

E. Gonsior¹ (federführend)
unter Mitarbeit von
M. Henzgen²
R. A. Jörres³
R. F. Kroidl⁴
R. Merget⁵
F.-W. Riffelmann⁶
G. Wallenstein⁷

Leitlinie für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit Allergenen

Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
und Deutsche Gesellschaft für Pneumologie

Guidelines for Conducting Provocation Tests with Allergens

Zusammenfassung

In Überarbeitung der 1984 erstmals veröffentlichten Leitlinien für die Durchführung von bronchialen Provokationen [28] und nachdem kürzlich Leitlinien für Provokationstests mit pharmakologischen Substanzen erstellt wurden [4], werden im Folgenden aktualisierte Leitlinien für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit Allergenen vorgestellt. Diese wurden durch Auswertung der verfügbaren Literatur in mehreren Expertentreffen formuliert. Neben präzisen Aussagen zu Indikationen, Kontraindikationen und Sicherheitsmaßnahmen werden drei Untersuchungsprotokolle, deren Existenz als gesichert angesehen wird, detailliert beschrieben.

Abstract

Guidelines for bronchial allergen provocation tests, first published in 1984 [28], are updated by this paper. This version has been compiled in repeated meetings of a panel of experts after evaluation of the publications available. Precise statements regarding indications, contraindications, after safety measures are given. Three evidence-based protocols are submitted in detail.

1 Einleitung

Asthma bronchiale und die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sind die häufigsten Diagnosen bei Patienten mit intrathorakaler Atemwegobstruktion. Bei diesen Patienten ist häufig eine spontane Variabilität im Schweregrad der Obstruktion zu beobachten und durch wiederholte Lungenfunktionsprüfungen zu dokumentieren. Eine große Variabilität im Obstruktionsgrad ist ein Hinweis auf eine vermehrte Empfindlichkeit des Patienten gegenüber Umweltreizen, die eine Verengung der Atemwege auslösen. Es ist von klinischem Interesse, die Auslöser und den möglichen Schweregrad dieser Anfälle zu kennen. Aus diesem Grunde sind in den letzten 40 Jahren unterschiedliche Verfahren für bronchiale Provokationstests und verschiedene

onsprüfungen zu dokumentieren. Eine große Variabilität im Obstruktionsgrad ist ein Hinweis auf eine vermehrte Empfindlichkeit des Patienten gegenüber Umweltreizen, die eine Verengung der Atemwege auslösen. Es ist von klinischem Interesse, die Auslöser und den möglichen Schweregrad dieser Anfälle zu kennen. Aus diesem Grunde sind in den letzten 40 Jahren unterschiedliche Verfahren für bronchiale Provokationstests und verschiedene

Institutsangaben

¹Klinik Kurhessen, Abt. f. Innere Medizin, Bad Sooden-Allendorf (Priv.-Doz. Dr. med. E. Gonsior)

²Pneumologie und Allergologie/Immunologie der Klinik für Innere Medizin IV, FSU, Jena (Prof. Dr. med. C. Kroegel)

³Krankenhaus Großhansdorf, Großhansdorf (Prof. Dr. med. H. Magnussen)

⁴Pneumologische Praxis, Stade

⁵Berufsgenossenschaftliches Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin, Bochum (Prof. Dr. med. X. Baur)

⁶Fachkrankenhaus Kloster Grafschaft, Abt. Allergologie, Schmalleben (Dr. med. Lauter)

⁷Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Berlin (Prof. Dr. med. W. D. Schneider)

Anmerkung

Diese Leitlinie wurde erarbeitet vom gemeinsamen Arbeitskreis „Bronchiale Provokationstests“ der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie und der Sektion Allergologie und Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie.

Durch Kommentare und Vorschläge haben zu dieser Richtlinie beigetragen:

X. Baur, Bochum, jetzt Hamburg, K.-Ch. Bergmann, Bad Lippspringe, P. Ganshorn, Münsterstadt, R. Köbrich, Höchberg, G. Kröll, Frankfurt, G. Müller, Wedel, A. Paap, Reinbek

Korrespondenzadresse

Prof. Bergmann · Allergie- u. Asthma-Klinik W. Gronemeyer · An der Martinusquelle 10 · 33175 Bad Lippspringe

Bibliografie

Pneumologie 2002; 56: 187–198 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0934-8387

ne Maße für die Reaktion auf bronchokonstriktiv wirkende Reize empfohlen worden. Es ist allerdings keiner dieser Vorschläge allgemein akzeptiert worden [3, 4, 9, 18, 22, 28, 32, 47, 53, 62].

Ziel dieses Papiers ist es, die verschiedenen, für bronchiale Provokationstests mit Allergenen zur Verfügung stehenden, Techniken darzustellen und breit akzeptierte Leitlinien zur Standardisierung für den deutschen Raum zu liefern. Diese Empfehlungen repräsentieren die augenblicklich validierten Techniken.

Asthma bronchiale ist funktionell charakterisiert durch eine variable Atemwegsobstruktion und morphologisch durch eine Entzündung der Bronchialschleimhaut mit Epitheldesquamation, Verdickung der subepithelial gelegenen Basalmembran, Schleimhauthyperämie, Plasmaexsudat und Schleimhautödem, Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur, Infiltration von Schleimhaut und Submukosa mit Mastzellen, aktivierten Lymphozyten sowie eosinophilen und neutrophilen Leukozyten [20, 38].

Die morphologischen Veränderungen lassen sich ebenso wie die funktionellen Symptome durch bronchiale Provokationstests mit bronchokonstriktiv wirksamen Reizen stimulieren. Dies ermöglicht es, das Ausmaß der sog. „Überempfindlichkeit der Atemwege“ gegenüber einem bestimmten Stimulus zu bestimmen. Der Begriff Überempfindlichkeit beschreibt eine Linksverschiebung und/oder Zunahme der Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve.

Beim allergischen Asthma bronchiale besteht eine Sensibilisierung gegenüber wenigstens einem Allergen, die mit einer Überempfindlichkeit gegenüber diesem Allergen verbunden ist. Dieses Allergen kann als bronchokonstriktiver Stimulus benutzt werden. Hierbei entspricht „Dosis“ der Allergen-Dosis und „Wirkung“ dem Ausmaß der induzierten Bronchialobstruktion.

Der im Provokationstest ermittelte Grad der Überempfindlichkeit der Atemwege hängt möglicherweise mit dem Schweregrad des Krankheitsprozesses zusammen. Dieser Zusammenhang wird durch Beobachtungen gestützt, ist allerdings aufgrund unumgänglicher therapeutischer Interventionen und wechselnder Expositionsbedingungen im Einzelfall nicht sicher zu belegen. Es erscheint als gerechtfertigt, davon auszugehen, dass die unspezifische Reagibilität (z. B. gegenüber Methacholin oder Histamin) und die spezifische Reagibilität (gegenüber Allergenen) nicht immer miteinander korrelieren [19, 39, 49].

Es liegen unterschiedliche Forschungsergebnisse darüber vor, ob beim allergischen Asthma bronchiale der durch Haut- oder Serum-Tests ermittelte Antikörper-Titer mit dem klinischen Krankheitsbild korreliert [2, 61]. Obwohl einige Autoren eine enge Beziehung zwischen Antikörper-Titer, unspezifischer bronchialer Reagibilität und Ausfall des bronchialen Provokationstests mit Allergenen beschrieben haben [6–8, 15, 36, 54, 58], ist diese Verknüpfung besonders bei schwach oder mittelstark Sensibilisierten – nicht eindeutig belegt [25, 32, 48, 56, 64].

Weiter ist bekannt, dass das Ausmaß der Überempfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Stimuli nicht miteinander korrelieren muss [16, 35]. Allerdings liegen widersprüchliche Befunde zu der Frage vor, ob die eine Form der Überempfindlichkeit Voraussetzung für die andere ist; also z. B. ob eine Überempfindlichkeit

gegenüber Mediatoren oder cholinergen Transmittern Voraussetzung für eine Überempfindlichkeit gegenüber einem Allergen ist [13, 17].

Zusätzlich müssen die zeitlichen Verhältnisse zwischen natürlicher und iatrogenen Allergenexposition berücksichtigt werden. Einerseits kann eine Allergenexposition im Rahmen eines Provokationstests die bronchiale Empfindlichkeit sowohl gegenüber Allergenen als auch gegenüber anderen bronchokonstriktiven Stimuli nachhaltig beeinflussen; andererseits ist bei Provokationstests mit ubiquitären saisonalen Allergenen zu beachten, dass z. B. während der Pollenflugzeit die Ergebnisse sehr stark von solchen abweichen können, die außerhalb der Blühperiode erhalten werden. Auch zeitnah einwirkende nichtallergene Noxen müssen berücksichtigt werden.

Provokationstests werden derzeit sowohl in wissenschaftlichen Studien als auch mit diagnostischer Zielsetzung eingesetzt. Zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse müssen Fragestellungen und Messbedingungen definiert sein, also Auswahl der Patienten, Applikation und Maximaldosis des Allergens, Lungenfunktionsmethode sowie technische und medizinische Sicherheitsmaßnahmen. Die Untersuchungsprotokolle für pharmakologische, physikalische und allergene Stimuli sind naturgemäß eng miteinander verwandt. Grundsätzlich muss jedoch jedes Protokoll für den tatsächlich benutzten Stimulus validiert werden [35]. Die Besonderheiten bei der Untersuchung von Kindern und bei berufsbezogenen Provokationstests sind zu beachten.

2 Fragestellung

Provokationstests mit Allergenen können mit zwei unterschiedlichen Fragestellungen vorgenommen werden:

Sie können – besonders für die diagnostische Routine – zum Aktualitätsnachweis von Sensibilisierungen eingesetzt werden. Die Fragestellung lautet dann: Können durch eine Exposition gegenüber einem Verdachtsallergen die Symptome von Asthma bronchiale ausgelöst werden?

