

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Matthias Goebeler

**Der modifizierte Lymphozytentransformationstest in der Diagnostik
einer T-Zell-vermittelten Allergie (Typ-IV-Allergie) gegen Aminopenicilline**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johanna Pia Heger

aus Heidelberg

Würzburg, Mai 2014

Referent: Prof. Dr. med. Axel Trautmann

Korreferent: Prof. Dr. med. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2015

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1 Einleitung	1
1.1 Allergien.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Klassifikation.....	1
1.2 Unerwünschte Arzneimittelreaktionen.....	5
1.2.1 Definition.....	5
1.2.2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei (Amino-)Penicillinen.....	7
1.3 In-vivo und in-vitro Testung	8
1.3.1 In-vivo-Methoden.....	9
1.3.2 In-vitro-Methoden	10
1.4 Ziel und Fragestellung der Arbeit	13
2 Patienten, Material und Methoden	14
2.1 Patienten	14
2.2 Materialien.....	15
2.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien.....	15
2.2.2 Verbrauchsmittel	16
2.2.3 Technische Hilfsmittel.....	16
2.3 Methoden.....	17
2.3.1 Lymphozytenisolierung aus dem peripheren Blut.....	17
2.3.2 Lymphozytentransformationstest (LTT)	17
2.3.3 Bestimmung des Stimationsindex (SI).....	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Klinische Symptome	20
3.2 Allergologische Routinediagnostik: allergenspezifisches IgE, Hauttestung und Exposition.....	20
3.3 Proliferation im LTT	21
3.3.1 Sensitivität	22
3.3.2 Spezifität.....	26

	<u>Seite</u>
4 Diskussion	32
4.1 Sensitivität des LTT	33
4.2 Spezifität des LTT	34
4.3 Ist die Modifikation des LTT sinnvoll?.....	36
4.4 Die Rolle von CD3/CD28	36
4.5 Verbesserungsvorschläge zur Modifikation des LTT	37
4.6 Technische Probleme des LTT	38
4.7 Ist der LTT ein geeignetes diagnostisches Mittel?.....	40
4.8 Ausblick.....	40
5 Zusammenfassung	42
6 Literaturverzeichnis	44
7 Abkürzungsverzeichnis	50
Abbildungsverzeichnis	53
Tabellenverzeichnis	54
Danksagung	
Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Allergien

1.1.1 Definition

Die Hauptfunktion des Immunsystems besteht darin, Bestandteile von pathogenen Mikroorganismen zu erkennen und eine geeignete Immunantwort zu erzeugen, um das pathogene Agens zu eliminieren. Voraussetzung für eine spezifische Immunreaktion ist daher die Fähigkeit, zwischen potentiell gefährlichen oder harmlosen, körpereigenen oder körperfremden Stoffen beziehungsweise Molekülstrukturen zu unterscheiden. Bei der Entstehung einer Allergie wird eine ungefährliche oder unschädliche Substanz vom Immunsystem fälschlicherweise als pathogen eingestuft. Letztendlich kommt es zu einer inadäquaten und übersteigerten Reaktion des Immunsystems gegen das Allergen mit einer entsprechenden klinischen Symptomatik. Als Folge der Allergenexposition können spezifische Erkrankungen der Haut, der Lunge, des kardiovaskulären Systems und/oder des Gastrointestinaltrakts auftreten (Laubenthal & Hugler, 1998).

Zu den Substanzen, die unerwünschte allergische (das heißt immunologisch-vermittelte) Überempfindlichkeitsreaktionen verursachen können, gehören auch Medikamente (Demoly, Pichler, Pirmohamed, & Romano, 2008).

1.1.2 Klassifikation

Nach der ursprünglichen Klassifikation von Coombs und Gell werden vier Typen von Allergien aufgrund unterschiedlicher Pathomechanismen unterschieden (Coombs, 1968). Während die ersten drei Reaktionstypen (Typ I–III) durch Antikörper vermittelt werden, spielen bei der Typ IV-Reaktion aktivierte T-Zellen eine entscheidende Rolle (siehe Tabelle 1; DeSwarte, 1986; Descotes & Choquet-Kastylevsky, 2001). Am häufigsten sind die Typ I- und Typ IV-Allergien (Pichler, 2003), daher werden diese im Folgenden detaillierter beschrieben.

Tab. 1: Klassifikation der Allergien nach Coombs & Gell (Coombs, 1968)

	Typ I Anaphylak- tischer Typ	Typ II Zytotoxischer Typ	Typ III Immunkom- plex Typ	Typ IV T-ZellTyp
Immun- komponente	IgE-Antikörper Th2-Zellen	IgG-/IgM- Antikörper	IgG-Antikörper	T-Zellen
Allergene	löslich	zell-/matrix- assoziiert	löslich	löslich, zell- assoziiert
Latenzzeit	Sekunden bis Minuten	Stunden bis Tage	6 bis 8 Stunden	12 bis 72 Stun- den
Symptome	Rhinokonjunktivitis allergica Allergisches Asthma Anaphylaxie Urtikaria	Agranulozytose Thrombozyto- penie Transfusions- zwischenfälle	Leukozyto- klastische Vas- kulitis Exogen- allergische Al- veolitis	Kontaktekzeme Exantheme Tuberkulin- reaktion

IgE, IgG, IgM = Immunglobuline der Klassen E, G, M, Th2-Zellen = T-Helferzellen Typ 2

Typ I: Anaphylaktischer Typ

Die anaphylaktische Reaktion ist eine Sofortreaktion. Die Symptomatik beginnt innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Kontakt zwischen dem Allergen und den Immunglobulin E-(IgE)-sensibilisierten Mastzellen und Basophilen. IgE-Antikörper haben die Eigenschaft, sich mit ihrer Fc-Domäne an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) der Mastzellen und basophilen Granulozyten zu binden. Nach Allergenkontakt werden diese kreuzvernetzt, woraufhin die IgE-tragenden Zellen aktiviert werden. Dabei kommt es zur raschen Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Degranulation) wie Histamin und Leukotrienen, die für die Symptomatik einer Typ I-Allergie verantwortlich sind. Die klinischen Symptome können sich an der Haut in Form einer Urtikaria, am oberen Respirationstrakt als Rhinokonjunktivitis allergica oder an der Lunge als allergisches Asthma manifestieren. Ursächlich für die Symptomatik ist die durch die Entzündungsmediatoren – allen voran Histamin – ausgelöste Weitstellung der Gefäße mit konsekutiv erhöhter Gefäßpermeabilität, was die rasche Bildung von Ödemen zur Folge hat. Kommt es zu einer ungezügelter allergischen Kaskade, zum Beispiel bei einer IgE-vermittelten Penicillinallergie, kann es im Extremfall zu einem potentiell lebensgefährlichen anaphylaktischen Schock kommen (Pichler, 2003).

Typ II (zytotoxischer Typ) und Typ III (Antikörper-abhängiger Immunkomplex-Typ)

Beide Formen werden durch Antikörper vermittelt. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass sich das Zielantigen bei Typ II-Reaktionen an der Oberfläche von Zellen und Geweben befindet, während bei der Typ III-Reaktion das Allergen in löslicher Form vorliegt. Bei der Typ III-Reaktion kann es über die Ablagerung von Allergen-Antikörper-Komplexen zu Entzündungen in unterschiedlichen Organen kommen. Typische Vertreter einer Typ II-Allergie sind die verschiedenen Zytopenien (z. B. die Agranulozytose), bei der Typ III-Reaktion die Serumkrankheit. Arzneimittelreaktionen vom Spättyp können manchmal neben der klassischen T-Zell-vermittelten (Typ IV)-Pathogenese Überlappungen zu Typ II- und Typ III-Reaktionen aufweisen. Ursache hierfür sind Arzneimittel-spezifische pathogene IgG-Antikörper (Uzzaman & Cho, 2012).

Typ IV: T-Zell-vermittelter Typ

Diese Form der Allergie basiert auf einer Wechselwirkung zwischen Allergen und T-Zellen mit anschließender Rekrutierung weiterer aktivierter Zelltypen (Padovan, von Greyerz, Pichler, & Weltzien, 1999). Zu den klassischen Vertretern dieses Typs zählen die Tuberkulin-Reaktion und die Kontaktallergie. Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist mit einem Gipfel nach 24 bis 48 Stunden im Vergleich zu Typ I- und Typ III-Reaktionen stark verzögert, man spricht daher auch von einer Spätreaktion. In der allergologischen Diagnostik dient der Epikutantest (ECT) dem Nachweis einer Typ IV-Allergie. Darüber hinaus ist der ECT ein wichtiger diagnostischer Baustein in der Diagnostik einer Arzneimittelallergie. Die immunpathologischen Mechanismen einer Arzneimittelallergie sind bislang nur unzureichend verstanden. Zurzeit werden hauptsächlich zwei Hypothesen diskutiert:

a) Das Hapten-Carrier-Modell

Beim Hapten-Carrier-Modell geht man davon aus, dass die niedermolekularen Arzneimittel (Haptene) nur in Verbindung mit einem körpereigenen Trägerprotein (Carrier) als Allergen wirken und Immunreaktionen auslösen können (siehe Abbildung 1). Der Hapten-Carrier-Komplex wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und schließlich durch Kopplung an den Haupthistokompatibilitätskomplex (major-histocompatibility-complex, MHC)-Klasse II naiven CD4+ T-Zellen präsentiert.

Dadurch werden CD4⁺ T-Zellen, die den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) tragen, aktiviert und schütten Mediatoren aus, die eine Entzündungsreaktion auslösen können (Hausmann, Schnyder, & Pichler, 2010).

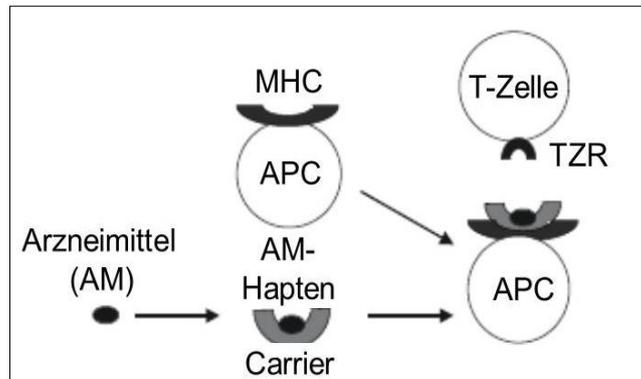


Abb. 1: Das „Hapten-Carrier-Modell“

APC, Antigen-präsentierende Zelle; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; TZR, T-Zell-Rezeptor. Modifiziert nach Schnyder & Pichler (2009) in „Mechanisms of drug-induced allergy“.

b) Das „p-i-Konzept“

Das “pharmacological interactions of drugs with immune receptors” (p-i)-Konzept postuliert, dass bestimmte Arzneimittel Immunreaktionen auslösen können, ohne vorher chemisch über den Metabolismus oder physikalisch über Protein-Protein-Interaktionen verändert worden zu sein (Pichler et al., 2006).

