blut mittels Dextran sedimentation isoliert und im Anschluß mit einem Stimulationspuffer stimuliert (Basiswert). Hieran schließt sich die Stimulation mit monoklonalen Antikörpern gegen den hochaffinen FcεRI an (Positivkontrolle) sowie mit COX-I-Inhibitoren in aufsteigenden Konzentrationen in Anwesenheit von IL-3 (Testansatz). Mittels ELISA erfolgt im Anschluss nach Inkubation und Aufbereitung des Überstandes die Messung der de-novo-synthetisierten Sulfidoleukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄. Das seit Anfang der 90er Jahre entwickelte CAST bzw. CAST-2000-System stellt aufgrund der zentralen Schlüsselrolle der Leukotriene bei der pathognomonischen Dysbalance des Arachidonsäure-Metabolismus eine häufig angewendete und zuverlässige Testmethode dar. In der Literatur finden sich derzeit 14 publizierte Studien (mit jeweils mehr als 15 Patienten), die insgesamt die Befunde von 582 Patienten mit AIS umfassen⁽¹⁸⁾. Allerdings unterscheiden sich die Testsensitivität (21%-100%, im Mittel 55%) sowie –spezifität (83%-100%, im Mittel 90%) beträchtlich voneinander, so dass die diagnostische Wertigkeit des CAST in den publizierten Studien unterschiedlich beurteilt wird^(15;19-21).

Eine Verbesserung der Testsensitivität durch Einführung von C5a in das Stimulationsprotokoll konnte in zwei Studien belegt werden^(22;23). Weitere methodische Verbesserungen des Tests führten u.a. zu der Zugabe von bakteriellen Endotoxinen bei der Stimulation⁽²⁴⁾. In einer europaweite, multizentrische Studie wurden 89 Patienten mit AIS sowie 109 Kontroll-Personen eingeschlossen, wobei drei COX-I-Inhibitoren in jeweils zwei Konzentrationen mit dem CAST-2000 getestet worden sind⁽²⁵⁾.

Analgetikaintoleranztest (AIT)

Bei diesem, von Baenkler und Schäfer beschriebenen Test wird neben den Sulfidoleukotrienen (LTC₄, LTD₄ und LTE₄) auch der gegenläufig gebildete Metabolit Prostaglandin E₂ (PGE₂) mittels ELISA bestimmt⁽²⁶⁾. Hierdurch kann neben der quantitativen Bestimmung der Sulfidoleukotriene und PGE₂-Konzentrationen auch deren Relation zur Einstufung einer individuellen Risikomusters bestimmt werden^(27;28).

In einer Studie zu dem AIT von Hecksteden et al. ⁽²⁹⁾ zeigte sich bei der Testung von 50 analgetikaintoleranten Patienten eine Testsensitivität von 100% und eine Testspezifität von 73,3% sowie ein positiver Vorhersagewert von 71% und ein negativer Vorhersagewert von 100%. Darüber hinaus konnte eine deutliche Korrelation der Testergebnisse des AIT mit dem Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen bei der intravenösen adaptiven Desaktivierung mit Aspirin in einer prospektiven Studie an 36 Patienten mit ASS-Intoleranz und Polyposis nasi et sinuum gefunden werden⁽³⁰⁾. Auch zum Monitoring der oralen adaptiven Desaktivierung konnte der AIT erfolgreich eingesetzt werden⁽³¹⁾.

Obgleich zum jetzigen Zeitpunkt noch wenige Studien zu dieser Methode vorliegen, lassen die vorliegenden Daten auf eine hohe klinische Relevanz des AIT schließen und unterstreichen das Potential dieses Verfahrens.

Aspirin-sensitive patients identification test (ASPITest)

In den letzten Jahren ist als neues, potentiell Zielmolekül in der *in-vitro*-Diagnostik die 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) als Stoffwechselprodukt der 15-Lipoxygenase in den Focus gerückt⁽³²⁾. Es konnte demonstriert werden, dass nach Zusatz von Aspirin im Zellkultursystem 15-HETE sowohl von epithelialen Zellen aus Nasenpolypen von Patienten mit aspirinsensitiver Rhinosinusitis als auch von Basophilen von Patienten mit aspirinsensitivem Asthma

im Vergleich zu Kontrollen signifikant vermehrt produziert wird^(33;34). Interessanterweise lässt sich die 15-HETE-Produktion sowohl durch Aspirin als auch durch andere COX-1-selektive NSAID steigern, wogegen COX-2-selektive NSAID diesen Effekt nicht aufweisen⁽³⁵⁾.