Sie können auch – z. B. bei experimenteller Fragestellung – zur Bestimmung der bronchialen Empfindlichkeit gegenüber einem Allergen dienen, also zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung.

3 Messbedingungen

Provokationstests sollen möglichst so qualifiziert durchgeführt werden, dass sie unmittelbar für wissenschaftliche Arbeiten verwendet werden können.

3.1 Indikationen

Für diagnostische Zwecke sind bronchiale Provokationstests mit Allergenen immer dann indiziert, wenn die Diagnose nicht mit ausreichender Sicherheit aus der Vorgeschichte, den Symptomen oder dem Muster der Serumantikörper abgeleitet werden kann, und wenn sich hieraus wichtige Konsequenzen für Therapie, Prävention und/oder Kompensation ergeben.

- Provokationstests mit Allergenen können durchgeführt werden,
- wenn Anamnese und Antikörpernachweis sich nicht entsprechen,
 - wenn Antikörper gegen anamnestisch nicht zu identifizierende Allergene vorhanden sind (z. B. bei Sensibilisierung gegen mehrere perenniale Umweltallergene),
 - fakultativ auch zur Absicherung der Diagnose
 - vor Einleitung einer Hyposensibilisierungsbehandlung,
 - bei Begutachtungen (wenn ein gerichtsverwertbarer Kausalitätsnachweis erbracht werden muss).

3.2 Kontraindikationen

Es existieren keine gesicherten Daten, aus denen Kontraindikationen abgeleitet werden könnten. Bronchialtests mit Allergenen sind jedoch kontraindiziert, wenn aufgrund vorbestehender Symptome eine zweifelsfreie Beurteilung der Reaktion nicht möglich ist, oder wenn der Patient durch die Untersuchung in nicht vertretbarer Weise gefährdet werden kann.

Sie sind nur zulässig, wenn der Untersucher in ihrer Durchführung erfahren ist, und wenn die unten genannten Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden.

Unter praktischen Gesichtspunkten sind bronchiale Provokationstests mit Allergenen kontraindiziert,

- wenn eine deutliche Bronchialobstruktion besteht:
 - $R_{AW} > 0,5 \text{ kPa}^{-1}\text{s}$ oder
 - $FEV_1 < 70\%$ des Sollmittelwertes,
- wenn Symptome einer akuten bronchialen Entzündung, bzw. eines „bronchialen Infektes“ bestehen,
- wenn Hypoxämie und/oder Hyperkapnie vor Provokation bestehen,
- wenn Begleiterkrankungen eine adäquate Behandlung bei Zwischenfällen erschweren, z. B.
 - koronare Herzkrankheit,
 - arterielles Aneurysma,
- wenn der Patient die Untersuchungsprozedur und die Risiken eines bronchialen Provokationstests nicht versteht,
- wenn eine Schwangerschaft besteht,
- wenn eine schwere Hypertonie vorliegt,
- wenn ein behandlungsbedürftiges Krampfleiden besteht,
- wenn die Begleittherapie nicht die unter 3.3.2 angegebenen Kriterien erfüllt.

3.3 Voraussetzungen beim Patienten

Neben den o.g. Kontraindikationen müssen verschiedene Voraussetzungen auf Seiten des Patienten beachtet werden:

3.3.1 Aufklärung und Einwilligung

Der Patient ist über den Untersuchungsablauf sowie über mögliche Risiken ausführlich zu informieren. Der Inhalt dieser Aufklärung ist schriftlich zu dokumentieren. Entsprechend allgemeiner Übung ist das Protokoll dieser Aufklärung durch den Patienten zu unterzeichnen, der hierbei versichert, dass er der Untersuchung zustimmt.

3.3.2 Begleittherapie

Bei der Indikationsstellung muss bedacht werden, dass der Patient medikamentös nicht in solcher Weise behandelt werden darf, dass die Reaktion im Test durch die Medikamentenwirkung unterdrückt oder maskiert werden kann. Bei der hieraus abzulei-

tenden Empfehlung der Mindestabsetzfristen muss zwischen eindeutigen Versuchsbedingungen und Praktikabilität sorgfältig abgewogen werden. Aus diesem Grunde weichen die Empfehlungen dieser Richtlinie gering von denen der SEP-Richtlinie [62] ab.

Wenn ein Therapieeinfluss ausgeschaltet werden soll, sind folgende Mindestabsetzfristen einzuhalten:

- kurzwirksame β -Adrenergika: 6 Std.
- Salmeterol und Formoterol: 24 Std.
- Anticholinergika: 12 Std.
- Theophyllin: 12 Std.
- retardiertes Theophyllin: 24 Std.
- retardierte β -Adrenergika: 24 Std.
- Cromoglycinsäure: 24 Std.
- Nedocromil: 24 Std.
- orale Kortikosteroide: 14 Tage (s. Anmerkung)
- inhalierte Kortikosteroide: 14 Tage (s. Anmerkung)
- Antihistaminika, außer Astemizol: 2 Tage
- Astemizol: 6 Wochen
- Leukotrienantagonisten: 7 Tage (s. Anmerkung)
- zentral wirkende Antihypertensiva (Rauwolfiaalkaloide, Guanethidin, α -Methyldopa, Clonidin u. ä.): 21 Tage
- trizyklische Psychopharmaka: 21 Tage
- β -Rezeptorenblocker und Sotalol: 24 Std.

Anmerkung: In der täglichen Praxis müssen Kortikosteroide nicht abgesetzt werden. Diese Begleitmedikation ist jedoch im Untersuchungsprotokoll zu dokumentieren. Provokationstests unter Kortikosteroidtherapie können wegen Unterdrückung einer isolierten Spätreaktion falsch negativ ausfallen. Als Faustregel kann gelten, dass eine Kortikosteroidtherapie fortzuführen ist, wenn es die Fragestellung des Provokationstests zulässt.

Die Absetzfrist für Leukotrienantagonisten ist eine Abschätzung aus der Halbwertszeit. Z.Z. liegen keine Untersuchungen zur Wirkungsdauer vor.

3.4 Sicherheitsmaßnahmen

Provokationstests mit Allergenen erfordern sorgfältige Vorsichtsmaßnahmen und eine engmaschige Überwachung des Reaktionsausfalls am Untersuchungs- und am Folgetag.

- Während der Untersuchung und bis 2 Stunden nach der letzten Allergen-Inhalation ist der Patient im Labor vom Untersuchungspersonal unmittelbar zu überwachen. Bis zur Spätmessung (5–8 Stunden nach der letzten Allergen-Inhalation) muss er unter Beobachtung bleiben.
- Von Testbeginn an ist PEF für 24 Stunden stündlich (ausgenommen während des Schlafs) zu kontrollieren. Während dieser Zeit muss der Patient Zugang zu einem kurzwirksamen inhalierbaren β -Mimetikum haben. Er muss instruiert sein, wie er sich bei Atembeschwerden zu verhalten hat und wie er ggf. einen Arzt erreichen kann. Bei Verschlechterung von PEF um mehr als 20% soll dieses Medikament inhaliert und der Erfolg der Maßnahme nach 10 min dokumentiert werden. Sollte sich keine Besserung eingestellt haben, ist ärztliche Hilfe in Anspruch zu nehmen.
- Da eine unbeabsichtigte Allergenüberdosierung bei Provokationstests nie vollständig ausgeschlossen werden kann, ist eine regelmäßig überprüfte Ausrüstung zur kardiopulmonalen Wiederbelebung im Untersuchungsraum vorzuhalten.

- Sauerstoff, inhalier- und injizierbare Bronchospasmolytika, injizierbare Antihistaminika und Kortikosteroide sowie Adrenalin müssen verfügbar sein.
- Wenn ein Aerosolfilter für die Ausatmung nicht sinnvoll eingesetzt werden kann, muss die Inhalation in einer geschlossenen, zwangsentlüfteten Inhalationskabine stattfinden, damit eine Kontamination des Untersuchungsraumes vermieden wird [30,31].
 - Während der Untersuchung muss ein sachkundiger Arzt jederzeit verfügbar sein.
 - Das Personal, das den Test durchführt, muss ausgebildet und erfahren sein.
 - Die Kontraindikationen (s. 3.2) müssen beachtet sein.
 - Von Beginn der Untersuchung an muss im Untersuchungsraum ein inhalierbares kurzwirksames Bronchospasmolytikum zur sofortigen Anwendung bereitstehen.
 - Nach Inhalation des Verdünnungsmittels des vorgesehenen Allergenextraktes darf es zu keiner relevanten Verschlechterung der Lungenfunktion kommen (s. 4.6.5).
 - Die Anfangsdosis des Allergens muss aufgrund von Anamnese, bronchialer Reagibilität und Sensibilisierungsgrad (Hauttest oder RAST) ausgewählt werden.
 - Das Tempo der Allergenapplikation (d. h. die Verneblerleistung oder der Abstand zwischen aufeinander folgenden Allergen-Inhalationen) muss so eingestellt sein, dass vor der Verabreichung der nächsten Dosis eine mögliche Sofortreaktion ihr Maximum erreicht hat. Dies ist besonders bei der Benutzung von Aerosol-Dosimetern zu beachten und bedeutet, dass für Allergeninhalationen ein Mindestabstand von 20 min einzuhalten ist.
 - Vor jeder Dosissteigerung muss eine Lungenfunktionsprüfung erfolgen.
 - Ist die Reaktion 20 min nach Inhalationsende nahe dem „Positivkriterium“ (s. 4.6.5), sollte die zuletzt gegebene Allergen-Dosis wiederholt werden.
 - An einem Untersuchungstag darf wegen der Möglichkeit einer Spätreaktion nur ein Allergen getestet werden.
 - Zur Erfassung der Spätreaktion, soll 5–8 Stunden nach der letzten Allergen-Inhalation eine Nachuntersuchung mit Lungenfunktionsprüfung erfolgen.