Hierbei soll das Arzneimittel über nicht-kovalente Bindungen zufällig an einen MHC-Komplex oder aber direkt an einen TZR binden. Bei ausreichender Affinität dieser Bindungen wird eine Immunantwort initiiert (siehe Abbildung 2). Eine experimentelle Bestätigung dieser Hypothese steht aber noch aus (Pichler, 2002; Pichler et al., 2006; Posadas & Pichler, 2007).

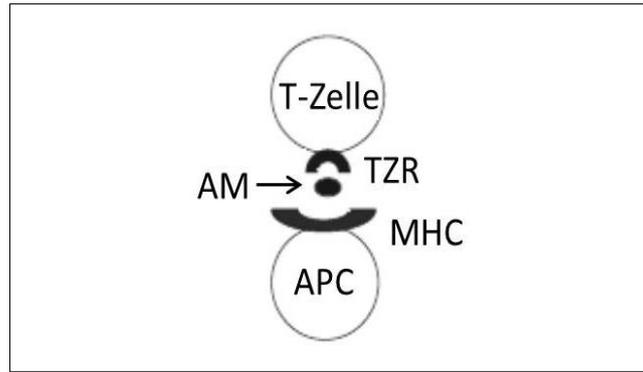


Abb. 2: "Pharmacological interactions of drugs with immune receptors"(p-i)-Konzept
 AM, Arzneimittel; APC, Antigen-präsentierende Zelle; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; TZR, T-Zell-Rezeptor. Modifiziert nach: Schnyder & Pichler (2009) in „Mechanisms of drug-induced allergy“.

1.2 Unerwünschte Arzneimittelreaktionen

1.2.1 Definition

Eine unerwünschte Arzneimittelwirkung (UAW) ist laut der Definition der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization / WHO) grundsätzlich eine Medikamentennebenwirkung, die unerwartet auftritt und sich negativ auf den menschlichen Organismus auswirkt. Sie tritt bei einer Dosierung auf, die normalerweise toleriert wird ("International drug monitoring: the role of national centres. Report of a WHO meeting," 1972). Eine UAW ist relativ häufig und kann schwerwiegende, unter Umständen sogar lebensbedrohliche Reaktionen, hervorrufen (Rieder, 1993).

Epidemiologische Studien zeigen, dass bei medikamentösen Therapien bei circa 5–10 % der Patienten eine UAW auftritt, wobei hospitalisierte (10 %) Patienten häufiger betroffen sind als ambulant Behandelte (Gomes & Demoly, 2005). Eine Studie aus dem Jahr 1980 ergab, dass 1–10 % der Patienten allergische Reaktionen auf Penicillin-haltige Medikamente entwickelten (Chandra, Joglekar, & Tomas, 1980). In neueren Berichten wurden allergische Reaktionen auf Medikamente bei 1,8–15,1 % der hospitalisierten Patienten beobachtet (Demoly & Bousquet, 2001; Hausmann et al., 2010).

Zwei Arten der UAW werden unterschieden (siehe Tabelle 2, Rawlins, 1981):

- Typ-A-Reaktionen (A = „augmented reactions“) sind mit 80 % die häufigsten und werden durch pharmakologische oder toxische Eigenschaften des Medikamentes ausgelöst. Sie sind dosisabhängig und in der Regel vorhersehbar.

- Bei den Typ-B-Reaktionen (B = „bizarre reactions“, 20 %) handelt es sich entweder um allergische Reaktionen des Immunsystems oder um Intoleranzreaktionen (sogenannte Pseudoallergien). Beide Reaktionen unterscheiden sich durch ihre Dosisabhängigkeit. Während erstere nur in geringem Maße dosisabhängig sind, zeichnen sich letztere durch eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Dosis aus. Gemeinsam ist beiden Reaktionen, dass sie nicht mit den pharmakologischen Eigenschaften des Medikaments zu tun haben und daher unvorhersehbar sind (Schnyder & Pichler, 2009).

Tab. 2: Klassifikation der unerwünschten Arzneimittelwirkungen
 Modifiziert nach Schnyder & Pichler (2009)

Typ-A-Reaktionen	Typ-B-Reaktionen
80 % aller Arzneireaktionen vorhersehbar/dosisabhängig Normalpersonen Pathomechanismus: – pharmakologische Nebenwirkung – dosisabhängige Toxizität – Wechselwirkung mit anderen Medikamenten	20 % aller Arzneireaktionen nicht vorhersehbar individuell disponierte Personen Pathomechanismus: – Intoleranzreaktionen – allergische Reaktionen

Unter der UAW nehmen Arzneimittelallergien eine Sonderstellung ein. Die Diagnose ist besonders schwierig. Arzneimittelallergien zeigen ein breites Spektrum klinischer Symptome, die sich teilweise mit den Symptomen der Grunderkrankung überlappen können. Für eine Langzeitprophylaxe ist eine genaue allergologische Diagnostik unverzichtbar (Rieder, 1997).

1.2.2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei (Amino-)Penicillinen

Die Gruppe der Penicilline gehört immer noch zu den am häufigsten verordneten Antibiotika. Es handelt sich chemisch um β -Lactam-Antibiotika, deren gemeinsames strukturelles Merkmal ein viergliedriger β -Lactamring ist. Dieser β -Lactamring ist hauptverantwortlich für die antibakterielle Wirkung (siehe Abbildung 3). Das Wirkspektrum der verschiedenen β -Lactame umfasst die meisten Gram-positiven Bakterien und Gram-negativen Kokken. Daher werden diese Antibiotika bei zahlreichen bakteriellen Infektionen standardmäßig eingesetzt. Durch die von zahlreichen Bakterien gebildete β -Lactamase kann es zu einer Resistenzentwicklung kommen. Um dieser entgegenzuwirken, werden Seitenketten an den β -Lactamring angefügt, die die β -Lactamase sterisch hemmen können. Diese Penicilline besitzen zwar neue wünschenswerte antibakterielle und pharmakologische Eigenschaften, zeigen aber gleichzeitig auch eine erhöhte allergene Potenz, da diese Seitenketten gleichzeitig allergene Determinanten sein können (Münch, 1981; Karow & Lang-Roth, 2008).

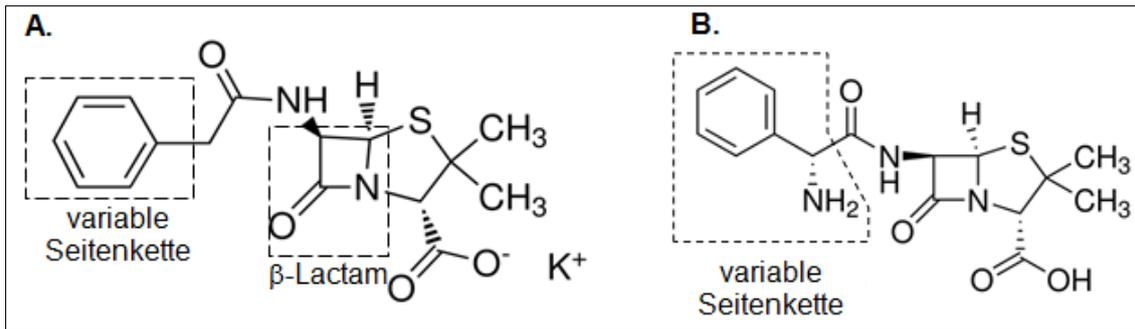


Abb. 3: Strukturformel des Penicillin G (A) und des Ampicillin (B).

Ampicillin ist ein halbsynthetisches Penicillinderivat, das auf Grund der Aminobenzyl-Seitenkette, sowohl gegen Gram-positive als auch gegen Gram-negative Keime wirkt (siehe Abbildung 3). Hauptsächlich wird es bei Otitiden, akuten Bronchitiden und bei der Streptokokken-Angina eingesetzt. Darüber hinaus ist es ein essentieller Bestandteil der *Helicobacterpylori*-Eradikationstherapie (Karow & Lang-Roth, 2008).

Obwohl die Behandlung mit Penicillinen zu den effektivsten und sichersten Antibiotika-Therapien zählt, hat diese Stoffklasse im Gegensatz zu anderen Antibiotika-Klassen eine vergleichsweise größere „allergene Potenz“. Zwar ist die genaue Prävalenz nicht bekannt, die Inzidenz wird aber auf 1–10 % geschätzt (Lin, 1992). Bei den Aminopenicillinen manifestiert sich die allergische Reaktion klinisch am häufigsten als klassische T-Zell-vermittelte Typ IV-Allergie mit makulo-papulösem Exanthem (DeShazo & Kemp, 1997). Im Rahmen einer solchen Typ IV allergischen Immunreaktion können aber auch innere Organe, allen voran Leber und Nieren mitbetroffen sein (Schnyder & Pichler, 2000). Die schweren bullösen Hautreaktionen wie Stevens-Johnson-Syndrom oder toxisch-epidermale Nekrolyse (TEN) haben dagegen eine gänzlich andere Pathogenese und werden nur sehr selten durch β -Lactamantibiotika verursacht (Thong, 2010).

1.3 In-vivo und in-vitro Testung

In der Allergiediagnostik kommen modular gestaffelt unterschiedliche Testmethoden zum Einsatz. Zunächst bedarf es einer sorgfältigen Anamnese mit einer möglichst genauen Klassifikation der klinischen Symptome. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die allergologische Anamnese in der Regel retrospektiv erfolgt, die Abgrenzung eines makulo-papulösen Arzneimittellexanthems von einem parainfektiosen Exanthem lediglich aufgrund von anamnestischen Angaben ist schwierig. Zusätzliche in-vivo und in-

in vitro Methoden zur Allergietestung sind daher unverzichtbare weitere Bausteine der Allergiediagnostik. Keine dieser Testverfahren verfügt alleine über eine ausreichende Sensitivität und Spezifität. Daher wird immer wieder ausdrücklich auf die Notwendigkeit der Kombination von Anamnese und verschiedenen Allergietests hingewiesen, deren Ergebnisse dann in einer Zusammenschau interpretiert werden müssen (Pichler & Tilch, 2004).