Den pathophysiologischen Mechanismen folgend (Abb. 1) wird PGE₂ bei aspirin-intoleranten Patienten in vermindertem Maße freigesetzt, so dass die erhöhte Produktion von 15-HETE auf einen dysregulierten Arachidonsäuremetabolismus bei Analgetikaintoleranz rück schließen lässt, da die Produktion von 15-HETE im Normalfall durch PGE₂ inhibiert würde^(12;15;35).

Der 2005 publizierte aspirin-sensitive patients identification test (ASPITest) bestimmt demnach als primäres Zielmolekül für die *in-vitro*-Diagnostik der Analgetikaintoleranz 15-HETE. An einer kontrollierten Studie an 35 analgetikaintoleranten Patienten konnten Kowalsi et al. für die Stimulation mit 200 µM Aspirin ein hochsignifikante Produktion von 15-HETE im Vergleich zu den Kontrollen demonstrieren⁽³⁵⁾. IN dieser Studie erreichte der ASPITest eine Testsensitivität von 83% und eine Testspezifität von 82% und einen positiven Vorhersagewert von 79% und ein neagtiver Vorhersagewert von 86%.

Diese vielversprechenden Ergebnisse dieser, bislang einzigen Studie zum ASPITest müssen sich noch in weiteren Studien reproduzieren lassen.

b) Durchflusszytometrische Verfahren

Während bei den oben genannten Verfahren freigesetzte Mediatoren mit ELISA bestimmt werden, detektierten durchflusszytometrische Testverfahren (FACS) zelluläre Oberflächenantigene, die als Aktivitätsmarker die zelluläre Antwort nach pharmakologischer Stimulation anzeigen.

Nach Stimulation der *in-vitro* isolierten Leukozyten wird mittels einer FACS-Analyse die aktivierte Leukozytenpopulation als Teilmenge der Gesamtzahl aller analysierten Leukozyten quantifiziert^(36;37). Hierbei wird als ein positives Testergebnis in den meisten Studien ein Anteil der aktivierten Leukozyten von mehr als 10-15% angesehen.

Zu den derzeit am besten untersuchten Aktivitätsmarkern der zellulären Antwort nach pharmakologischer Stimulation gehört das Transmembranprotein CD-63 (synonym: gp 53, LAMP-3), welches in nicht-aktivierten Zellen ausschließlich auf (intra-)zytoplasmatischen Granula nachweisbar ist⁽³⁸⁾

Nach Aktivierung basophiler Leukozyten erscheint CD-63 *de-novo* an der Zelloberfläche und korreliert hiermit direkt mit der zellulären Degranulation und Mediatorenfreisetzung⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. CD-63 wurde für basophile Leukozyten, gewebeständige Mastzellen, Makrophagen und Thrombozyten nachgewiesen und bietet sich als neues, potentiell Zielmolekül auch in der *in-vitro*-Diagnostik der Analgetikaintoleranz an⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

Als weiterer Oberflächen-Aktivierungsmarker von basophilen Leukozyten gilt CD203c (synonym E-NPP3, PD-I β , B10, gp130), wobei die diagnostische Wertigkeit im Vergleich zu CD-63 derzeit noch Gegenstand der aktuellen Diskussion ist^(38;44;45).

In den bislang durchgeführten Studien zur *in-vitro*-Diagnostik bei Analgetikaintoleranz mit durchflusszytometrischen Analysen wurde die Expression von CD63 im Vollblut (Basotest, Fa. Orpegen, Heidelberg, Deutschland) oder auf isolierten Leukozyten (Flow Cast, Fa. Bühlmann, Allschwil, Scheiz) untersucht⁽¹⁸⁾. Allerdings wiesen die Studien deutlich unterschiedliche Ergebnisse auf. So fand sich bei der Analyse der CD-63-Expression auf der Basis von Vollblut-Proben eine Testsensitivität von 30%⁽³⁶⁾, während in einer Studie von Gamboa et al. die durchflusszytometrische