3.5 Lungenfunktionsmethoden

Eine Bronchialobstruktion kann auf verschiedenen Wegen nachgewiesen werden, wobei zwei Gruppen von Messverfahren zu unterscheiden sind: solche, die mit einer vorausgehenden tiefen Inspiration und forcierten Expiration verbunden sind (FVC, FEV₁, PEF, MEF₅₀) [57], und solche ohne diese Atemmanöver (spezifischer Atemwegswiderstand, sR_{AW}) [22,30]. Beide Gruppen haben Vor- und Nachteile, da einerseits eine tiefe Inspiration eine vorübergehende Bronchodilatation und eine forcierte Expiration eine Bronchokonstriktion auslösen können [26,27,55], andererseits Atemwegswiderstand und -leitfähigkeit durch Kehlkopfbewegungen unkontrollierbar beeinflusst werden können.

Obwohl die verschiedenen Lungenfunktionsmethoden sehr unterschiedliche Aspekte der Atemmechanik erfassen, ist ihr Verhalten unter den Bedingungen der klinischen Routine sehr ähnlich [29].

Unter den Methoden mit besonderen Atemmanövern ist FEV₁ die Methode der Wahl. Für die aus der Fluss-Volumen-Kurve abgeleiteten Parameter (MEF₅₀) ist kein klarer Vorteil zu erkennen [22]. Die Messung von FEV₁ ist gut standardisiert, die Aussage dieses Parameters ist bestens untersucht [57].

Ausgehend von Provokationstests mit Methacholin liegen Hinweise dafür vor, dass Mehrfachmessungen von FEV₁ bei jedem Untersuchungsschritt das Untersuchungsergebnis im Vergleich zu Einfachmessungen nicht verbessern [60]. Aus diesem Grunde sind 3fach-Messungen nur für die Ausgangsmessung und die Messung nach Erreichen des Positiv-Kriteriums erforderlich.

Die Registrierung der forcierten Expiration als Fluss-Volumen-Kurve ist zur Artefakterkennung und für die Qualitätskontrolle des Atemmanövers hilfreich.

Lungenfunktionsmethoden ohne tiefe In- und forcierte Expiration, wie spezifischer Atemwegswiderstand (sR_{AW}) oder spezifische Atemwegsleitfähigkeit (sG_{AW}), sind empfindlicher als FEV₁. Ihre Reproduzierbarkeit ist erheblich schlechter als die von FEV₁, was allerdings durch die größere Empfindlichkeit von sR_{AW} bzw. sG_{AW} ausgeglichen wird [29,50,52].

Die Messung des Atemwegswiderstandes mit der Oszillations- oder der Unterbrechermethode ist für die Beurteilung bronchialer Provokationstests ungeeignet, da höhere Widerstandswerte bei diesen Verfahren unterschätzt werden [41]. Sie haben allerdings ihren Platz in der Überwachung des Testverlaufs.

Die Impulsoszillometrie ist für bronchiale Provokationstests mit Allergenen noch nicht ausreichend validiert. Die Benutzung des Atemwegswiderstandes (R_{AW}) empfiehlt sich ebenfalls nicht, da dieser Parameter vom thorakalen Gasvolumen und bei Kindern von den Körpermaßen abhängig ist.

Bei Abwägung aller Vor- und Nachteile sind FEV₁ und sR_{AW} empfehlenswert und als annähernd gleichwertig anzusehen. Idealerweise werden beide Parameter gleichzeitig benutzt.

3.6 Symptome

Obwohl die durch den Provokationstest induzierte Bronchialobstruktion in erster Linie durch Lungenfunktionsmethoden nachgewiesen werden kann, sind Symptome wie Husten, Atemnot und extrapulmonale Erscheinungen von klinischer Bedeutung.

4 Durchführung

4.1 Hintergrund

Die bronchiale Provokation mit Allergenen sollte soweit als möglich nach den gleichen Gesichtspunkten durchgeführt werden, wie sie für bronchiale Provokationstests mit pharmakologischen Stimuli gelten. Es muss allerdings beachtet werden, dass die Reaktion nach Allergen-Inhalation komplexer ist und länger andauert als die Reaktion bei pharmakologischen Tests.

Die Sofortreaktion ist charakterisiert durch eine Bronchialobstruktion, die ihr Maximum bis zu 20 min nach Inhalation erreicht, und die nach 120 min beendet ist [17].

Die Spätreaktion beginnt 2–8 Stunden nach Allergen-Inhalation und kann in Einzelfällen mehrere Tage anhalten. Sie wird nicht nur durch einen Muskelspasmus und andere direkte Mediatoreffekte verursacht, sondern auch durch eine zelluläre Entzündungsreaktion.

Die allergen-induzierte Zunahme der bronchialen Reagibilität (bestimmt mit Histamin oder Methacholin) tritt 3 Stunden [21] bis mehrere Tage [13] nach Allergen-Exposition auf, vornehmlich bei Patienten, bei denen eine Spätreaktion zu beobachten ist. Das Untersuchungsprotokoll soll sowohl die Sofort- als auch die Spätreaktion berücksichtigen.

Die Standardisierung von bronchialen Provokationstests mit Allergenen ist insofern problematisch, als die Beziehung zwischen inhalativer Exposition, Provokationsdosis und klinischem Bild nicht ausreichend bekannt ist. Das Problem der allgemein gültigen relevanten Allergen-Dosis ist somit bisher ungelöst.

4.2 Ambulant oder stationär

Bronchiale Provokationstests mit Allergenen können ambulant durchgeführt werden, wenn keine besonderen Risiken bestehen und keine schwer zu behandelnden Reaktionen zu erwarten sind. Als besondere Risiken sind anzusehen: Hinweise für einen sehr hohen Sensibilisierungsgrad; lebensbedrohliche Asthmaanfälle in der Vorgeschichte; bekanntermaßen schwer zu dosierende Allergene (z. B. Platinsalze, Amylase). Die stationäre Durchführung empfiehlt sich insbesondere, wenn eine ausgeprägte Spätreaktion zu erwarten ist, bei nicht standardisierten Allergenen und bei Berufsalergenen mit gleichzeitig vorhandener irritativer Wirkung.

4.3 Dosierung

4.3.1 Kommerzielle Allergenextrakte

Allergenextrakte für bronchiale Provokationstests müssen den gültigen internationalen Standardisierungsanforderungen genügen [45,66]. Die kommerziell verfügbaren Extrakte erfüllen diese Forderung nicht durchgehend. Unbeschadet dieser teilweise fehlenden Standardisierung haben sich die nach Erfahrungswerten eingestellten kommerziellen Allergen-Extrakte zur Provokation in der Praxis bewährt.

Die Extrakte werden gefriergetrocknet geliefert und nach Herstellervorschrift rekonstituiert. Unverdünnte, rekonstituierte Extrakte können bei max. 4 °C dunkel über drei Monate gelagert werden. Alle Verdünnungen aus dem rekonstituierten Extrakt werden unmittelbar vor Untersuchung frisch hergestellt; sie sind nicht aufzubewahren.

Die Ausgangskonzentration für den bronchialen Provokationstest muss individuell aufgrund des anamnestisch und durch Antikörperbestimmung festgestellten Sensibilisierungsgrades und der bronchialen Reagibilität festgelegt werden (s. 3.4).

Aus Gründen der Praktikabilität ist es zulässig, eine Ausgangskonzentration von 1 + 999 eines kommerziellen Extraktes – bei Berücksichtigung der individuellen Verhältnisse – als sicher anzusehen.

Dosissteigerungen in 10er-Schritten (1 + 999, 1 + 99, 1 + 9) sind vertretbar; Steigerungen mit Dosisverdoppelung (1 + 1023, 1 + 511, 1 + 255 usw.) sind naturgemäß genauer und weniger risikobehaftet. Bei Extraktverdünnungen von weniger als 1 + 9 sollte die Dosissteigerung durch Verdoppelung erfolgen.

Die Endkonzentration ist eine Frage der klinischen Gewichtung von Sensibilität und Spezifität des Tests. Die Herstellerangaben sollen soweit als möglich berücksichtigt werden.

4.3.2 Nichtkommerzielle Allergenextrakte

Stehen kommerzielle Extrakte eines bestimmten Materials nicht zur Verfügung, können wässrige oder Frugoni-Extrakte [33] aus nativem Allergenmaterial hergestellt werden. Zuverlässige Angaben über Dosissteigerung und Maximaldosis sind für diese unstandardisierten Extrakte praktisch nicht zu machen; sie sind daher mit größter Vorsicht einzusetzen.

Eine positive Reaktion sollte an geeigneten Vergleichspersonen überprüft werden.

4.4 Aerosolherzeugung

Für die Sicherheit und Aussagefähigkeit des bronchialen Provokationstests mit Allergenen ist es unerlässlich, dass sowohl die Allergen-Dosis als auch die bronchiale Reaktion präzise erfasst werden. Es ist von außerordentlicher Bedeutung, dass Aerosolherzeugung und -Applikation inter- und intraindividuell reproduzierbar sind, so dass die gleiche Dosis in der gleichen Art bei unterschiedlichen Untersuchungsterminen abgegeben werden kann.

Die gegenwärtig akzeptierte Standardisierung der Dosis betrifft die Menge der Provokationssubstanz, die den Mund erreicht.