1.3.1 In-vivo-Methoden

In-vivo Verfahren zur Allergiediagnose werden wegen ihrer leichten Durchführbarkeit im klinischen Alltag am häufigsten eingesetzt. Zu diesen Hauttestverfahren gehören der Haut-Pricktest (Skin Prick Test, SPT), der Epikutantest (ECT, unter Umständen modifiziert als Tesafilm-Abrisstest) sowie der Intrakutantest (ICT).

Haut-Pricktest (SPT) zum Nachweis von Typ I-Allergien

Der SPT ist der am einfachsten durchzuführende und gleichzeitig nebenwirkungsärmste Hauttest (Reid, Lockey, Turkeltaub, & Platts-Mills, 1993). Lösungen der zu testenden Substanzen werden auf der Innenseite des Unterarms aufgetragen. Danach wird die Haut an den Stellen, an denen die Substanzen aufgetragen wurden, mit einer spitzen Nadel punktiert, so dass $\sim 0,02 \mu\text{L}$ in die obere Dermis eindringen können. Nach 15–20 Minuten kann eine Sofortreaktion abgelesen werden (Heinzerling et al., 2013). Der Test wird als positiv bewertet, wenn die resultierende Quaddel mindestens einen Durchmesser von 3 mm erreicht. Als Negativkontrolle dient in der Regel 0,9 %ige isotonische Kochsalzlösung. Als Positivkontrolle wird eine 0,1 %ige Histamin-Lösung (1 mg/ml) eingesetzt. Der SPT gilt als der Goldstandard zur Diagnose von Typ I-Allergien gegen Inhalationsallergene (z. B. Pollen) oder Nahrungsmittel. Für diese Allergene besitzt der SPT eine Sensitivität von ca. 77 % und eine Spezifität von ca. 91 % (Karakaya, Ozturk, & Kalyoncu, 2011). Für Penicilline einschließlich Aminopenicilline wurde für den SPT eine Spezifität von ca. 70 % berechnet (Romano et al., 2004).

Epikutantest (ECT)/Tesafilm-Abrisstest zum Nachweis von Typ-IV-Allergien

Bei Verdacht auf eine Penicillin-Allergie, die sich als makulo-papulöses Exanthem manifestiert hat, wird neben dem SPT und ICT (mit Spätablesungen) der ECT verwendet. Beim ECT beruht eine positive Reaktion auf einer Aktivierung von Allergen-

spezifischen T-Zellen. Diese Aktivierung führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion unter dem Bild eines allergischen Kontaktekzems (Britschgi et al., 2001).

Der Test wird an der Rückenhaut des Patienten durchgeführt. Hier werden die zu testenden Penicilline und Penicillin-Derivate aufgetragen und mit einem Pflaster fixiert. Nach 48 und 72 Stunden wird die Hautreaktion beurteilt (Barbaud et al., 1997). Die Sensitivität des ECT für die Testung von Penicillinen schwankt in der Literatur in Abhängigkeit vom verwendeten β -Lactam-Antibiotikum zwischen 3 und 38 % (Blanca, 1994). Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein einer Typ IV-Allergie gegen Penicilline nicht sicher aus (Pichler & Tilch, 2004). Die Sensitivität des ECT für die Diagnose einer Spättypallergie gegen Aminopenicilline ist dagegen mit mehr als 90 % sehr gut, bei korrekter Durchführung und Bewertung wird eine Spezifität von fast 100 % erreicht (Patriarca et al., 1999; Trcka, Seitz, Brocker, Gross, & Trautmann, 2007).

Der ECT birgt zumindest theoretisch das Risiko einer iatrogenen, aktiven Sensibilisierung. Stark positive Testreaktionen können bei entsprechend sensibilisierten Patienten ein generalisiertes Exanthem auslösen (Devos & Van Der Valk, 2002).

Intrakutantest (ICT)

Der ICT ist die sensitivste Hauttestmethode für allergische Reaktionen gegen Arzneimittel. Die hohe Sensitivität geht aber mit einer geringeren Spezifität einher. Oder anders ausgedrückt, falsch-negative Ergebnisse sind verglichen mit dem SPT seltener, dafür sind aber auch die falsch-positiven Ergebnisse häufiger (Carr & Saltoun, 2012; Reddy et al., 1978). Beim ICT wird das Allergen intrakutan injiziert, Sofortablesungen erfolgen nach 20 Minuten, Spätablesen nach 2 bis 4 Tagen (Carr & Saltoun, 2012).

1.3.2 In-vitro-Methoden

Neben den in-vivo Methoden wurden auch verschiedene Labormethoden zur Diagnostik von Arzneimittelreaktionen entwickelt (Pichler & Tilch, 2004).

Immunoassays

Immunoassays können auch bei Patienten eingesetzt werden, bei denen Hauttestungen nicht möglich oder kontraindiziert sind. Der Immunoassay beruht auf dem serologischen Nachweis von Allergen-spezifischem IgE, wobei mittlerweile kommerzielle Test-

systeme für eine ganze Reihe von unterschiedlichen Allergenen (zum Beispiel Penicilline, Milben, Pollen) zur Verfügung stehen. Klassische Vertreter dieser Testsysteme sind der Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) und der Radio-Allergo-Sorbent-Assay (RAST). Die ursprünglich verwendeten radioaktiv-markierten Nachweissysteme werden zunehmend durch Fluoreszenz-optische Methoden ersetzt (ImmunoCAP®). Derzeit gibt es noch keinen Goldstandard für die Immunoassays. Falsch-positive Ergebnisse sind das größte Problem, da auch nicht-relevante Antikörper unspezifisch an das Polymer binden können (Siles & Hsieh, 2011).

Beim ImmunoCAP® wird ein Allergen an ein Polymer gekoppelt und mit Patientenserum inkubiert. Dabei bindet eventuell vorhandenes Allergen-spezifisches IgE. Nach einem Waschschrift werden die ungebundenen Antikörper entfernt. Die gebundenen IgE-Moleküle werden mittels Fluoreszenzmarkierten-anti-IgE-Antikörpern detektiert, wobei sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge des Allergen-spezifischen IgE verhält (Cox et al., 2008). Die Sensitivität des ImmunoCAP® ist vor allem von den untersuchten Allergenen abhängig und reicht von 60 – 95 %, die Spezifität liegt zwischen 30 - 95 % (Williams, Dolen, Koepke, & Selner, 1992). Für Penicilline und Aminopenicilline liegt die Sensitivität bei 32 – 50 % und die Spezifität bei 96 – 98 % (Blanca et al., 2001). Verglichen mit den Hauttests ist die Sensitivität des ImmunoCAP® um 25 – 30 % geringer. Der Nachweis von Allergen-spezifischem IgE deutet grundsätzlich lediglich auf eine entsprechende Sensibilisierung hin und ist als alleiniger Befund noch nicht mit einer klinisch relevanten Allergie gleichzusetzen (Bernstein et al., 2008).

Lymphozytentransformationstest (LTT)

Der LTT ist eine diagnostische Labormethode, um T-Zell-vermittelte Sensibilisierungen, unter anderem auch gegen Medikamente nachzuweisen (Brander et al., 1995; Mauri-Hellweg et al., 1996). Erstmals setzte das Ehepaar Denman bereits 1968 in der Studie „The Lymphocytetransformationstest and gold hypersensitivity“ den LTT als diagnostischen Test bei Patientinnen und Patienten mit rheumatoider Arthritis, die nach einer Behandlung mit Gold an Nebenwirkungen litten, ein. Lediglich bei einigen Patienten konnte der Verdacht auf ein immunologisches Geschehen im Zusammenhang mit

der Goldbehandlung bestätigt werden (Denman & Denman, 1968). Zahlreiche weitere Studien zur diagnostischen Wertigkeit des LTT folgten (siehe Kap. 4.1).

Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass Allergene nach Prozessierung durch APC über den MHC-II-Komplex mit dem TZR interagieren und so zur T-Zell-Aktivierung führen. Prinzipiell können alle potentiellen Allergene, so auch β -Lactam-Antibiotika, mit dem LTT getestet werden (siehe Abbildung 4).

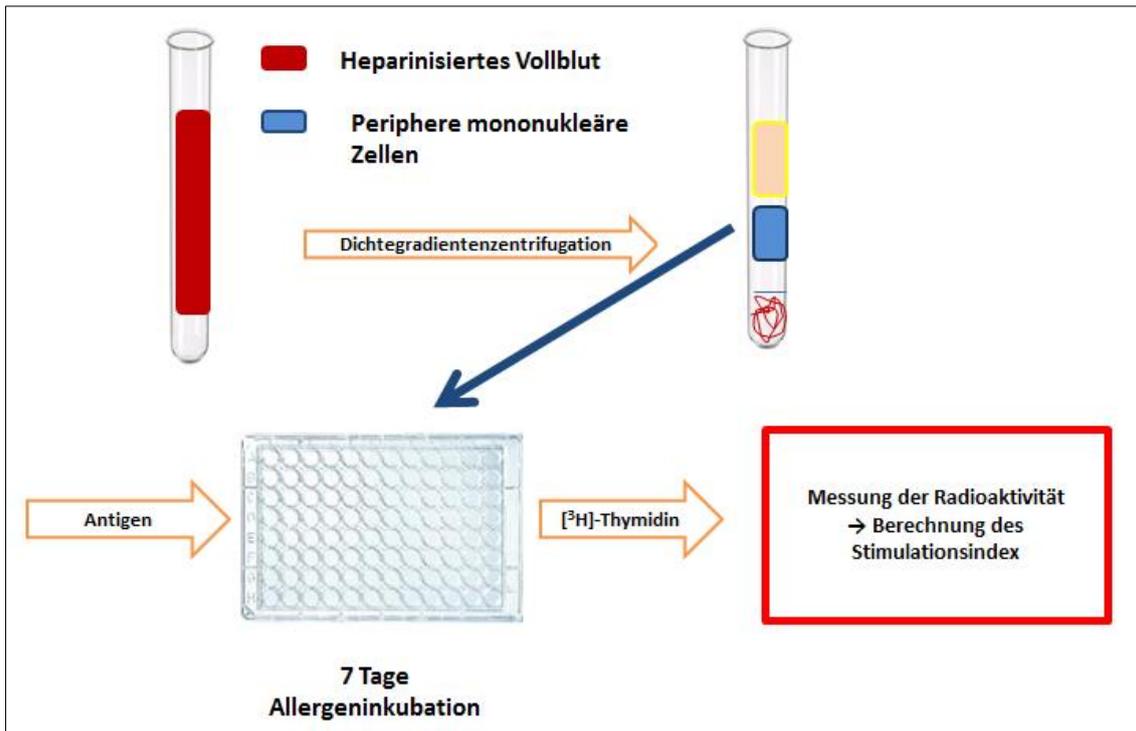


Abb. 4: Aufbau des LTT modifiziert nach Bussa (Bussa, Rumi, Leone, & Bizzi, 1993)

Nachteile des LTT sind die notwendige Laborausstattung und der Zeitaufwand, daher wird der LTT nur in entsprechend spezialisierten Laboren durchgeführt (Pichler & Tilch, 2004). Weiterhin können die Ergebnisse nur von einem erfahrenen Allergologen interpretiert werden, im Kontext mit der Anamnese und den anderen allergologischen Testergebnissen. Die Sensitivität des LTT weist bei β -Lactamen nach der aktuellen Datenlage eine große Schwankungsbreite auf. Sie reicht von 60 – 87 %, bei einer Spezifität von 85 – 90 % (Nyfeler & Pichler, 1997; Cederbrant, Marcusson-Stahl, & Hultman, 2000; Luque et al., 2001; Romano et al., 2004; Thong, 2010).