Bestimmung dieses Aktivierungsmarkers auf eine Testsensitivität –je nach eingesetzter Einzelsubstanz- zwischen 15% und 55% schließen ließ, wobei die Testspezifität generell über 90% lag⁽⁴⁶⁾. Durch Kombination der Testergebnisse der Stimulation mit Aspirin, Paracetamol, Metamizol und Diclofenac ließ sich die Testsensitivität auf 63,3% und die –spezifität auf 93,3% steigern. In einer weiteren multizentrischen, paneuropäischen Studie an 140 aspirinsensitiven Patienten und 163 Kontrollpersonen wurde eine Testsensitivität von 76% und eine Testspezifität von 41%-91% für die kombinierte Auswertung nach Stimulation isolierter Leukozyten mit Aspirin, Diclofenac und Naproxen gefunden⁽²⁵⁾.

Zusammenfassend zeigen die derzeit vorliegenden Studien zur durchflusszytometrischen Bestimmung von CD63 an isolierten Leukozyten (Flowcast) vor allem für die kombinierte Auswertung der Stimulation mit verschiedenen Substanzen eine hohe diagnostische Wertigkeit bei der *in-vitro*-Diagnostik der ASS-Intoleranz.

c) Hybridverfahren/ Methodenkombinationen

Der CAST-Combi fasst als Kombination des CAST-2000 und dem Flow-CAST der Fa. Bühlmann (Allschwil, Schweiz) die Detektion von Sulfidoleukotrienen (LTC₄, LTD₄, LTE₄) mittels ELISA sowie die durchflusszytometrische Bestimmung des Oberflächen(aktivitäts)-Markers CD63 zusammen. Für Tests mit Metamizol ließ sich die Sensitivität des CAST-2000 von 52% mittels dieses Hybridverfahrens auf 77% erhöhen⁽⁴⁷⁾. Ebenfalls fand sich bei der kombinierten Testung nach Stimulation mit Aspirin, Paracetamol, Metamizol und Diclofenac eine Sensitivität von 73% und eine Spezifität von 71%, wobei sich in dieser Studie im Vergleich zur durchflusszytometrischen Methode alleine ein Abfall der Testspezifität zeigte⁽⁴⁸⁾.

Aufgrund fehlender weiterer Studien zu den Hybridverfahren kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden, inwieweit der deutliche Mehraufwand dieser Methoden im Vergleich zu den durchflusszytometrischen Verfahren allein einen diagnostischen Vorteil ergeben⁽²⁵⁾.

Zusammenfassung

Seit Anfang der 90er Jahre wurden in Kenntnis der pathophysiologischen Mechanismen der Analgetika-Intoleranz verschiedene *in-vitro*-Testverfahren entwickelt. Bis heute hat sich kein Verfahren als Goldstandard qualifizieren können.

Aus der Übersicht der vorgestellten Verfahren und der derzeit hierzu publizierten klinischen Studien wird deutlich, dass die Erfassung isolierter Stoffwechselprodukte (z.B. Sulfidoleukotriene) alleine nicht für eine zweifelsfreie Diagnosefindung auszureichen scheint.

Vielmehr wird zukünftig bei der *in-vitro* Diagnostik der Analgetika-Intoleranz von Bedeutung sein, verschiedene Teil-Mechanismen des dysbalanzierten Arachidonsäure-Metabolismus zu untersuchen, diverse Stoffwechselprodukte bzw. Markermoleküle in der Analyse zu erfassen und unterschiedliche methodische Ansätze zu kombinieren.

Um die zur Verfügung stehenden Methoden zielgerichtet abzustimmen und Standards zu definieren, die eine valide *in-vitro*-Diagnostik der ASS-Intoleranz möglich machen, wird es unumgänglich sein, prospektive, multizentrische Studien durchzuführen.