Folgende Faktoren bestimmen die Aerosol-Deposition in den Atemwegen [65]: Zahl und Größe der Aerosolpartikel, Temperatur und Feuchte der Umgebungsluft, Luftwegsgeometrie und Atemtyp. Da ein erheblicher Teil des Aerosols im Mund- und Rachenraum deponiert wird, kann die Dosis, welche die tiefen Atemwege erreicht, nur geschätzt werden.

Am weitesten verbreitet ist die Aerosolherzeugung mit druckluftbetriebenen Düsen-Verneblern. Für alle Vernebler muss bekannt sein, welche Aerosolmenge bei einem gegebenen Druck erzeugt wird.

Die Verneblerleistung variiert für die einzelnen Exemplare des gleichen Typs und der gleichen Charge so stark, dass jedes Exemplar einzeln kalibriert werden muss. Bei angemessener Behandlung ist die Leistung des einzelnen Verneblers jedoch über lange Zeit hin sehr gut reproduzierbar.

Eine Kalibrierung muss unter den gleichen Bedingungen erfolgen, unter denen der Provokationstest durchgeführt wird. Es ist für klinische Zwecke ausreichend, für einen gegebenen Druck des Antriebsgases und eine gegebene Strömungsgeschwindigkeit am Verneblerausgang den Gewichtsverlust des Verneblers pro Zeiteinheit zu ermitteln. Bei Aerosoldosimetern kann der Gewichtsverlust nach z. B. 20 Betätigungen zur Kalibrierung herangezogen werden. Diese Kalibrierung über den Gewichtsverlust ist ein anerkanntes Verfahren [3,23]. Da sie bei längeren Vernebler-

lungszeiten die Verdampfung von Wasser aus der zu vernebelnden Lösung nicht berücksichtigt, müssen bei Provokationen mit wissenschaftlicher Fragestellung u.U. präzisere Messverfahren für die Verneblerleistung eingesetzt werden [11,63]. Auf jeden Fall sollten alle Inhalationslösungen nach Gebrauch verworfen werden [43].

Bei Handverneblern oder Verneblern mit intermittierender Aerosolerzeugung kann die Dosis ermittelt werden, indem jeder Vernebler vor und unmittelbar nach jedem Inhalationsschritt gewogen wird. Wegen der hierbei zu ermittelnden geringen Gewichtsänderung muss die Waage sowohl für das Gewicht des zu wiegenden Teils ausgelegt sein als auch eine hinreichende Genauigkeit haben (z.B. 0,001 g bei einem Wiegebereich von 200 g).

Bei Düsenverneblern sind Aerosolmenge und -eigenschaften vom Betriebsdruck abhängig. Düsenvernebler müssen daher bei konstantem Druck betrieben werden. Falls keine zentrale Gasversorgung benutzt wird, muss der Druckluftkompressor in der Lage sein, den Betriebsdruck über die gesamte Verneblungszeit aufrechtzuerhalten.

Die Mehrzahl der Düsenvernebler erzeugt ein polydisperses Aerosol mit einem medianen aerodynamischen Massendurchmesser (MMAD) von 1–4 μ [63]. Innerhalb dieses Bereichs hat eine Änderung des Partikeldurchmessers nur einen geringen Einfluss auf den Untersuchungsausfall [59].

Die Benutzung einer Mund-Nasen-Maske ist nur dann sinnvoll, wenn gleichzeitig eine Nasenklemme getragen wird.

4.5 Arbeitsmedizinische Besonderheiten

Bronchiale Provokationstests bei Verdacht auf allergenbedingtes Berufsasthma sind insbesondere dann indiziert, wenn keine ausreichend zuverlässige diagnostische Aussage mit einfachen Untersuchungsverfahren möglich ist.

Bronchiale Provokationstests können mit Extrakten von Berufsallergenen durchgeführt werden; dies wurde für einige Allergene wie z.B. Mehl, Tierhaare, Latex, Platinsalze u.a. gezeigt. Daneben ist ein Reexpositionstest am Arbeitsplatz oder ein arbeitsplatzbezogener inhalativer Expositionstest möglich.

Beim Test am Arbeitsplatz muss sichergestellt sein, dass die potenziell Asthma induzierende Substanz auch tatsächlich vorhanden ist.

Beim arbeitsplatzbezogenen inhalativen Expositionstest werden im Labor die Arbeitsbedingungen so weit als möglich simuliert. Für viele Noxen sind Routinemethoden für die Generierung definierter Luftkonzentrationen und deren Messung noch zu entwickeln.

Reexpositionstests mit ausschließlich irritativ wirkenden Substanzen (z.B. Chlorgas, Ammoniak) sind in der Regel nicht indiziert.

Bei Provokationstests mit Substanzen, die sowohl irritativ als auch immunologisch wirken (z.B. Isocyanate), sind irritativ wirkende Konzentrationen zu vermeiden. Dies ist durch Erfassung

der Expositionsintensität sicherzustellen. Bei Substanzen, bei denen eine Überwachung der Expositionsintensität nicht möglich ist, sind Untersuchungen an einem Vergleichskollektiv wünschenswert.

Die Provokation mit Staub stellt eine Sonderform des arbeitsplatzbezogenen Expositionstests dar. Sie erfordert speziell konstruierte Expositionskammern oder -systeme; auch einfache Pulverinhalatoren können eingesetzt werden. Bei Provokationen mit staubförmigen Substanzen sollte vor der Testsubstanz eine geeignete Kontrollsubstanz, z.B. Laktosepulver, appliziert werden. Anschließend wird der als Krankheitsursache angesehene Arbeitsstoff in steigender Dosis (Konzentration) verabreicht [5].

Die Zeit der Exposition sollte (bei fehlender Reaktion) in der Regel 30–60 Minuten nicht unterschreiten.

Besondere Bedeutung hat bei nicht standardisierten Tests die Erstellung der Zeit-Wirkungs-Kurve. Es wird empfohlen, nach einer positiven Reaktion in der ersten Stunde alle 10 Minuten die Lungenfunktion zu messen, danach in stündlichen Abständen bis mindestens 8 Std. nach Expositionsende.

4.6 Untersuchungsgang

4.6.1 Untersuchungszeit

Zur Ausschaltung der zirkadianen Rhythmik sollte eine feste Uhrzeit für den Beginn von bronchialen Provokationstests festgelegt werden, vorzugsweise 9.00 Uhr.

4.6.2 Kontrolltag

Es ist wünschenswert, dass einem bronchialen Provokationstest mit Allergenen ein Kontrolltag vorausgeht, damit der Spontanverlauf der Lungenfunktion mit den Ergebnissen nach Provokation verglichen werden kann.

Idealerweise sollte am Kontrolltag die Lungenfunktionsmessung mit der gleichen Methode erfolgen, die beim Provokationstest benutzt wird. Es ist jedoch auch möglich, die Variabilität der Atemwegsobstruktion durch PEF-Monitoring zu erfassen.

Ein Provokationstest mit bronchokonstriktiven Stimuli (z.B. Histamin oder Methacholin) ist am Kontrolltag möglich. Wegen der letztlich unklaren Beziehung zwischen der Reagibilität gegenüber unspezifischen Stimuli und gegenüber Allergenen wird ein Provokationstest mit bronchokonstriktiven Stimuli vor einem Provokationstest mit Allergenen nicht zwingend gefordert. Ein solcher Test ist allerdings ein wichtiges Hilfsmittel bei der Abschätzung der bronchialen Reagibilität, die in die Abschätzung der Anfangsdosis des Allergens mit eingeht.

4.6.3 Inhalationen

Die erste Inhalation erfolgt mit dem Lösungsmittel des Allergenextraktes. Es folgen Allergen-Inhalationen nach einem der u.g. Dosierungsprotokolle (s. 4.7). Da die Sofortreaktion auf Allergen erst nach einem Zeitraum von 20 min ihr Maximum erreichen kann, muss auch das geringste Anzeichen einer Reaktion Anlass zur Unterbrechung einer laufenden Inhalation sein und zu einer zusätzlichen Messung der Lungenfunktion führen. Wegen der relativ langsamen Ausbildung der Reaktion darf ein zeitlicher Abstand von 20 min zwischen den einzelnen Inhalationsstufen nicht unterschritten werden (s. 3.4).

4.6.4 Lungenfunktionsprüfung

Der für die Untersuchung gewählte Lungenfunktionsparameter (sR_{AW} und/oder FEV_1) wird vor dem Test sowie jeweils sofort, 10 und 20 Minuten nach jeder Inhalation gemessen.

4.6.5 Abbruchkriterien

Der Test wird beendet, wenn nach Allergen-Inhalation sR_{AW} um 100% (Verdoppelung) und in den pathologischen Bereich $> 2,0 \text{ hPa} \times s$ gestiegen bzw. wenn FEV_1 um 20% abgefallen ist, jeweils im Vergleich zum Ausgangswert nach Inhalation des Lösungsmittels („Positivkriterium“).

4.6.6 Nachbeobachtung und Spätmessung

Der für den Provokationstest gewählte Lungenfunktionsparameter wird nach Abschluss der Inhalationen zu folgenden Zeitpunkten gemessen: 1 h, 2 h, 5–8 h. Parallel hierzu wird das seit Beginn des Kontrolltages geführte Peak-Flow-Protokoll mit stündlicher Messung während der Tagesstunden weitergeführt. Dies gilt auch dann, wenn keine Sofortreaktion aufgetreten ist, da es auch ohne vorausgegangene Sofortreaktion zu einer Spätreaktion kommen kann. Aus diesem Grunde soll eine Sofortreaktion nur dann mit einem Bronchospasmolytikum behandelt werden, wenn dies klinisch notwendig ist.

Nach der Spätmessung (5–8 h nach Inhalation) kann der Patient nach Hause entlassen werden. Er ist zuvor in die Weiterführung der Peak-Flow-Kontrolle und in evtl. Maßnahmen bei Auftreten einer Spätreaktion einzuweisen.