1.4 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Penicilline gehören zu den am häufigsten verordneten Antibiotika. Gleichzeitig beschäftigen uns im klinischen Alltag immer wieder manifeste und vermutete Penicillin-Allergien. Für die sichere und eindeutige Diagnose einer Penicillinallergie ist eine Weiterentwicklung der diagnostischen Möglichkeiten wünschenswert. Ein Ansatzpunkt stellt dabei der LTT dar (Pichler & Tilch, 2004).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie sich eine Modifikation des LTT, das heißt die gleichzeitige Stimulation der T-Zellen sowohl mit dem spezifischen Antigen (Penicillin G, Ampicillin) als auch mit dem Antikörper gegen CD3/CD28, auf die diagnostische Wertigkeit auswirkt. Als Kenngrößen sollen die Sensitivitäten und Spezifitäten des konventionellen und des modifizierten LTT verglichen werden. Damit soll beantwortet werden, ob ein mit CD3/CD28 modifizierter LTT in der Routinediagnostik der exanthematischen Spättypallergie gegen Aminopenicilline / Penicillin G eingesetzt werden kann.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten des Allergiezentrum Mainfranken der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Würzburg, bei denen entweder der hochgradige Verdacht auf eine Spättypallergie gegen Aminopenicilline bestand oder eine solche Allergie ausgeschlossen werden sollte (siehe Tabelle 3). Die Patienten wurden vorab informiert und haben einer zusätzlichen Blutentnahme zugestimmt. Für die Untersuchung wurden den Patienten 30 ml peripher-venöses Blut entnommen. Für diese zusätzlichen Blutentnahmen liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg vor (Studien-Nr. 95/08).

Im Rahmen der Allergiediagnostik wurden neben der allergologischen Anamnese im ersten Schritt ein ECT und ein ICT mit einer Auswahl von semisynthetischen und synthetischen Penicillinen, Aminopenicillinen und Cephalosporinen durchgeführt. Parallel dazu wurde 30 ml Blut für die Bestimmung des Penicillin-spezifischen IgE (RAST, ImmunoCAP[®]), des Gesamt-IgE (UniCap[®]) und für den LTT mit Penicillin und Aminopenicillin abgenommen. Bei negativen Hauttestungen wurden die Patienten mit dem Verum (das heißt einem Aminopenicillin) exponiert.

Tab. 3: Demographische und klinische Daten der Patienten

Anzahl Patienten	37
Geschlecht: Männer/Frauen	7/30
Alter bei der Testung	46,5 Jahre (Range: 25 bis 79 Jahre)
Spezifisches IgE Penicilline + Derivate: positiv/negativ	0/37
Gesamt-IgE (Mittelwert \pm SEM)	138,49 kU/l \pm 22,05

2.2 Materialien

Es wurden folgende Materialien, Reagenzien, Medien und Geräte verwendet:

2.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Produkt	Hersteller	Katalognr.
Ficoll	Linaris; Dossenheim, Deutschland	TF 1511YK
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco; Darmstadt, Deutschland	14190
RPMI 1640	Gibco; Darmstadt, Deutschland	21875
Minimum essential Medium-nonessential aminoacids (MEM-neAA)	PAN; Aidenbach, Deutschland	P08-32100
Natriumpyruvat	PAN; Aidenbach, Deutschland	P04-43100
Mercaptoethanol	PAN; Aidenbach, Deutschland	P07-05020
Dimethylsulfoxid	Sigma; München, Deutschland	D4540
Humanes Serum Typ AB	Lonza; Ratingen, Deutschland	14-498E
Trypanblau	Fluka; Neu-Ulm, Deutschland	93595
Anti-CD3	BD; Heidelberg, Deutschland	555329
Anti-CD28.1	eBioscience; Frankfurt, Deutschland	16-0289-85
Phytohemagglutinin	Sigma; München, Deutschland	L9017
Penicillin	Grünenthal; Aachen, Deutschland	
Ampicillin	Ratiopharm; Ulm, Deutschland	
³ H-Thymidin	Amersham Biosciences; Braunschweig, Deutschland	

Zusammensetzung des Kulturmediums

Nicht-essentielle Aminosäuren 50 x (1:100)	400 µl
Natriumpyruvat 100 mM (1:100)	400 µl
Mercaptoethanol 100 nmol/l (1:1000)	40 µl
AB-Serum (10 %)	4 ml
RPMI 1640 ad	40 ml

2.2.2 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
Falcon-Röhrchen	Greiner; Frickenhausen, Deutschland
Cryotubes	Nunc; Roskilde, Dänemark
Sterile Einmalpipetten	Corning; Wiesbaden, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand; Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platten mit Rundboden	Greiner; Frickenhausen, Deutschland
Filtermatten	Wallac; Rodgau, Deutschland
Sample Bag	Wallac; Rodgau, Deutschland
Einfrierbehälter MrFrosty	Qualilab; Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland

2.2.3 Technische Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
Brutschrank	Heraeus; Hanau, Deutschland
Mikroskop	Leica; Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld; Lauda-Königshofen, Deutschland
Steril-Werkbank	BDK; Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Combi-Spin	Hartenstein; Würzburg, Deutschland
Wasserheizbad	IKA; Staufen, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge)	ThermoScientific; München, Deutschland
Pipettierhilfe	Hirschmann; Eberstadt, Deutschland
Harvester MicroBeta Counter	PerkinElmer; Waltham, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Lymphozytenisolierung aus dem peripheren Blut

Die Isolierung der mononukleären Blutzellen aus dem peripher-venösen Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) erfolgte mithilfe eines Ficoll-Dichtegradienten. Circa 30 ml heparinisiertes Vollblut wurde bei 3000 Umdrehungen / Minute (rpm) 10 Minuten lang zentrifugiert, so dass das Serum von den Zellen abgetrennt wurde. Nach Entfernung des Serums, wurden die Zellen mit phosphate buffered saline (PBS) 1:2 verdünnt. Anschließend wurden 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) vorgelegt und in 50 ml Zentrifugationsgefäße (Falcon) vorsichtig mit dem verdünnten Blut bei Raumtemperatur (RT) überschichtet. Nachfolgend wurden die Gefäße bei RT zentrifugiert (20 Minuten, 1800 rpm, ohne Bremse). In dem entstandenen Dichtegradienten trennten sich die Erythrozyten (am Gefäßboden), Granulozyten und PBMC. Letztere waren deutlich als weiße Schicht sichtbar.

Diese Schicht aus PBMC wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein neues Falcon überführt, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, zentrifugiert (1000 rpm, 10 Minuten, 4°C) und abschließend in Kulturmedium resuspendiert.

2.3.2 Lymphozytentransformationstest (LTT)

Messungen der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Ermittlung der Anzahl vitaler Zellen wurden 90 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt. Von dieser Lösung wurden 10 µl in die Zählkammer gegeben. Anschließend konnte im Mikroskop die Anzahl der nicht blau gefärbten, das heißt der lebenden Zellen bestimmt werden. Zur Berechnung der Zelldichte (Zellzahl / ml) wurde die Anzahl der Zellen in einem Zählfeld (0,1 µl) mit dem Verdünnungsfaktor (hier 10) sowie dem Faktor 10^4 multipliziert.

Kultivierung und Stimulation der PBMC

Die PBMC wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ in einer 96-well Mikrotiterplatte bei einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml kultiviert. Als Kulturmedium diente mit Zusätzen supplementiertes RPMI 1640 (siehe Kapitel 2.2.1).

Für die Stimulationsansätze wurden zu 100 µl Zellsuspension 100 µl Ampicillin- beziehungsweise Penicillin-G-Lösung in der entsprechenden Konzentration pipettiert. Als Antigen-abhängige Positivkontrolle diente Tetanus-Toxoid (TT, 1 µg/ml). Typischerweise wurden die einzelnen Konditionen in Triplett-Ansätzen gemessen. Dabei wurde die Proliferation unter konventionellen LTT-Bedingungen mit der unter modifizierten LTT-Bedingungen (das heißt zusätzlich mit CD3/CD28) verglichen. Penicillin G und Ampicillin wurden in den Proliferationsassays in den Konzentrationen 0 µg/ml (Negativkontrolle), 10 µg/ml, 100 µg/ml und 250 µg/ml zugegeben. Danach erfolgte die in Abbildung 5 schematisch dargestellte Inkubation für sieben Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

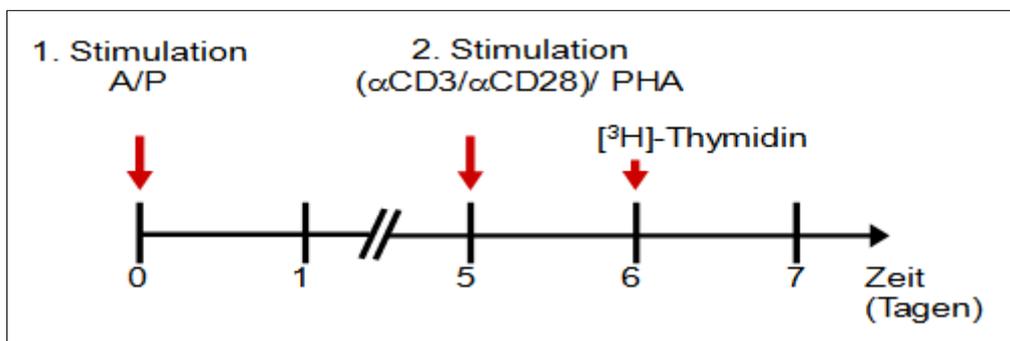


Abb. 5: Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf des modifizierten Lymphozytentransformationstests
 A: Ampicillin; P: Penicillin G; αCD3/αCD28: monoklonale Antikörper gegen CD3/CD28;
 PHA: Phytohemagglutinin

Ab dem fünften Tag wurden die entsprechenden PBMC-Ansätze mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3/CD28 (mAb, je 1 µg/ml) kostimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen ab diesem Zeitpunkt mit dem Antigen-unabhängigen Mitogenphytohemagglutinin (PHA, 250 ng/ml) inkubiert.