Abbildungen

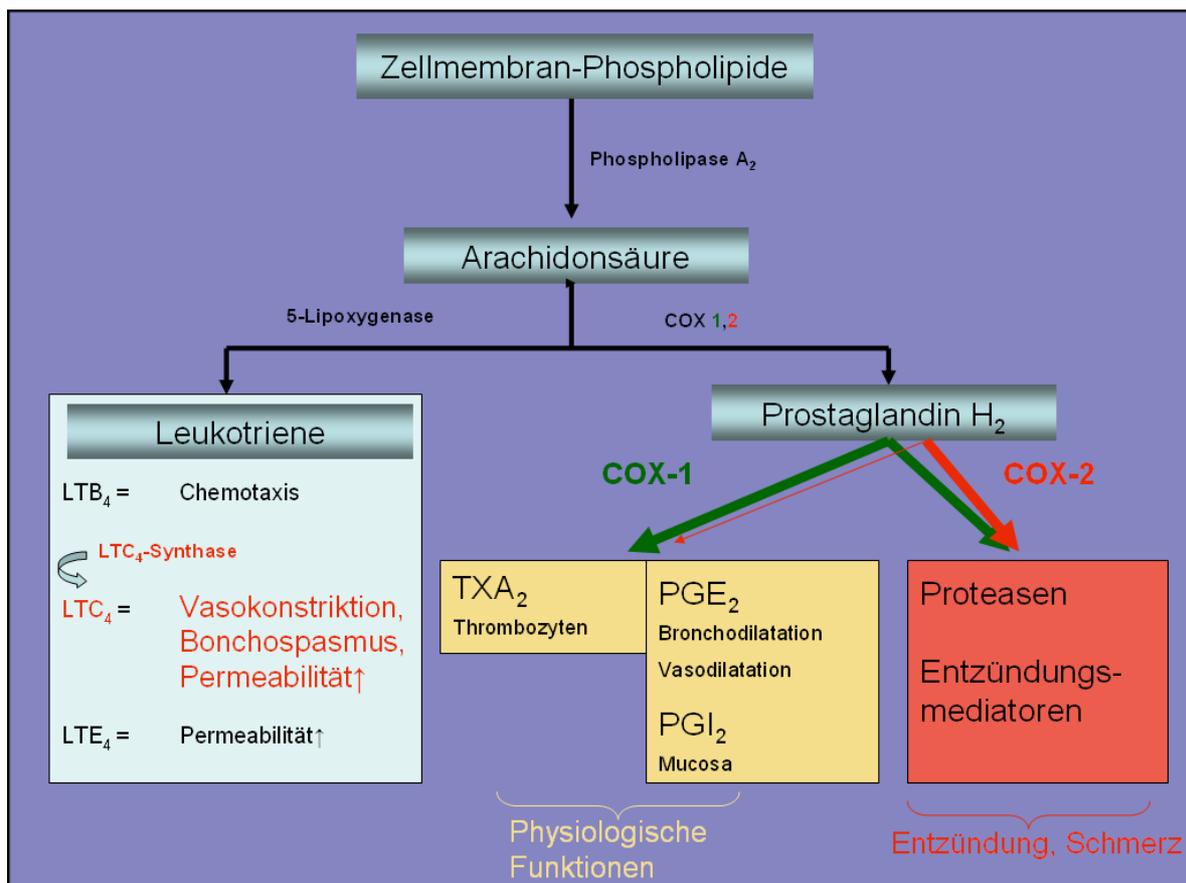


Abb. 1: Arachidonsäure (AS)-Metabolismus und Pathophysiologie der ASS-Intoleranz
(nach⁽¹²⁾ (30))

Durch die Einnahme von COX-Hemmern (hierbei vor allem bei den COX-1-Hemmern) kommt es zu einem Rückstau von Abbau-Produkten des Arachidonsäure-

Metabolismus in Richtung der Leukotrien-Achse (mit vermehrter Bildung von verschiedenen pro-inflammatorischen Mediatoren). Darüber hinaus scheinen bei Patienten mit AIS die Leukotrien-spezifische Synthesen verstärkt aktiv zu sein, welche diesen „shift“ potenzieren.