Sollte ausnahmsweise die Spätreaktion nicht berücksichtigt werden, so kann der Patient nach Gabe eines Bronchospasmolytikums sowie u. U. eines inhalativen Steroids (z. B. 800 μg Budesonid) entlassen werden. Das übliche Peak-Flow-Monitoring sollte trotzdem durchgeführt werden.

4.7 Dosierungsprotokolle

Die nachfolgende Aufzählung von Untersuchungsprotokollen ist nicht erschöpfend, da einige international publizierte Verfahren nicht mehr realisierbar sind, weil hierzu notwendige Komponenten nicht mehr zur Verfügung stehen.

4.7.1 Ruheatmungs-Protokoll

Jede Inhalatstufe wird bei Ruheatmung (normales Atemvolumen und normale Atemfrequenz) für 2 Minuten durch den Mund inhaliert; eine Nasenklemme wird getragen.

Das Aerosol wird im Nebenschluss zu einem kontinuierlich arbeitenden Düsenvernebler für die Dauer von zwei Minuten inhaliert. Bei dem u. a. Vorgehen wird insgesamt Allergen-Aerosol aus ca. 0,52 ml unverdünntem Allergenextrakt inhaliert.

Die Inhalation erfolgt über ein Mundstück. Zur Trennung von In- und Expirationsschenkel kann ein Rückschlagventil benutzt werden. Wenn keine Inhalationskabine benutzt wird, ist der Auslass des Systems mit einem Aerosolfilter mit niedrigem Eigenwiderstand zu versehen, damit eine Kontamination des Untersuchungsraums vermieden wird [12, 40].

Der Untersuchungsgang ist z. B. wie folgt:

1. Es werden unmittelbar vor Untersuchung je 5 ml Inhalat in sterilen Gefäßen vorbereitet: ungedünnter Allergen-Extrakt, Verdünnungsmittel des Extraktes, Verdünnungsreihe des Extraktes im Verhältnis 1 : 2 bis zu der Verdünnung, die als sicher angesehen wird (1 + 0 bis z. B. 1 + 1023). Alle Inhalate müssen vor Untersuchung mindestens 30 min bei Raumtemperatur gelagert werden.
2. 3 ml des Inhalats (beginnend mit dem Lösungsmittel) werden steril (Spritze oder sterile Pipette) in den Vernebler überführt.
3. Spirometrie und/oder Plethysmographie der Messung des Ausgangswertes werden durchgeführt. Die Abbruchschwelle für FEV_1 (Ausgangswert für $FEV_1 \cdot 0,8$) und/oder sR_{AW} (Ausgangswert für $sR_{AW} \cdot 2$ und Erreichen eines pathologischen Bereichs $> 2,0 \text{ hPa} \times s$) werden berechnet.
4. Es wird ein DeVilbiss 646-Vernebler im Nebenstrom benutzt, wobei der Einatemschenkel zum Mundstück führt, der Ausatemschenkel in ein Partikelfilter. Der Vernebler wird mit trockener Pressluft betrieben. Der Druckregler wird auf $3,5 \pm 0,1 \text{ hPa}$ eingestellt. Der Pressluftstrom ist während einer gesonderten Kalibrierung so eingestellt worden, dass der Vernebler $0,13 \pm 0,01 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ des vorgelegten Inhalats vernebelt.
5. Der Patient wird angewiesen, zu entspannen und für 2 min ruhig zu atmen. Eine Nasenklemme wird aufgesetzt und ein Wecker auf 2 min eingestellt.
6. Der Patient wird angewiesen, den Vernebler aufrecht zu halten und das Mundstück in seinen Mund zu nehmen. Vernebler und Wecker werden gestartet.
7. Der Patient wird beobachtet, damit sichergestellt ist, dass er bequem und ruhig atmet, und dass er den Vernebler nicht kippt.
8. Nach genau 2 min wird die Pressluft abgestellt und dem Patienten der Vernebler abgenommen.
9. FEV_1 und/oder sR_{AW} werden sofort, 10 und 20 min nach Verneblungsende gemessen. Bei der Messung des Ausgangswertes und der Messung nach Erreichen des Positiv-Kriteriums (s. 4.6.5) werden Dreifach-Messungen gemacht, ansonsten genügen Einfach-Messungen.
10. Auf jeder Dosis-Stufe werden der höchste FEV_1 - und/oder sR_{AW} -Wert protokolliert.
11. Wenn FEV_1 und/oder sR_{AW} das Positivkriterium (s. 4.6.5) nicht erreicht haben, wird der Vernebler entleert, mit 3 ml der nächsthöheren Inhalatkonzentration beschickt, und es werden die Schritte 5–10 wiederholt.
12. Wenn das Positivkriterium (s. 4.6.5) erreicht oder wenn die Endkonzentration inhaliert worden ist, werden evtl. Symptome (Husten, Atemnot, extrapulmonale Erscheinungen) dokumentiert. Es folgen keine weiteren Allergen-Inhalationen. Bei sehr starker Bronchialobstruktion kann ein kurzwirkendes Bronchospasmolytikum inhalativ verabreicht werden. Die Lungenfunktionsprüfungen sofort, 10 und 20 min nach Inhalationsende erfolgen in der üblichen Weise.
13. Zum weiteren Untersuchungsgang s. 4.8.

4.7.2 Reservoir-Protokoll

Möglicherweise ist auch die von [4] angegebene Reservoirmethode für Provokationstests mit Allergenen geeignet. Da hierzu jedoch noch keine Erfahrungen vorliegen, kann keine Empfehlung für oder gegen dieses Protokoll gegeben werden.

4.7.3 Dosimeter-Protokoll

Ein Dosimeter ist ein automatisches Ventilsystem, das es ermöglicht, von einem Düsenvernebler (Devilbiss Nr. 646 bei 1,4 hPa Arbeitsdruck) erzeugtes Aerosol ausschließlich während der Inspiration zu applizieren. Ein Strömungsfühler aktiviert zu Inspirationsbeginn ein Magnetventil, das den Vernebler mit einer Druckluftquelle für eine Zeit von ca. 0,6 sec. verbindet, so dass ein Aerosolstoß mit Verneblung von 0,9 µl erfolgt [9]. Das Dosimeter muss bezüglich Arbeitsdruck und Verneblungszeit kalibrierbar sein; sein Steuerventil muss in unmittelbarer Verneblernähe liegen. Der Aerosol-Bolus wird während einer tiefen Inspiration für die Dauer von 5 sec. durch den Mund inhaled, ohne dass bei voller Inflation der Atem angehalten wird [9, 59].

Abweichende Dosimeter können verwendet werden. Die mit ihnen erzielten Ergebnisse sollten an der Originalmethode [9] validiert werden.

Bei freier Ausatmung muss der Inhalationsvorgang in einer zwangsentlüfteten Inhalationskabine erfolgen.

Das für Methacholin- und Allergen-Provokationen angegebene Original-Protokoll [9] muss in Anlehnung an Rosenthal et al. [58] dahingehend modifiziert werden, dass auf jeder Dosis-Stufe 30 Atemzüge inhaled werden. Bei 5 Atemzügen pro Dosis-Stufe, wie im Originalprotokoll angegeben, werden pro Stufe 45 µg Inhalat vernebelt, was für Provokationen mit Pharmaka, deren Konzentration nahezu beliebig hergestellt werden kann, ausreichend ist, nicht jedoch für handelsübliche Allergen-Extrakte. Für diese muss das Protokoll die Inhalation von ca. 500 µg unverdünnten Extraktes in der höchsten Inhalat-Konzentration erlauben. Durch die Modifikation beträgt die pro Dosis-Stufe vernebelte Inhalatmenge 270 µl. Beim u.a. Vorgehen wird so insgesamt Allergen-Aerosol aus ca. 0,54 ml unverdünntem Allergenextrakt vernebelt; die Dosierung ist damit der des unter 4.7.1 dargestellten Ruheatmungsprotokolls vergleichbar.

Die Menge des vernebelten Inhalates sollte auf jeden Fall als Menge des unverdünnten Allergen-Extraktes in mg angegeben werden. Eine Angabe in Atemeinheiten (breath units, BU) ist sehr unzuverlässig, da die tatsächliche Abgabe der einzelnen Dosimeter beträchtlich von der vereinbarten Norm (9,0 µl [9]) abweichen kann.

Der Untersuchungsgang ist z. B. wie folgt:

1. Ein kalibriertes (s. 4.4) Dosimeter wird vorbereitet und geprüft.
2. Es werden unmittelbar vor Untersuchung je 5 ml Inhalat in sterilen Gefäßen vorbereitet: unverdünnter Allergen-Extrakt, Verdünnungsmittel des Extraktes, Verdünnungsreihe des Extraktes im Verhältnis 1 : 2 bis zu der Verdünnung, die als sicher angesehen wird (1 + 0 bis z. B. 1 + 1023). Alle Inhalate müssen vor Untersuchung mindestens 30 min bei Raumtemperatur gelagert werden.