Die Proliferation der T-Zellen wurde durch den Einbau von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin in die DNA während der Synthesephase (S-Phase) der proliferierenden Zelle gemessen. Am sechsten Tag der Inkubation wurden 25 µl Kulturüberstand, durch 25 µl mit [³H]-Thymidin versetztem Kulturmedium (0,5 mCi/ml) ersetzt. Danach erfolgte eine weitere Kultivierung für 14 bis 16 Stunden. Dann wurde die 96-well Platte aus dem Brutschrank entnommen und zur späteren Messung bei -20°C eingefroren. Die Analyse des [³H]-Thymidin-Einbaus in die DNA erfolgte mit Hilfe eines Harvesters. Durch die Zugabe von doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) werden in dem Gerät zunächst alle Zellen lysiert. Die Zelltrümmer-Lösung wird abgesaugt und auf einen Glasfaserfilter ad-

sorbiert. Nach Trocknung des Filters für 2 bis 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C wird dieser nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Plastikfolie eingeschweißt und mit einem β -Szintillationszähler analysiert.

2.3.3 Bestimmung des Stimulationsindex (SI)

Zur Analyse der Ergebnisse eines LTT wird der Stimulationsindex (SI) berechnet. Der SI ist der Quotient aus den Proliferationswerten mit und ohne Allergene (Ampicillin/ Penicillin; Pichler & Tilch, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Auswertung Mittelwerte aus drei Parallelansätzen verwendet.

$$SI = \frac{3H - \text{Thymidineinbau mit Allergen zugabe}}{3H - \text{Thymidineinbau ohne Allergen zugabe}}$$

Für die diagnostische Beurteilung der getesteten Medikamente gelten $SI < 2$ als negativ, SI zwischen 2 und 2,5 als schwach positiv und $SI > 2,5$ als stark positives Ergebnis.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Symptome

In der Anamnese aller Patienten fanden sich exanthematische Hautreaktionen unter einer Therapie mit Amoxicillin oder Penicillin G. Diese Reaktionen traten im Rahmen einer Therapie von Atemwegsinfektionen, einer Eradikationstherapie von *Helicobacter pylori* oder bei der Behandlung von dentalen Infektionen auf.

3.2 Allergologische Routinediagnostik: allergenspezifisches IgE, Hauttestung und Exposition

Bei keinem der Patienten war spezifisches IgE gegen Penicilline oder Aminopenicilline nachweisbar, das Gesamt-IgE betrug im Mittel 138,49 kU/l (siehe Tabelle 3). Hier fiel ein Patient besonders auf, da sein Gesamt-IgE 1486 kU/l (Norm ≤ 100 kU/l) betrug. Bei diesem Patienten waren die folgenden Testungen alle negativ, außer der LTT mit Ko-stimulation. Auf diesen Patienten wird im Folgenden noch eingegangen.

Aufgrund der Anamnese erhielten alle Patienten ein SPT, ECT und ein ICT mit entsprechenden Spätablesungen. Positiv wurden 1+ und 2+ in den Hauttests gewertet (siehe Tabelle 7). Bei den im Hauttest negativ reagierenden Patienten wurde anschließend eine Exposition mit Ampicillin, oral oder intravenös, Ampicillin/ Sulbactam und/ oder Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V) oral durchgeführt. In den Tabellen 7, 9 und 10 sind die Patienten einzeln aufgeführt. Sie sind anhand der Ergebnisse der Hauttestungen und des LTT aufgeteilt. Nur bei einem Patienten kam es zu einer positiven Expositionsreaktion, obwohl in den vorausgegangenen Hauttests keine Sensibilisierung nachweisbar war (siehe Tabelle 7), dass heißt 1/27 Hauttests (3,7 %) war falsch negativ (siehe Tabelle 4). Dieser Patient zeigte in der klinischen Reaktion kein klassisches makulopapulöses Exanthem, sondern eine sogenannte Exanthemvariante mit Beugenbetonung (früher als „Baboon-Syndrom“ bezeichnet). Bei der heute als „SDRIFE“ (symmetrical drug-related intertriginous and flexural exanthema) bezeichneten allergischen Reaktion kommt es zu Erythemen im Bereich der Gelenkbeugen nach der oralen Einnahme von Penicillin oder Aminopenicillinen als Ausdruck einer Typ IV-Allergie (Andersen, Hjorth, & Menne, 1984; Hausermann, Harr, & Bircher, 2004; Handisurya, Stingl, & Wohrl, 2009).

Tab. 4: Ergebnisse der Haut- und Expositionstestungen

Expositionstestungen	Hauttests			
		Positiv	Negativ	Summe
Positiv	n.d.		1	1
Negativ			26	26
Summe		10	27	entfällt

n.d. = nicht durchgeführt

Insgesamt konnte mit Haut- und Expositionstestungen bei 11 der 37 Patienten eine Spättypallergie gegen Aminopenicilline / Pencillin G / V diagnostiziert werden.

3.3 Proliferation im LTT

Die Wirkung von Ampicillin im LTT wurde mittels des SI quantifiziert (Berechnung siehe 2.3.3). SI kleiner 2 wurden als negativ, zwischen 2 und 2,5 als schwach positiv und größer 2,5 als stark positiv bewertet (siehe Kapitel 2.3 und Tabellen 8 und 11).

Die Proliferationsdaten des konventionellen und modifizierten LTT können als Graphiken dargestellt werden (siehe Abbildung 6, 7 und 8), welche die Proliferation der Patienten-T-Zellen nach Zugabe verschiedener Ampicillin-Konzentrationen zeigt. Das Ausmaß der Proliferation ergibt einen Hinweis auf eine Stärke der Sensibilisierung gegen Aminopenicilline. Ein Stimulationsindex über 2 ($SI > 2$) lässt auf eine Sensibilisierung schließen, wohingegen eine geringere oder kleinere Proliferation ($SI < 2$) auf die Abwesenheit einer Aminopenicillin-Allergie hinweist.

Diese Versuche sollten die Frage beantworten, ob eine Allergie auf Aminopenicilline besteht und ob durch eine zusätzliche Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern eine höhere Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann (siehe 1.3.1 und 1.3.2). Deshalb wurde die Proliferation von T-Zellen auf verschiedene Konzentrationen von Ampicillin mit oder ohne zusätzliche Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern getestet. Die verschiedenen Einzelexperimente wurden zusätzlich als SI zusammengefasst (siehe Abbildung 6, 7 und 8; Tabelle 8 und 11), damit anhand der Zahlenwerte die Ergebnisse der einzelnen Patienten vergleichbarer sind. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln (siehe 1.3.1 und 1.3.2) zu sehen.

3.3.1 Sensitivität

Die Sensitivität ist definiert als der Prozentsatz richtiger positiver Ergebnisse eines Testverfahrens (hier: LTT) von Erkrankten (hier: Aminopenicillin-Allergie), der tatsächlich als krank erkannt wird. Sie wird aus dem Quotient aus richtig positiven Ergebnissen und der Summe aus richtig positiven und falsch negativen Ergebnissen berechnet. Im Folgenden wird die Sensitivität des konventionellen LTT (siehe Tabelle 5) und des modifizierten LTT (siehe Tabelle 6) zur Diagnose einer Aminopenicillin-Allergie verglichen.

Die Sensitivität des konventionellen LTT betrug 63,6 %, die Spezifität 92,3 %. Der positive prädiktive Wert lag bei 77,8 % und der negative prädiktive Wert bei 85,7 %.

Tab. 5: Vierfeldertafel des konventionellen LTT bei Aminopenicillin-Allergie

	Aminopenicillin-Allergie		
	Ja	Nein	Summe
Positiv	7	2	9
Negativ	4	24	28
Summe	11	26	37

Im LTT mit CD3/28-Stimulation konnten dagegen auch bei dem Patienten mit SDRIFE Hinweise auf eine Sensibilisierung gefunden werden (siehe Tabelle 7 und 8, Kapitel 3.3).

Tab. 6: Vierfeldertafel des modifizierten LTT bei Aminopenicillin-Allergie

LTT (modifiziert)	Aminopenicillin-Allergie		
		Ja	Nein
Positiv	9	6	15
Negativ	2	20	22
Summe	11	26	37

Die Sensitivität des modifizierten LTT mit Kostimulation lag bei 81,8 %, die Spezifität bei 76,9 %. Der positive prädiktive Wert betrug 60,0 %, der negative prädiktive Wert 90,9 %.

In Parallelansätzen wurden die Zellen im LTT mit Antikörpern gegen CD3/CD28 kostimuliert, um die Proliferation der Lymphozyten zu erhöhen. Ziel war es, die Testsensitivität durch diese Modifikation zu verbessern. Die Sensitivität in den kostimulierten LTT lag bei 81,8 %. Der LTT wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums (10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml) durchgeführt. Der SI war mindestens bei einer der drei untersuchten Konzentrationen größer als drei.

Um die Frage zu beantworten, wie Patienten mit nachgewiesener Aminopenicillin-Allergie sich im konventionellen und modifizierten LTT verhalten, wurden in Tabelle 8 die SI der konventionellen und modifizierten LTTs gegenübergestellt. Zur Verdeutlichung der möglichen Schwankungsbreite sind jeweils die Konzentrationen 10, 100 und 250 µg/ml zu sehen. Die SI bewegen sich im Bereich zwischen 0,8 und 5,7. Wenn mindestens einer der drei SI größer zwei war, wurde er als positiv bewertet. Offen bleibt die Frage, wie sich SI bei negativer Haut- und Expositionstestung darstellten.