Literatur

- (1) Hirschberg. Anaphylactoid reaction to aspirin (1902) [classical article]. 249-252 (1990). *Allergy Proc* 1990; 11(5):249-52.
- (2) Widal F, Abrami P, Lermoyez J. First complete description of the aspirin idiosyncrasy-asthma-nasal polyposis syndrome (plus urticaria)--1922 (with a note on aspirin desensitization). By F. Widal, P. Abrami, J. Lermoyez
2. *J Asthma* 1987; 24(5):297-300.
- (3) Pfaar O, Klimek L. Eicosanoids, aspirin-intolerance and the upper airways--current standards and recent improvements of the desensitization therapy. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 12:5-13.
- (4) Pfaar O, Spielhauer M, Klimek L. Max Samter - Ein Pionier und Wegbereiter der modernen Allergologie und Rhinologie. *Allergo Journal* 2005; (14):630-3.
- (5) Stevenson DD, Simon RA. Selection of patients for aspirin desensitization treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(4):801-4.
- (6) Hosemann W, Kuhnel T, Pfeifer M. [Analgesic intolerance and nasal polyps]. *Laryngorhinootologie* 2000; 79(1):53-65.
- (7) Babu KS, Salvi SS. Aspirin and asthma. *Chest* 2000; 118(5):1470-6.
- (8) Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma
Eur Respir J 2000; 16(3):432-6.
- (9) Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczynska M, Picado C, Scadding G et al. EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity. *Allergy* 2007; 62(10):1111-8.

- (10) Dollner R, Klimek L, Pfaar O, Stuck BA, Hörmann K. In vitro diagnostic tests for aspirin intolerance. *Allergologie* 2007; 30(7):240-8.
- (11) Szczeklik A, Sanak M, Nizankowska-Mogilnicka E, Kielbasa B. Aspirin intolerance and the cyclooxygenase-leukotriene pathways *Curr Opin Pulm Med* 2004; 10(1):51-6.
- (12) Szczeklik A, Sanak M. the broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 2006;(533):145-55.
- (13) Szczeklik A, Nizankowska E, Bochenek G, Nagraba K, Mejza F, Swierczynska M. Safety of a specific COX-2 inhibitor in aspirin-induced asthma *Clin Exp Allergy* 2001; 31(2):219-25.
- (14) Szczeklik A, Mastalerz L, Nizankowska E, Cmiel A. Protective and bronchodilator effects of prostaglandin E and salbutamol in aspirin-induced asthma *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(2):567-71.
- (15) Dollner R, Klimek L, Pfaar O, Stuck BA, Hörmann K. *In-vitro*-Testverfahren bei Analgetika-Intoleranz. *Allergologie* 2007; 30:240-8.
- (16) Lebel B, Messaad D, Kvedariene V, Rongier M, Bousquet J, Demoly P. Cysteinyl-leukotriene release test (CAST) in the diagnosis of immediate drug reactions. *Allergy* 2001; 56(7):688-92.
- (17) Demoly P, Lebel B, Arnoux B. Allergen-induced mediator release tests. *Allergy* 2003; 58(7):553-8.
- (18) de Weck AL. Basophilenaktivierungstests durch Flusszytometrie (BAT) und Sulphidoleukotrienfreisetzungstests (CAST) in der Allergiediagnostik. *Allergo J* 2006; 15:512-3.
- (19) de Weck AL, Sanz ML. Cellular allergen stimulation test (CAST) 2003, a review. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2004; 14(4):253-73.
- (20) Pierzchalska M, Mastalerz L, Sanak M, Zazula M, Szczeklik A. A moderate and unspecific release of cysteinyl leukotrienes by aspirin from peripheral blood leucocytes precludes its value for aspirin sensitivity testing in asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(12):1785-91.
- (21) Czech W, Schopf E, Kapp A. Release of sulfidoleukotrienes in vitro: its relevance in the diagnosis of pseudoallergy to acetylsalicylic acid. *Inflamm Res* 1995; 44(7):291-5.
- (22) May A, Weber A, Gall H, Kaufmann R, Zollner TM. Means of increasing sensitivity of an in vitro diagnostic test for aspirin intolerance. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(10):1402-11.
- (23) Czech W, Krutmann J, Schopf E, Kapp A. Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1992; 126(4):351-5.