3. 2 ml des Inhalats (beginnend mit dem Lösungsmittel) werden steril (Spritze oder sterile Pipette) in den Vernebler überführt.
4. Spirometrie und/oder Plethysmographie der Messung des Ausgangswertes werden durchgeführt. Die Abbruchschwelle für FEV₁ (Ausgangswert für FEV₁ * 0,8) und/oder sR_{AW} (Ausgangswert für sR_{AW} * 2 und Erreichen eines pathologischen Werts > 2,0 hPa × s) werden berechnet.
5. Der Patient wird in die Inhalationskabine gesetzt.
6. Das Dosimeter wird kurz aktiviert, so dass eine sichtbare Aerosolwolke abgegeben wird.
7. Der Patient wird aufgefordert, den Vernebler aufrecht zu halten und das Mundstück in den Mund zu nehmen. Während der gesamten Untersuchung ist er zu beobachten, damit die Inhalation korrekt durchgeführt wird, und damit der Vernebler nicht gekippt wird. Der Patient sollte eine Nasenklemme tragen.
8. Der Patient inhaliert aus der Ruheatmung heraus, beginnend bei FRC, langsam und tief aus dem Vernebler. Das Dosimeter wird entweder automatisch oder manuell nach Inhalationsbeginn aktiviert. Der Patient soll langsam weiter inhalieren (etwa 5 s für einen Atemzug), bis TLC erreicht ist. Die Ausatmung beginnt sofort ohne endinspiratorische Pause.
9. Schritt 8 wird wiederholt, bis 30 Atemzüge inhaled worden sind.
10. FEV₁ und/oder sR_{AW} werden sofort, 10 und 20 min nach Verneblungsende gemessen. Bei der Messung des Ausgangswertes und der Messung nach Erreichen des Positiv-Kriteriums (s. 4.6.5) werden Dreifach-Messungen gemacht, ansonsten genügen Einfach-Messungen.
11. Auf jeder Dosis-Stufe werden der höchste FEV₁- und sR_{AW}-Wert protokolliert.
12. Wenn FEV₁ und/oder sR_{AW} das Positiv-Kriterium (s. 4.6.5) nicht erreicht haben, wird der Vernebler entleert, mit 2 ml der nächsthöheren Inhalat-Konzentration beschickt, und es werden die Schritte 7 – 11 wiederholt.
13. Wenn das Positiv-Kriterium (s. 4.6.5) erreicht oder wenn die Endkonzentration inhaled worden ist, werden evtl. Symptome (Husten, Atemnot, extrapulmonale Erscheinungen) dokumentiert. Es folgen keine weiteren Allergen-Inhalationen. Bei sehr starker Bronchialobstruktion kann ein kurzwirkendes Bronchospasmolytikum inhalativ verabreicht werden. Die Lungenfunktionsprüfungen sofort, 10 und 20 min nach Inhalationsende erfolgen in der üblichen Weise.
14. Zum weiteren Untersuchungsgang s. 4.8.

4.7.4 Therapievernebler-Protokoll („Frankfurter Methode“)

Die Untersuchung muss in einer Inhalationskabine erfolgen.

Für jede Inhalationsstufe (Lösungsmittel und Allergenverdünnungen) wird ein handelsüblicher Düsenvernebler (z. B. Heyer Prallhelmvernebler oder Pari-Vernebler) mit 1,5 ml Inhalat befüllt. Pressluft mit konstantem Druck (z. B. 2 hPa) dient als Energiequelle. Vor Inhalationsbeginn wird der gefüllte Vernebler gewogen (s. 4.4).

Die Inhalation erfolgt bei Ruheatmung, indem der Patient zunächst frei in den Untersuchungsraum ausatmet, dann das Verneblermündstück unter dichtem Abschluss mit den Lippen in den Mund nimmt, den Vernebler durch Knopfdruck aktiviert und ein normales Atemzugvolumen inhaliert. Der Vorgang wird

mit einer freien Exhalation beendet. Er wird solange wiederholt, bis kein sichtbares Aerosol mehr erzeugt wird. Danach wird der Vernebler erneut gewogen und aus der Gewichts­differenz der Inhalatverbrauch ermittelt [29]. Da bei diesem Verfahren stets eine mehr oder weniger große Restmenge im Vernebler verbleibt, ist die Ermittlung der tatsächlich vernebelten Inhalatmenge durch Auswiegen erforderlich. Bei dem u. a. Vorgehen wird Allergen-Aerosol aus ca. 0,8 ml unverdünntem Allergenextrakt vernebelt.

Der Untersuchungsgang ist z. B. wie folgt:

1. Es werden unmittelbar vor Untersuchung je 3 ml Inhalat in sterilen Gefäßen vorbereitet: unverdünnter Allergen-Extrakt, Verdünnungsmittel des Extraktes, Verdünnungsreihe des Extraktes im Verhältnis 1 : 2 bis zu der Verdünnung, die als sicher angesehen wird (1 + 1 bis z. B. 1 + 1023). Alle Inhalate müssen vor Untersuchung mindestens 30 min bei Raumtemperatur gelagert werden.
2. 1,5 ml des Inhalats (beginnend mit dem Lösungsmittel) wird steril (Spritze oder sterile Pipette) in den Vernebler überführt. Der gefüllte Vernebler (bzw. sein Vorratsgefäß) wird mit einer Genauigkeit von 0,001 g gewogen und das Gewicht notiert.
3. Spirometrie und/oder Plethysmographie der Messung des Ausgangswertes werden durchgeführt. Die Abbruchschwelle für FEV₁ (Ausgangswert für FEV₁ * 0,8) und/oder sR_{AW} (Ausgangswert für sR_{AW} * 2 und Erreichen eines pathologischen Werts > 2,0 hPa * s) werden berechnet.
4. Es wird ein Heyer Prallhelmsvernebler im Hauptstrom benutzt, wobei der Patient zur Inspiration das Verneblermundstück in den Mund nimmt und nach Inspirationsbeginn einen Druckknopf zur Vernebleraktivierung betätigt. Der Vernebler wird mit trockener Pressluft betrieben. Der Druckregler wird auf 2,0 ± 0,1 hPa eingestellt.
5. Dem Patienten wird eine Nasenklemme aufgesetzt.
6. Der Patient wird angewiesen, den Vernebler aufrecht zu halten, das Mundstück in seinen Mund zu nehmen und mit der Inhalation zu beginnen.
7. Der Patient inhaliert bei normalem Atemzugvolumen und normaler Atemfrequenz aus dem Mundstück des Verneblers. Zur Exhalation geht der Patient vom Mundstück ab und atmet frei in die Inhalationskabine aus.
8. Der Patient wird beobachtet, damit sichergestellt ist, dass er bequem und ruhig atmet, und dass er den Vernebler nicht kippt.
9. Wenn im Vernebler kein sichtbarer Aerosolnebel mehr erzeugt wird, wird die Inhalation beendet und dem Patienten der Vernebler abgenommen.
10. Der Vernebler wird gewogen. Aus der Gewichts­differenz vor und nach Inhalation wird die abgegebene Inhalat-Menge für diese Dosis-Stufe ermittelt. Diese Menge wird notiert.
11. FEV₁ und/oder sR_{AW} werden sofort, 10 und 20 min nach Verneblungs­ende gemessen. Bei der Messung des Ausgangswertes und der Messung nach Erreichen des Positiv-Kriteriums (s. 4.6.5) werden Dreifach-Messungen gemacht, ansonsten genügen Einfach-Messungen.
12. Auf jeder Dosis-Stufe werden der höchste FEV₁- und/oder sR_{AW}-Wert protokolliert.
13. Wenn FEV₁ und/oder sR_{AW} das Positivkriterium (s. 4.6.5) nicht erreicht haben, wird der Vernebler entleert, mit 1,5 ml der nächsthöheren Inhalat-Konzentration beschickt, und es werden die Schritte 6–12 wiederholt.

14. Wenn das Positivkriterium (s. 4.6.5) erreicht oder wenn die Endkonzentration inhaliert worden ist, werden evtl. Symptome (Husten, Atemnot, extrapulmonale Erscheinungen) dokumentiert. Es folgen keine weiteren Allergen-Inhalationen. Bei sehr starker Bronchialobstruktion kann ein kurzwirkendes Bronchospasmolytikum inhalativ verabreicht werden. Die Lungenfunktionsprüfungen sofort, 10 und 20 min nach Inhalations­ende erfolgen in der üblichen Weise.
15. Die inhalierte Gesamtdosis wird durch Berechnen der Teildosen für jede Dosis-Stufe (Inhalatmenge geteilt durch Verdünnungsverhältnis) und anschließendes Aufsummieren ermittelt.
16. Zum weiteren Untersuchungsgang s. 4.8.

Nachbeobachtungsprotokoll

Die Nachbeobachtung wird bei allen Dosierungsprotokollen in gleicher Weise durchgeführt.

1. Zur Nachbeobachtung werden ab Ende der Inhalationen bis zum Ablauf der 24-Stundenfrist stündlich Peak-Flow-Messungen durchgeführt.
2. FEV₁ und/oder sR_{AW} werden 1 und 2 Stunden nach Inhalations­ende bestimmt.
3. Der Patient kann jetzt das Labor verlassen, muss sich aber weiterhin in der Nähe aufhalten. Ausnahmsweise kann der Patient nach inhalativer Gabe eines Bronchospasmolytikums und eines Kortikoidsteroids nach Hause entlassen werden. Das Peak-Flow-Monitoring muss jedoch weitergeführt werden (s. u.).
4. 5–8 Stunden nach Inhalations­ende werden erneut FEV₁ und/oder sR_{AW} gemessen (Spätmessung).
5. Der Patient wird nochmals über das Peak-Flow-Monitoring und das Verhalten bei einer Verschlechterung des Messwertes und/oder bei Auftreten von Beschwerden instruiert. Er wird aus der Beobachtung entlassen.

5 Definition der Reaktion

Bei qualitativer Auswertung lautet die Beurteilung der Sofortreaktion „positiv“, wenn nach einer Inhalations­stufe oder bis zu zwei Stunden nach der letzten Allergen-Inhalation das Positiv-Kriterium (s. 4.6.5) erreicht worden ist; andernfalls lautet die Beurteilung „negativ“.

Die Beurteilung der Spätreaktion lautet „positiv“, wenn 2–8 Stunden nach der letzten Allergen-Inhalation das Positiv-Kriterium erreicht worden ist, andernfalls lautet die Beurteilung „negativ“.