Um die Proliferationsdaten graphisch zu veranschaulichen, wählten wir einen Patienten mit positivem Hauttest aus (siehe Abbildung 6). Es sollte die Frage beantwortet werden, ob bei diesem Patienten mit positiver Anamnese und Hauttest sich eine Allergie auf Aminopenicilline durch den LTT bestätigen und ob durch eine zusätzliche Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern eine höhere Stimulation der T-Zellen und höhere SI erreichen lässt.

Es zeigte sich, dass bei dem konventionellen LTT der SI bei drei Konzentrationen > 2 war, während der modifizierte LTT lediglich bei den Konzentrationen 100 und 250 µg/ml einen SI > 2 lieferte. Da bei beiden LTTs mindestens ein SI > 2 vorlag,

schließen wir daraus, dass diese Daten einen positiven konventionellen und modifizierten LTT darstellen (siehe Abbildung 6). Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass mit steigender Konzentration von Ampicillin eine verstärkte Proliferation einhergeht. Dies bedeutet, dass hier steigende Konzentrationen von Antigenen eine größere Immunantwort auslösen und eine Steigerung des SI hervorrufen. Allerdings zeigten die zusätzlichen Stimulationen mit CD3/CD28 keine über die Ampicillin-Stimulation hinausgehende Zunahme der Proliferation. Daraus lässt sich schließen, dass bei diesem Patienten die zusätzliche Stimulation nicht zu einer verstärkten Proliferation der T-Zellen und somit zu einem höheren SI führte. Jedoch bleibt hier noch die Frage offen, wie sich die Stimulationen der T-Zellen bei Patienten mit negativen Hauttests verhalten.

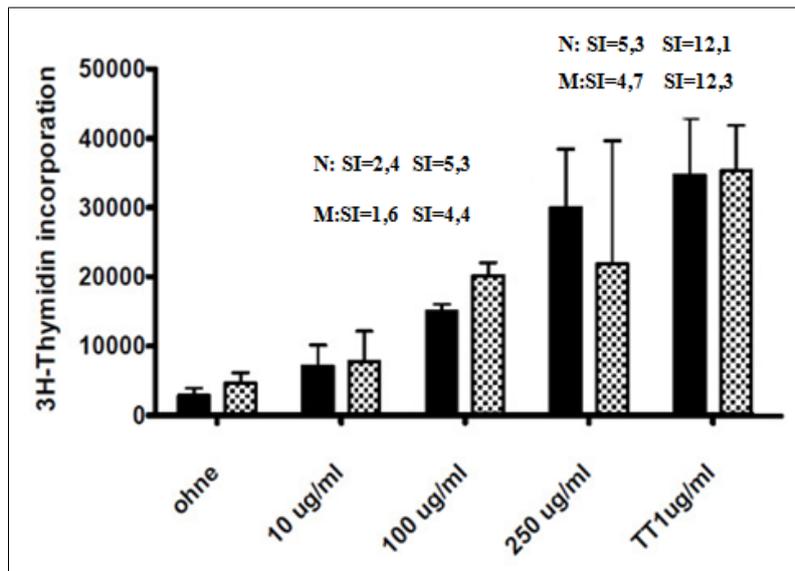


Abb. 6: LTT mit Ampicillin. Dargestellt sind die Proliferationsdaten eines Patienten mit positivem normalen und modifizierten LTT. TT = Tetanustoxoid (Positivkontrolle). Die Messmethode wird in Abschnitt 2.3 beschrieben. X-Achse: Konzentration von Ampicillin. Y-Achse: Proliferation der Zellen anhand der Thymidin-Einlagerung. Stimulationsindices (SI) ≤ 2 werden als negativ bewertet; SI zwischen 2 - 2,5 als schwach positiv und SI $> 2,5$ als stark positiv.



N: normaler LTT, d.h. Proliferation ohne zusätzliche Stimulation



M: modifizierter LTT, d.h. Proliferation unter zusätzlicher Stimulation mit anti-CD3/CD28

Tab. 7: Haut- und in-vitro-Tests bei Patienten (11/37) mit Aminopenicillin-Allergie

Nr.	Sex	Age	Drug	SPT	ICT	ECT	RAST	Provokation	LTT		
									konventionell	CD3/CD28	Intervall
1	f	47	A	2+	2+	2+	0	n.b.	pos.	pos.	0y2m
2	f	32	A	1+	1+	1+	0	n.b.	pos.	pos.	0y3m
9	f	33	A	2+	2+	1+	0	n.b.	pos.	pos.	0y3m
10	m	43	A	0	0	0	0	pos.	neg.	pos.	n. b.
18	f	62	A	2+	1+	1+	0	n.b.	neg.	pos.	n.b.
25	f	31	A	1+	2+	1+	0	n.b.	pos.	pos.	0y8m
27	f	25	A	1+ (196 h)	2+	0	0	n.b.	neg.	neg.	0y2m
28	f	44	A	0	2+	1+	0	n.b.	neg.	neg.	0y1m
32	f	30	A	3+	3+	2+	0	n.b.	pos.	pos.	n. b.
34	f	77	A	2+	2+	2+	0	n.b.	pos.	pos.	n.b.
36	f	44	A	1+	2+	2+	0	n.b.	pos.	pos.	2y4m

A: Ampicillin; LTT: Lymphozytentransformationstest; ICT: Intrakutantest; ECT: Extrakutantest; RAST: Radio-Allergo-Sorbent-Assay; SPT: skin prick test; Intervall: Zeit zwischen Ereignis und LTT (m = month, y = year); n. b.: nicht bestimmt

Tab. 8: Stimulationsindices (SI) der konventionellen und modifizierten LTTs bei den 11 Patienten von 37 mit nachgewiesener Aminopenicillin-Allergie

Nr.	Ampicillin 10 µg/ml	Ampicillin 100 µg/ml	Ampicillin 250 µg/ml	LTT
1	0,8	0,9	1,8	konventionell CD3/CD28
	1,9	2,8	1,8	
2	2,1	3,6	2,8	konventionell CD3/CD28
	2,2	3,9	3,6	
9	3,4	2,6	1,3	konventionell CD3/CD28
	2,2	2,0	2,0	
10	1,0	1,1	1,7	konventionell CD3/CD28
	1,7	3,5	1,3	
18	0,9	1,0	1,0	konventionell CD3/CD28
	3,0	3,1	3,0	
25	3,1	4,6	2,0	konventionell CD3/CD28
	3,0	5,7	5,2	
27	0,9	1,4	1,1	konventionell CD3/CD28
	1,2	0,5	0,9	
28	0,7	1,1	1,4	konventionell CD3/CD28
	1,1	1,0	1,4	
32	0,7	3,3	4,2	konventionell CD3/CD28
	1,3	2,0	2,5	
34	2,5	5,2	4,6	konventionell CD3/CD28
	1,7	4,3	4,7	
36	2,4	5,3	5,3	konventionell CD3/CD28
	1,6	4,4	4,7	

Stimulationsindices (SI) ≤ 2 werden als negativ bewertet; SI zwischen 2–2,5 als schwach positiv und SI $> 2,5$ als stark positiv.

3.3.2 Spezifität

Unter der Spezifität versteht man die Berechnung der Wahrscheinlichkeit tatsächlich gesunder Patienten (hier: keine Aminopenicillin-Allergie), was anhand eines Testverfahrens zu erkennen ist (hier: LTT). Sie ist als Quotient aus richtig negativen Ergebnissen und der Summe aus falsch positiven und richtig negativen Ergebnissen berechnet. Bei 26 der 37 Patienten wurde eine Aminopenicillin-Allergie durch negative Hauttests mit anschließender negativer oraler Exposition definitiv ausgeschlossen. Von diesen 26 Patienten war bei 24 im konventionellen LTT ebenfalls keine Typ-IV-Sensibilisierung nachweisbar (siehe Tabelle 5). Daraus ergibt sich für den konventionellen LTT eine Spezifität von 92,3 %. Andererseits zeigte der modifizierte LTT mit CD3/CD28-Kostimulation bei sechs Patienten trotz negativer Haut- und Provokationstests eine Typ-IV-Sensibilisierung gegen Aminopenicilline, hieraus lässt sich eine Spezifität von 76,9 % berechnen (siehe Tabelle 6).

Um zu zeigen, dass richtig negative und falsch positive Ergebnisse möglich waren, wurde dies in den folgenden Tabellen dargestellt (siehe Tabelle 9, 10 und 11). Es soll veranschaulichen, dass im konventionellen und modifizierten LTT sowohl negative Hauttestungen bestätigt werden konnten (siehe Tabelle 9, SI der Einzelpatienten hier nicht gezeigt) als auch falsch positive Ergebnisse auftraten (siehe Tabelle 10 und 11). Deshalb wurden die Proliferationsdaten des konventionellen und modifizierten LTT als SI gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass bei der modifizierten Form des LTT häufiger falsch positive Ergebnisse resultierten als beim konventionellen LTT (siehe Tabelle 5, 6 und 11). Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass hier die Kostimulation mit anti-CD3/CD28 zu einer Verringerung der Spezifität führt.

Um die Proliferationsdaten bei negativen Ergebnissen graphisch zu veranschaulichen, wählten wir einen Patienten mit negativem Hauttest aus (siehe Abbildung 7). Es sollte gezeigt werden, dass bei diesem Patienten mit negativem Hauttest sich keine Allergie auf Aminopenicilline durch den LTT darstellt.

Es zeigte sich, dass beim konventionellen LTT die Proliferation bei zwei der Konzentrationen (10 und 100 $\mu\text{g/ml}$) geringer als die Negativkontrolle und die Proliferation der T-Zellen bei 250 $\mu\text{g/ml}$ nur geringfügig höher war und somit alle SI < 2 waren, während

sich die Positivkontrolle mit TT positiv darstellte (SI = 3,4). Wir schließen daraus, dass diese Daten einen negativen konventionellen LTT darstellen. Zusätzlich waren bei dem LTT mit Kostimulation die Thymidineinlagerungen bei zwei der Konzentrationen (10 und 250 µg/ml) geringfügig höher und eine Konzentration (100 µg/ml) war kleiner als die Negativkontrolle. Alle drei Konzentrationen hatten einen SI < 2, während die Positivkontrolle einen SI > 2 zeigte (SI = 2,7). Diese Daten deuten darauf hin, dass der modifizierte LTT ebenfalls ein negatives Ergebnis aufzeigt und somit mit der Hauttestung übereinstimmt. Eine Erhöhung der Konzentration führte weder beim konventionellen noch beim kostimulierten LTT zu einer Erhöhung der Proliferation. Allerdings bleibt hier noch die Frage offen, ob sich die Konzentrationen des Antigens auf die Proliferation auswirken und ob die die Ergebnisse der Stimulation der T-Zellen bei Patienten mit negativen Hauttests bei konventionellem und modifiziertem LTT auch unterscheiden können.