- (24) Van RC, Anderson R. Assessment of determinants of optimum performance of the CAST-2000 ELISA procedure. *J Immunol Methods* 2004; 288(1-2):1-7.
- (25) de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Sturm G, Blanca M et al. Diagnosis of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in vitro by flow cytometry (Flow-CAST) and sulfidoleukotrien assay: a multicenter study. *Allergy* 2006.
- (26) Baenkler HW, Schaefer D. Diagnostic method based on measurement of lipid inflammation mediators modulation effector ratio profiles. *Europäisches Patent* 2001;(EP 1265 069 B1).
- (27) Schafer D, Lindenthal U, Wagner M, Bolcskei PL, Baenkler HW. Effect of prostaglandin E2 on eicosanoid release by human bronchial biopsy specimens from normal and inflamed mucosa. *Thorax* 1996; 51(9):919-23.
- (28) Schafer D, Schmid M, Gode UC, Baenkler HW. Dynamics of eicosanoids in peripheral blood cells during bronchial provocation in aspirin-intolerant asthmatics *Eur Respir J* 1999; 13(3):638-46.
- (29) Hecksteden K, Schaefer D, Stuck B, Klimek L, Hörmann K. Diagnostik des Analgetika-Intoleranz-Syndroms mittels funktioneller Zelltestung (Analgetika-Intoleranz-Test: AIT). *Allergologie* 2003; 26:263-71.
- (30) Pfaar O, Spielhauer M, Barth C, Schäfer D, Stuck BA, Mösges R et al. Adaptive Desaktivierung bei ASS-Intoleranten-Patienten mit Polyposis nasi et sinuum - Möglichkeiten eines neuen Therapieprinzips mit intravenöser Applikation. *Allergologie* 2006; 29:322-31.
- (31) Gosepath J, Schaefer D, Amedee RG, Mann WJ. Individual monitoring of aspirin desensitization. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127(3):316-21.
- (32) Shannon VR, Chanez P, Bousquet J, Holtzman MJ. Histochemical evidence for induction of arachidonate 15-lipoxygenase in airway disease. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(4):1024-8.
- (33) Kowalski ML, Pawliczak R, Wozniak J, Siuda K, Poniatowska M, Iwaszkiewicz J et al. Differential metabolism of arachidonic acid in nasal polyp epithelial cells cultured from aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(2 Pt 1):391-8.
- (34) Kowalski ML, Ptasinska A, Bienkiewicz B, Pawliczak R, Dubuske L. Differential effects of aspirin and misoprostol on 15-hydroxyeicosatetraenoic acid generation by leukocytes from aspirin-sensitive asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(3):505-12.
- (35) Kowalski ML, Ptasinska A, Jedrzejczak M, Bienkiewicz B, Cieslak M, Grzegorzcyk J et al. Aspirin-triggered 15-HETE generation in peripheral blood leukocytes is a specific and sensitive Aspirin-Sensitive Patients Identification Test (ASPISTest). *Allergy* 2005; 60(9):1139-45.

- (36) Erdmann SM, Ventocilla S, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. [Basophil activation tests in the diagnosis of drug reactions]. *Hautarzt* 2005; 56(1):38-43.
- (37) Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004; 34(3):332-9.
- (38) Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61(9):1028-39.
- (39) Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5 Suppl):S292-S302.
- (40) Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82(1):33-40.
- (41) Grutzkau A, Smorodchenko A, Lippert U, Kirchhof L, Artuc M, Henz BM. LAMP-1 and LAMP-2, but not LAMP-3, are reliable markers for activation-induced secretion of human mast cells. *Cytometry A* 2004; 61(1):62-8.
- (42) Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1991; 266(5):3239-45.
- (43) Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJ, Rozemuller E, van IF, Sixma JJ. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 1987; 70(3):838-45.
- (44) Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS et al. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(2):259-65.
- (45) Monneret G, Boumiza R, Gravel S, Cossette C, Bienvenu J, Rokach J et al. Effects of prostaglandin D(2) and 5-lipoxygenase products on the expression of CD203c and CD11b by basophils. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(2):627-34.
- (46) Gamboa P, Sanz ML, Caballero MR, Urrutia I, Antepará I, Esparza R et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(9):1448-57.
- (47) Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, Antepará I, Urrutia I, Jauregui I et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 2003; 58(4):312-7.
- (48) Sanz ML, Gamboa P, de Weck AL. A new combined test with flowcytometric basophil activation and determination of sulfidoleukotrienes is useful for in vitro diagnosis of hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136(1):58-72.