Bei quantitativer Auswertung ist das Ausmaß der Sofortreaktion definiert als die maximale Verschlechterung (maximaler prozentualer Abfall von FEV₁ und/oder sR_{AW} gegenüber dem Ausgangswert) des benutzten Lungenfunktionsparameters innerhalb der ersten beiden Stunden nach Allergen-Inhalation.

Das Ausmaß der Spätreaktion ist definiert als die maximale Verschlechterung des Lungenfunktionsparameters 2–8 Stunden nach Provokation.

Bei bronchialen Provokationstests mit Allergenen kann nach Allergeninhalation starker Husten auftreten, ohne dass das Positiv-Kriterium erfüllt ist. Dies tritt besonders bei Patienten mit nur

geringgradig erhöhter bronchialer Reagibilität auf [46]. Treten Husten oder extrapulmonale Symptome im Verlauf einer Provokation auf, so ist diese zu beenden und als „klinisch positiv“ zu werten. Die Symptome sind zu dokumentieren.

Husten als isolierte Manifestation der Spätreaktion ist bisher nicht beschrieben worden.

Die Sofortreaktion kann auch als $PC_{xx,Allergen}$ [15] oder $PD_{xx,Allergen}$ [24] ausgedrückt werden. „xx“ gibt hierbei die prozentuale Änderung des Lungenfunktionsparameters an.

Eine durch Allergen-Exposition ausgelöste Zunahme der bronchialen Reaktivität wird im Allgemeinen entweder als die Abnahme von PC_{20} definiert oder als das Verhältnis von PC_{20} vor und nach Provokation.

6 Analyse und Interpretation

6.1 Interpretation der Reaktion

Die bronchiale Reaktion auf Allergen kann qualitativ als Dosis-Wirkungs-Beziehung und als Zeit-Wirkungs-Beziehung betrachtet werden. Die qualitative Interpretation hat ihren Platz bei klinischer Fragestellung, bei welcher geklärt werden soll, ob eine Sensibilisierung „manifest und pathogen“ [34] ist, d. h. ob sie praktische Relevanz besitzt.

Quantitative Vergleiche können nur dann angestellt werden, wenn genau die gleiche Allergen-Dosis verabreicht wurde. Üblicherweise werden Zeit-Wirkungs-Beziehungen über die maximale Reaktion zu einem vorgegebenen Zeitpunkt ausgewertet. Dies kann sowohl für die Früh- wie auch für die Spätreaktion angewendet werden.

Eine Alternative stellt die Bestimmung der Fläche unter der Kurve [1] dar.

6.2 Reproduzierbarkeit

Über die Reproduzierbarkeit der Reaktion werden unterschiedliche Angaben gemacht:

Nach [44] sind die Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve und PD_{20FEV_1} gut reproduzierbar. Nach [37] kann die maximale Reaktion nach Allergen-Inhalation sowohl in der Sofort- als auch in der Spätreaktion mit etwa $\pm 23\%$ reproduziert werden.

Mit reproduzierbaren Untersuchungen kann nur dann gerechnet werden, wenn das benutzte Protokoll in allen Voraussetzungen und Punkten peinlich genau eingehalten wird.

Die Reproduzierbarkeit muss mit anerkannten statistischen Verfahren analysiert werden [10, 42].

6.3 Einsatz zu Forschungszwecken

Die pharmakologische Beeinflussung der allergen-induzierten Reaktion ist ein Modell bei der Entwicklung anti-asthmatischer Pharmaka. Es muss allerdings grundsätzlich hinterfragt werden, ob die Unterdrückung der durch Provokation erzeugten Effekte repräsentativ für die klinische Wirksamkeit ist.

Durch bronchiale Provokationstests mit Allergenen wird eine bronchiale Entzündungsreaktion induziert oder verstärkt, die mit einer vorübergehenden bronchialen Hyperreaktivität einhergeht. Diese Entzündungsreaktion spielt eine wesentliche Rolle für das Verständnis der Pathophysiologie des Asthma bronchiale [14, 51].

Neben der inhalativen Applikation wird für diese und ähnliche Fragestellungen die segmentale Provokation mit endoskopischer Applikation eingesetzt.

7 Zusammenfassung

Obwohl methodische Fragen kein Selbstzweck sind, sind sie sowohl bei klinischen Entscheidungen als auch in der Forschung von Bedeutung. Es ist offensichtlich, dass diese Leitlinie nicht alle Dilemmata auf dem Gebiet der bronchialen Provokationstests mit Allergenen löst. Es müssen noch zahlreiche nicht abgedeckte oder kontrovers diskutierte Fragen aufgeklärt werden.

Konsequenterweise sollte die Verbesserung und Standardisierung von bronchialen Provokationstests ein ständiges Bemühen sein. In der Folge sollen einige der geklärten und einige der offenen Probleme dargestellt werden.

7.1 Allgemeines

- Provokationstests sind als sicher anzusehen, wenn sie entsprechend dieser Leitlinie durchgeführt werden.
- Standardisierte und validierte Untersuchungsprotokolle sollten benutzt werden, denn sie gestatten den Vergleich mit publizierten Daten.
- Neu entwickelte und möglicherweise bessere Methoden sollten in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit den jetzigen Standardverfahren überprüft werden.

7.1.1 Methodik

- Für Forschungszwecke muss die Verneblerleistung für jedes einzelne Exemplar bekannt sein. Bei kurzen Verneblungszeiten kann die Dosisermittlung auch durch Auswiegen vor und nach Inhalation erfolgen;
- für Forschungszwecke sollte immer derselbe Vernebler unter identischen Randbedingungen (Betriebsdruck, Füllvolumen, Verneblungsdauer) benutzt werden;
- es sind drei Protokolle standardisiert (Ruheatmungs-Methode, Dosimeter-Methode, Frankfurter Methode);
- für das Ruheatmungs-Protokoll werden eine zweiminütige Inhalation, eine Verneblerleistung von 0,13 ml/min und verdoppelte Konzentrationen empfohlen;
- für das Dosimeter-Protokoll sollten verdoppelte Konzentrationen mit 30 Atemzügen von 9 μ l pro Inhalationsstufe benutzt werden;
- FEV_1 und/oder sR_{AW} sind die Lungenfunktionsmethoden der Wahl;
- die Anfangskonzentration des Allergenextraktes muss aufgrund der individuellen Verhältnisse des Patienten festgelegt werden.

7.2 Forschungsbedarf

- Ist der Ausfall eines bronchialen Provokationstests mit Allergenen aus dem Ergebnis eines Provokationstests mit Histamin oder Methacholin und dem Ergebnis einer Hauttitration mit dem infrage stehenden Allergen quantitativ vorhersagbar?
- Welche Allergendosis führt zu sicheren, spezifischen und sensitiven Provokationsergebnissen; d.h. wie ist die Allergendosis zu ermitteln, die den natürlichen Expositionsbedingungen entspricht?
- Es besteht Forschungsbedarf hinsichtlich der Vergleichbarkeit der hier aufgeführten Methoden.
- Allergenextrakte müssen standardisiert werden; bzw. vorhandene Standards müssen angewandt werden.
- Die Effekte einer medikamentösen Begleittherapie müssen untersucht werden.

7.3 Weiterentwicklung der Leitlinie

Diese Leitlinie sollte in fünf Jahren auf Aktualität überprüft werden. Bis dahin sollten formalisierte Verfahren der Evidenzbeurteilung in den Erstellungsprozess eingeführt werden.