Um die Proliferationsdaten bei kontroversen Ergebnissen des konventionellen und modifizierten LTT graphisch zu veranschaulichen, wählten wir einen Patienten mit negativem Hauttest aus (siehe Abbildung 8). Es sollte die Frage beantwortet werden, ob bei diesem Patienten mit negativem Hauttest sich keine Allergie auf Aminopenicilline durch den LTT bestätigen lässt und ob durch eine zusätzliche Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern die Spezifität des LTT gesteigert werden kann.

Es zeigte sich, dass beim konventionellen LTT der SI bei drei Konzentrationen < 2 war, da die Proliferation der T-Zellen bei positiver Positivkontrolle (SI = 12,2) kleiner (10 µg/ml) oder nur etwas höher (100 und 250 µg/ml) als die Negativkontrolle war. Aus diesem Ergebnis kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese Daten einen richtig negativen LTT darstellen. Dagegen zeigte der modifizierte LTT eine höhere Proliferation der T-Zellen als die Negativkontrolle, so dass die SI aller drei Konzentrationen > 2 war (Positivkontrolle: SI = 5,4). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass diese Daten einen falsch positiven LTT darstellen. In diesem Falle führt die Kostimulation mit anti-CD3/CD28 zu einer Verringerung der Spezifität. Außerdem zeigte eine Erhöhung der Konzentration keine verstärkte Proliferation der T-Zellen. Wir schließen daraus, dass bezüglich der Konzentrationen und der Höhe der Proliferation hier aufgrund des inhomogenen Ergebnisses keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

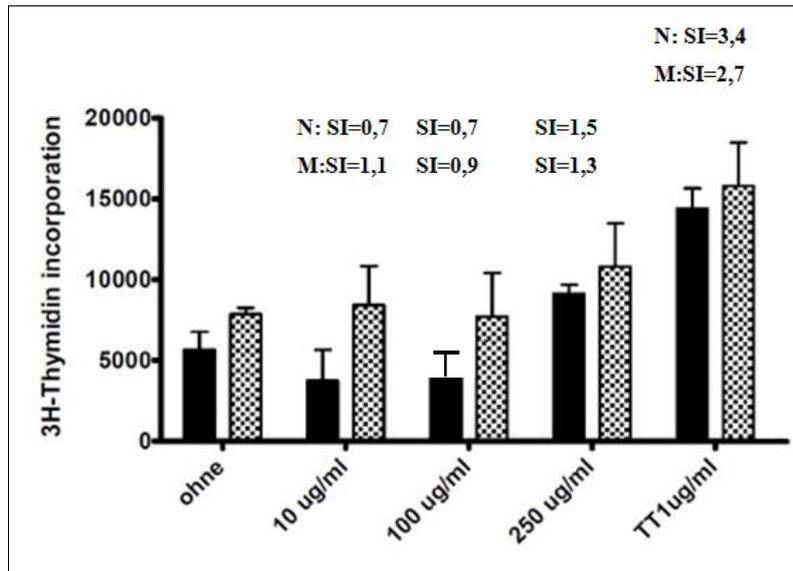


Abb.7: LTT mit Ampicillin. Bei diesem Patienten blieb der normale LTT und der LTT mit zusätzlicher Kostimulation mit anti-CD3/CD28 (modifizierter LTT) negativ. Die Messmethode wird in Abschnitt 2.3 beschrieben. X-Achse: Konzentration von Ampicillin; TT = Tetanustoxoid (Positivkontrolle) Y-Achse: Proliferation der Zellen anhand der Thymidin-Einlagerung. Stimulationindices (SI) ≤ 2 werden als negativ bewertet; SI zwischen 2–2,5 als schwach positiv und SI $> 2,5$ als stark positiv.



N: normaler LTT, d.h. Proliferation ohne zusätzliche Stimulation



M: modifizierter LTT, d.h. Proliferation unter zusätzlicher Stimulation mit anti-CD3/CD28

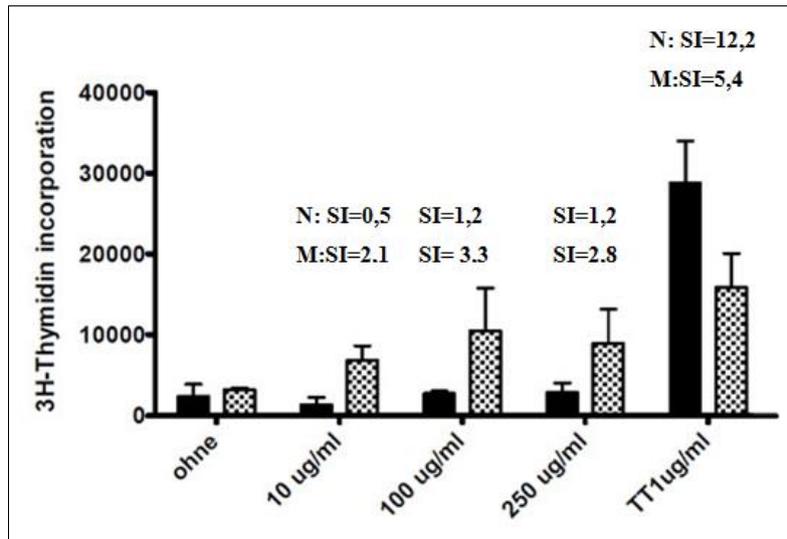


Abb.8: LTT mit Ampicillin. Bei diesem Patienten blieb der normale LTT negativ während der LTT mit zusätzlicher Kostimulation mit anti-CD3/CD28 (modifizierter LTT) positiv war. Die Messmethode wird in Abschnitt 2.3 beschrieben. X-Achse: Konzentration von Ampicillin; TT = Tetanustoxoid (Positivkontrolle) Y-Achse: Proliferation der Zellen anhand der Thymidin-Einlagerung. Stimulationsindices (SI) ≤ 2 werden als negativ bewertet; SI zwischen 2–2,5 als schwach positiv und SI $> 2,5$ als stark positiv.



N: normaler LTT, d.h. Proliferation ohne zusätzliche Stimulation



M: modifizierter LTT, d.h. Proliferation unter zusätzlicher Stimulation mit anti-CD3/CD28

Tab. 9: Haut- und in-vitro-Test ohne Spätreaktionen und negativem LTT (20/37)

Nr.	Sex	Age	Drug	SPT	ICT	ECT	Provokation	LTT konventionell	LTT CD3/CD28
3	f	35	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
4	f	34	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
6	m	39	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
11	f	27	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
12	f	44	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
13	f	49	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
14	f	62	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
15	f	78	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
16	f	59	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
19	f	59	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
20	f	60	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
21	f	79	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
22	f	26	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
23	f	57	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
24	f	59	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
29	m	26	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
30	m	52	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
31	m	46	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
33	f	54	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.
37	f	25	A/P	0	0	0	neg.	neg.	neg.

A: Ampicillin; LTT: Lymphozytentransformationstest, Stimulationsindices (SI) $\geq 2,5$ werden als positiv gewertet. SI $\leq 2,5$ werden als negativ gewertet. ICT: Intrakutantest; ECT: Extrakutantest; RAST: Radio-Allergo-Sorbent-Assay; SPT: Skin Prick Test; Intervall: Zeit zwischen Ereignis und LTT (m = month, y = year)

Tab. 10: Haut und Expositionstests ohne Spätreaktionen und falsch positivem konventionellen (2/37) und falsch positivem kostimulierten LTT (6/37)

Nr.	Sex	Age	Drug	SPT	ICT	RAST	ECT	Provokation	LTT konventionell	LTT CD3/CD28
5	f	73	A/P	0	0	0	0	neg.	neg.	pos.
7	m	43	A/P	0	0	0	0	neg.	pos.	pos.
8	f	58	A/P	0	0	0	0	neg.	neg.	pos.
17	m	24	A/P	0	0	0	0	neg.	neg.	pos.
26	f	69	A/P	0	0	0	0	neg.	neg.	pos.
35	f	27	A/P	0	0	0	0	neg.	pos.	pos.

A: Ampicillin; LTT: Lymphozytentransformationstest; ICT: Intrakutantest; ECT: Extrakutantest; RAST: Radio-Allergo-Sorbent-Assay; SPT: Skin Prick Test; Intervall: Zeit zwischen Ereignis und LTT (m = month, y = year)

Tab. 11: Stimulationsindices bei negativer Haut- und Expositionstestung und falsch positivem LTT (konventionell und CD3/CD28)

Nr.	Ampicillin 10 µg/ml	Ampicillin 100 µg/ml	Ampicillin 250 µg/ml	LTT
5	0,9	1,1	1,0	konventionell CD3/CD28
	1,9	9,0	1,9	
7	2,2	1,9	3,2	konventionell CD3/CD28
	2,8	2,3	2,4	
8	0,9	0,7	1,7	konventionell CD3/CD28
	1,5	3,1	7,6	
17	1,0	0,8	1,0	konventionell CD3/CD28
	1,7	3,7	2,4	
26	0,5	1,2	1,2	konventionell CD3/CD28
	2,1	3,3	2,8	
35	3,1	1,1	2,0	konventionell CD3/CD28
	1,7	3,5	1,3	

Stimulationsindices (SI) ≤ 2 werden als negativ bewertet; SI zwischen 2 – 2,5 als schwach positiv und SI $> 2,5$ als stark positiv.