Literatur

- 1 Aalbers R, Kauffman HF, Koëter GH, Postma DS, de Vries K, de Monchy GJR. Dissimilarity in methacholine and adenosine 5'-monophosphate responsiveness 3 and 24 hours after allergen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 352 – 357
- 2 Aas K. The bronchial provocation test. Springfield: Thomas, 1975
- 3 American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing – 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 309 – 329
- 4 Arbeitskreis Bronchiale Provokationstests. Leitlinien für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit pharmakologischen Substanzen. *Pneumologie* 1998; 52: 214 – 220
- 5 Baur X, Huber H, Degens PO, Allmers H, Ammon J. Relation between occupational asthma case history, bronchial methacholine challenge and specific challenge test in patients with suspected occupational asthma. *Am J Ind Med* 1998; 33: 114 – 122
- 6 Bruce CA, Rosenthal RR, Lichtenstein LM, Norman PS. Diagnostic tests in ragweed-allergic asthma. A comparison of direct skin tests, leukocyte histamine release, and quantitative bronchial challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1974; 53 (4): 230 – 239
- 7 Bryant DH, Burns MW, Lazarus L. The correlation between skin tests, bronchial provocation tests and the serum level of IgE specific for common allergens in patients with asthma. *Clin Allergy* 1975; 5: 145 – 157
- 8 Bryant DH, Burns MW. Bronchial histamine reactivity: its relationship to the reactivity of the bronchi to allergens. *Clin Allergy* 1976; 6: 523 – 532
- 9 Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, Sheffer AL, Spector SL, Townley RG. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 56: 323 – 327
- 10 Chinn S. Repeatability and method comparison. *Thorax* 1991; 46: 454 – 456
- 11 Cockcroft DW, Hurst TS, Gore BP. Importance of evaporative water losses during standardized nebulized inhalation provocation tests. *Chest* 1989; 96: 505 – 508
- 12 Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJA, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1977; 7: 235 – 243
- 13 Cockcroft DW, Ruffin RE, Dolovich J, Hargreave FE. Allergen-induced increase in nonallergic bronchial reactivity. *Clin Allergy* 1977; 7: 503 – 513
- 14 Cockcroft DW. Modulation of airway responsiveness. *Ann Allergy* 1988; 60: 465 – 471
- 15 Cockcroft DW, Murdoch KY, Kirby J, Hargreave FE. Prediction of airway responsiveness to allergen from skin sensitivity to allergen and airway responsiveness to histamine. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 264 – 267
- 16 Cockcroft DW. Airway hyperresponsiveness: therapeutic implications. *Ann Allergy* 1987; 59: 405 – 414
- 17 Cockcroft DW. Bronchial inhalation test II. *Ann Allergy* 1987; 59: 89 – 99
- 18 Cropp GJA, Bernstein IL, Boushey HA, Hyde RW, Rosenthal RR, Spector SL, Townley RG. Guidelines for bronchial inhalation challenges with pharmacologic and antigenic agents. *ATS News*, 1980: 11 – 19
- 19 Dierkes-Globisch A, Merget R, Bergmann E-M, Schultze-Werninghaus G. Fehlende Assoziation von Hautsensibilisierung, spezifischer und unspezifischer bronchialer Reaktivität beim Hausstaubmilbenasthma. *Allergo J* 1997; 6: 127 – 132
- 20 Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Horwarth PH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 434 – 457
- 21 Durham SR, Craddock CF, Cookson WO, Benson MK. Increases in airway responsiveness to histamine precede allergen-induced responses. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 764 – 770
- 22 Eiser NM, Kerrebijn KF, Quanjer PhH. Guidelines for standardization of bronchial challenges with (nonspecific) bronchoconstricting agents. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1983; 19: 495 – 514
- 23 Eiser NM. Bronchial provocation tests. In: Nadel JA, Pauwels R, Snashdall PD (Hrsg). *Bronchial Hyperresponsiveness*. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne: Blackwell, 1987: 173 – 254
- 24 Frølund L, Madsen F, Scharling B, Heinig JH, Svendsen UG. Bronchial allergen challenge: dose versus concentration. *Clin exp Allergy* 1992; 22: 219 – 225
- 25 Fuchs E, Gronemeyer W. Die Beziehung von Provokationstesten zu Anamnese und Hautreaktion beim Asthma bronchiale. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1959; 65: 848 – 851
- 26 Gayraud P, Orehek J, Grimaud C, Charpin J. Bronchoconstrictor effects of a deep inspiration in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111: 433 – 439
- 27 Gimeno F, Berg WChr, Sluiter HJ, Tammeling GJ. Spirometry-induced bronchial obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1972; 105: 68 – 74
- 28 Gonsior H (Hrsg). Richtlinien für die Durchführung von bronchialen Provokationen mit Allergenen und pharmakodynamischen Substanzen bei obstruktiven Atemwegserkrankungen. *Allergologie* 1984; 7: 238 – 242
- 29 Gonsior E, Krüger M, Meier-Sydow J. Influence of physiological method and criterion of evaluation on results of bronchial antigen provocation tests. In: Herzog H (Hrsg). *Asthma Volume 14*. *Prog Respir Res*, 1980: 104 – 108
- 30 Gonsior E, Meier-Sydow J, Thiel CI. Routine application of bodyplethysmography in bronchial antigen challenge. *Bull Physiopath Respir* 1972; 8: 519 – 520
- 31 Gonsior E. Bronchialtest. In: Fuchs E, Schulz K-H (Hrsg). *Manuale allergologicum*. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, 1995: IV.8.1 – IV.8.13
- 32 Gronemeyer W, Fuchs E. Der inhalative Antigen-Pneumometrie-Test als Standard-Methode in der Diagnose allergischer Krankheiten. *Int Arch Allergy* 1959; 14 (3-4): 217 – 240
- 33 Hansen K. Die spezielle Diagnostik bei allergischen Krankheiten. In: Berger W, Hansen K (Hrsg). *Allergie*, Kap. 10. Leipzig: Thieme, 1940: 256 – 257
- 34 Hansen K. Die spezielle Diagnostik bei allergischen Krankheiten. In: Berger W, Hansen K (Hrsg). *Allergie*, Kap. 10. Leipzig: Thieme, 1940: 265 – 266
- 35 Hargreave KF, Fink JN, Cockcroft DW, Fish JE, Holgate EH, Ramsdale ST, Roberts RS, Shapiro D, Sheppard D. The role of bronchoprovocation. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 517 – 524
- 36 Harris LH. Experimental reproduction of mold allergy. *J Allergy* 1941; 12: 279 – 289
- 37 Inman MD, Watson R, Cockcroft DW, Wong BJ, Hargreave FE, O'Byrne PM. Reproducibility of allergen-induced early and late asthmatic responses. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1191 – 1195
- 38 Jeffrey PK. Morphology of the airway wall in asthma and in chronic pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1152 – 1158
- 39 Jörres R, Nowak D, Magnussen H, Speckin P, Koschyk S. The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 56 – 64
- 40 Juniper EF, Frith PA, Dunnett C, Cockcroft DW. Reproducibility and comparison of response to inhaled histamine and methacholine. *Thorax* 1978; 33: 705 – 710
- 41 Kappos A, Gonsior E, Schultze-Werninghaus G, Giese D. Zur Interpretation der Unterschiede bei plethysmographischer oder oszillatori-

- scher Bestimmung des Atemwiderstandes. *Prax Pneumol* 1981; 35: 772–775
- ⁴² Knox AJ, Wisniewski A, Cooper S, Tattersfield AE. A comparison of the yan and a dosimeter method for methacholine challenge in experienced and unexperienced subjects. *Eur Respir J* 1991; 4: 497–502
- ⁴³ Kongerud J, Soyseth V, Johannsen B. Room temperature influences output from the wright nebulizer. *Eur Respir J* 1989; 2: 681–684
- ⁴⁴ Kopferschmitt-Kubler MC, Bigot H, Pauli G. Allergen bronchial challenge tests: variability and reproducibility of the early response. *J Allergy* 1987; 80: 730–740
- ⁴⁵ Løwenstein H. Report on behalf of the international union of immunological societies (IUIS) allergen standardization subcommittee. *Arb Paul Ehrlich Inst* 1983; 63 (suppl 4): 542–545
- ⁴⁶ McFadden jr ER. Exertional dyspnea and cough as preludes to acute attacks of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1975; 292: 555–559
- ⁴⁷ Melillo G, Aas K, Cartier A, Davies RJ, Debeliè M, Dreborg S, Kerrebijn KF, Lassen A, Pinto Mendes J, Rizzo A, Rosenthal RR, Tateishi S, Coosco R. Guidelines for the standardization of bronchial provocation tests with allergens. An update by an international committee. *Allergy* 1991; 46: 321–329
- ⁴⁸ Mellilo G, Bonini S, Cocco G, Davies RJ, de Monchy JGR, Frølund L, Pelikan Z. Provocation tests with allergens (report). *Allergy* 1997; 52 (Suppl 35): 5–36
- ⁴⁹ Merget R, Dierkes A, Rueckmann A, Bergmann E-M, Schultze-Werninghaus G. Absence of relationship between degree of non-specific and specific bronchial responsiveness in occupational asthma due to platinum salts. *Eur Respir J* 1996; 9: 211–216
- ⁵⁰ Newball HH. The unreliability of the maximal midexpiratory flow as an index of acute airway changes. *Chest* 1975; 67: 311–314
- ⁵¹ O'Byrne PM. Allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 119–127
- ⁵² Olive JT, Hyatt RE. Maximal expiratory flow and total respiratory resistance during induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1972; 106: 366–376
- ⁵³ Österreichische Gesellschaft für Lungenerkrankungen und Tuberkulose. Arbeitsgemeinschaft für klinische Atemphysiologie. Empfehlungen zur Standardisierung der inhalativen Provokation zur Messung der unspezifischen bronchialen Reagibilität. *Prax Klin Pneumol* 1986; 40: 356–364
- ⁵⁴ Pastorello EA, Incorvaia C, Ortolani C, Bonini S, Canonica GW, Romagnani S, Tursi A, Zanussi C. Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I. Definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 96: 580–587
- ⁵⁵ Pliss LB, Ingenito EP, Ingram RH. Responsiveness, inflammation, and effects of deep breaths on obstruction in mild asthma. *J Appl Physiol* 1989; 66: 2298–2304
- ⁵⁶ Popa V, Teculescu D, Stănescu D, Gavrilăscu N. The value of inhalation tests in perennial bronchial asthma. *J Allergy* 1968; 42 (3): 130–139
- ⁵⁷ Quanjer PhH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R. Lung volumes and forced ventilatory flows. *Eur Respir J* 1993; 6 (Suppl. 16): 4–39
- ⁵⁸ Rosenthal RR, Bruce CA, Lichtenstein LL, Norman PS. The role of inhalation challenge. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1975; 49: 89–94
- ⁵⁹ Ryan G, Dolovich MB, Obminski G, Cockcroft DW, Juniper EF, Hargreave FE, Newhouse MT. Standardization of inhalation provocation tests: influence of nebulizer output, particle size and method of inhalation. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67: 156–161
- ⁶⁰ Scott GR, Küng M. How many spirometers for a histamine challenge? *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 268–271
- ⁶¹ Spector SL, Farr R. Bronchial inhalation challenge with antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64: 580–586
- ⁶² Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PhH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, Juniper EF, Malo J-L. Airway responsiveness: Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J* 1993; 6 Suppl. 16: 53–83
- ⁶³ Sterk PJ, Plomp A, Van de Vate JF, Quanjer PhH. Physical properties of aerosols produced by several jet and ultrasonic nebulizers. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1984; 20: 65–72
- ⁶⁴ Stevens FA. A comparison of pulmonary and dermal sensitivity to inhaled substances. *J Allergy* 1934; 5: 285–287
- ⁶⁵ Summers QA. Inhaled drugs and the lung. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 259–268
- ⁶⁶ WHO Expert committee on biological standardization. Guidelines for the preparation and establishment of reference materials and reference reagents for biological substances. WHO, technical report, 1978