4 Diskussion

Die Aminopenicilline Amoxicillin und Ampicillin sind aufgrund ihres günstigen Nutzen-Nebenwirkungsprofils bei vielen Indikationen auch heute noch die Antibiotika der ersten Wahl. Die schwerwiegendsten Nebenwirkungen der Aminopenicilline sind immunologische Sensibilisierungen und nachfolgende allergische Reaktionen. Laut Literatur treten diese UAW bei 5–10 % der Behandelten auf (Gomes & Demoly, 2005). Die Diagnostik allergischer Reaktionen ist häufig schwierig (Beeler & Pichler, 2006; Pichler et al., 2010). Prinzipiell unterscheidet man IgE-vermittelte Sofortreaktionen (Typ I) von Spätreaktionen (Typ II–IV, siehe Tabelle 1). Spätreaktionen können unterschiedliche Hautsymptome hervorrufen, die sich makulo-papulös, pustulös oder bullös präsentieren können. Am häufigsten treten bei Spättypreaktionen unkomplizierte makulo-papulöse Exantheme auf, ohne eine klinisch erkennbare Beteiligung innerer Organe (Schnyder & Pichler, 2000; Hausmann et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine homogene Population von Patienten mit einem unkomplizierten makulo-papulösen Exanthem in zeitlichem Zusammenhang mit der Einnahme von Amoxicillin und Ampicillin mit in-vivo- und in-vitro-Testmethoden untersucht. Zwischen Amoxicillin und Ampicillin besteht aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Struktur eine hundertprozentige immunologische Kreuzreaktivität, so dass vereinfachend auch von einer Aminopenicillin-Allergie gesprochen werden kann. Benzylpenicillin (Penicillin G) und Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V) zeigen dagegen nur in 20–30 % der Fälle eine Kreuzreaktivität mit Aminopenicillinen. Die Diagnostik bei einer vermuteten Medikamentenallergie ist aus verschiedenen Gründen nicht einfach (Pichler & Yawalkar, 2000). Die Probleme resultieren einerseits aus der großen Heterogenität der allergischen Symptome und andererseits aus dem lückenhaften Wissen über die Pathophysiologie der Allergien. Außerdem fehlen standardisierte Verfahren zur Diagnostik. Die Etablierung eines standardisierten Verfahrens für T-Zell-Reaktionen wäre für eine umfassende Diagnostik bei Medikamentensensibilisierungen sehr hilfreich (Pichler & Yawalkar, 2000). Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, stehen aktuell diverse Testverfahren zur Verfügung. Neben den in-vivo-Methoden (SPT, ECT, ICT) finden auch in-vitro-Verfahren (Immunoassay, LTT) Anwendung.

Der LTT wird seit mehreren Jahrzehnten zur Diagnose von Allergien eingesetzt. Das Grundprinzip des Tests basiert auf der Messung einer vermehrten Proliferation von T-Zellen nach Exposition mit dem Allergen. Durch einen Vergleich mit der Proliferation unbehandelter T-Zellen lässt sich der SI als Maß für die Sensibilisierung gegen das untersuchte Allergen bestimmen (siehe Kapitel 1.3 und 2.3.3).

4.1 Sensitivität des LTT

Die Sensitivität ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Eignung eines Tests bei einer definierten Fragestellung. Die Sensitivität ist ein Maß dafür, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Test (hier LTT) eine Diagnose (hier die Aminopenicillin-Allergie) erkennt. Verschiedene Studien untersuchten die Aussagekraft des LTT bei Aminopenicillin-Allergien und anderen Medikamenten-Allergien. Aminopenicilline gehören zu einer häufig getesteten Gruppe, wobei die Ergebnisse studienabhängig stark variieren. Die in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 1979 zusammengefassten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen ergaben Sensitivitäten von 30 bis 100 % (Warrington & Tse, 1979). In einem Patientenkollektiv, das sensibel auf Penicillin reagierte, wurde eine Sensitivität des LTT von 79 % ermittelt (de Weck, Spengler, & Geczy, 1974). Bei Penicillin-Allergikern betrug die Sensitivität des LTT 57 %, obwohl die Patienten teilweise in der Hauttestung keine Reaktion auf Penicilline zeigten (Vickers & Assem, 1974). In einer prospektiven Studie mit Penicillin-Allergikern lag die Sensitivität des LTT bei 74 % und die Spezifität bei 85 % (Nyfeler & Pichler, 1997). Bei einem Patientenkollektiv mit einer β -Lactam-Allergie in der Anamnese wurde die Sensitivität des LTT mit 62 % bestimmt (Luque et al., 2001). Für Aminopenicilline beträgt die Sensitivität des LTT in einer aktuellen Studie zwischen 60 und 70 % (Jurado-Palomo et al., 2010).

Für andere Medikamente erweist sich der LTT als weniger sensitiv. Bei 44 unterschiedlichen Medikamenten betrug die mittlere Sensitivität lediglich 29 % (Dobozy, Hunyadi, & Simon, 1972). Patienten mit Allergien auf Sulfonamide, Phenobarbital, Penicilline und Acetylsalicylsäure erkennt der LTT zu 64 % korrekt (Saurat, Burtin, Soubrane, & Paupe, 1973). Andere Autoren erhielten 100 % positive Ergebnisse bei verschiedenen Mehrfachallergien auf Medikamente (Halpern, Ky, Amache, Lagrue, & Hazard, 1967).

In 67 % der Fälle ergab der LTT bei Patientinnen und Patienten, die nach Einnahme von Antibiotika, Antiepileptika und Antihypertensiva Hauterscheinungen aufzeigten, positi-

ve Befunde (Hari et al., 2001). Bei anderen Autoren betrug die Sensitivität des LTT bei Patientinnen und Patienten mit makulo-papulösem Exanthem durch Medikamenteneinnahme 75 % (Sachs et al., 2002; Nagao-Dias, Teixeira, & Coelho, 2009). Die Sensitivität des LTT ist in hohem Maße abhängig von dem zu testenden Medikament und von der immunologischen Reaktion (Porebski, Gschwend-Zawodniak, & Pichler, 2011).

Ein Vorteil der vorliegenden Arbeit ist das klinisch sehr gut charakterisierte Patientengut. Das heißt, dass bei allen untersuchten Patienten eine Allergie gegen Aminopenicilline durch positive Hauttests oder positiver Exposition entweder nachgewiesen, oder durch negative Haut- und Expositionstests sicher ausgeschlossen wurde. In diesem Kollektiv lag die Sensitivität des konventionellen LTT bei 63,6 % und damit in einer ähnlichen Größenordnung wie in vorhergehenden Studien. Durch eine zusätzliche Stimulation mit Antikörpern gegen CD3/CD28 (modifizierter LTT) konnte die Sensitivität auf 81,8 % erhöht werden.

Die absolute Proliferation der Lymphozyten im LTT war sehr unterschiedlich und variierte zwischen den Versuchsreihen. Daher wurde für die Auswertung der SI herangezogen, bei dem die Proliferation der Antigen-stimulierten Zellen im Verhältnis zur Proliferation unstimulierter Zellen in der gleichen Versuchsreihe betrachtet wird. Trotz dieser Auswertungsmethode variierten die Ergebnisse beträchtlich (siehe Kapitel 3.3.1, Tabelle 8).

4.2 Spezifität des LTT

Die Spezifität des LTT liegt durchschnittlich deutlich höher als die Sensitivität und zeigt eine geringere Variabilität. Für β -Lactame geht man von einer Spezifität von 93 % aus (Luque et al., 2001). In anderen wissenschaftlichen Arbeiten sind Werte zwischen 85 % bis 100 % zu finden (Schnyder & Pichler, 2000; Hari et al., 2001; Luque et al., 2001; Naisbitt, Farrell, et al., 2003). Der LTT wurde auch im Zusammenhang mit anti-epileptischen Medikamenten (Carbamazepin, Lamotrigin) und dem sogenannten Arzneimittel-induzierten Hypersensitivitätssyndrom (drug reaction with eosinophil and systemsymptoms, DRESS) untersucht. Dabei zeigte der LTT eine Spezifität von 100 % (Hari et al., 2001; Naisbitt, Farrell, et al., 2003).

In der vorliegenden Studie waren 26 Patientinnen und Patienten in der in-vivo-Testung negativ. Dies konnte in 24 Fällen im konventionellen LTT bestätigt werden. Damit lag die Spezifität des konventionellen LTT bei 92,3 %. Analog zu den Ergebnissen der Literatur zeichnete sich damit der LTT auch in der vorliegenden Untersuchung durch eine hohe Spezifität aus. Durch eine zusätzlich Stimulation mit CD3/CD28 (modifizierter LTT) stieg jedoch der Anteil der falsch-positiven Resultate. Bei einer zusätzlichen Stimulation mit Antikörpern gegen CD3/CD28 erwiesen sich nur 20 Proben der 26 Proben als negativ und sechs Proben waren positiv. Damit verringerte sich die Spezifität von 92,3 % auf 76,9 %. Eine mögliche Ursache ist, dass durch Stimulation der Zellen mit Antikörper gegen CD3/CD28 die Proliferation der Zellen unabhängig von einer Immunreaktion angeregt wurde.

Bewertung des Stimulationsindex

Die Messgröße beim LTT ist der Einbau von [3H]-Thymidin in die DNA. Dieser Wert verhält sich proportional zur Proliferation der Lymphozyten. Eine Antigen-Exposition führt bei Lymphozyten zur klonalen Expansion. Daher deuten hohe Werte im LTT nach Inkubation mit Medikamenten auf eine Sensibilisierung des Immunsystems hin (Gill, 1967). Um auftretende Schwankungen zwischen verschiedenen Versuchsansätzen zu minimieren, wird der SI beurteilt. Dabei handelt es sich um den Quotienten der Messwerte aus Antigen-stimulierten und -unstimulierten Ansätzen. In der Literatur existiert keine einheitliche Grenze zwischen positiven und negativen Befunden. Einige Autoren werteten einen SI größer zwei als positiven Befund (Stejskal, Olin, & Forsbeck, 1986; Hari et al., 2001). Pichler spricht in seinen Veröffentlichungen von einem positiven Ergebnis ab einem SI größer zwei; mit der Erweiterung, dass bei β -Lactamen ein SI ab drei positiv bewertet wird (Pichler & Tilch, 2004). In einer weiteren Publikation wird auch von einer positive Antwort ab einem SI größer zwei gesprochen (De Gruijl et al., 1994).

In einer Studie zur Diagnostik von Indoprofen (nicht mehr auf Arzneimittelmarkt) und Ranitidin-Allergien bei Patienten mit Lupus erythematoses werteten die Autoren SI größer drei positive LTT-Ergebnisse (Saal, Daniel, & Berg, 1986). Eine andere Studie (Porebski, Gschwend-Zawodniak., & Pichler, 2011) wendete differenziertere Maßstäbe an. Allgemein galt ein SI größer zwei als positiv, während β -Lactame erst ab einem SI

größer drei als positiv betrachtet wurden. Weiter wurde bei den positiven Befunden zwischen schwach positiv ($SI > 2$ und $< 2,5$) und stark positiv ($SI > 2,5$) unterschieden (siehe Kapitel 3.3). Die Verwendung des SI als Messgröße können jedoch nicht alle Probleme bei der Interpretation des LTT lösen. Die Variabilität von Parallelansätzen innerhalb einer Versuchsreihe ist häufig groß. Valide Normwerte zur Festlegung der Grenze zwischen positiven und negativen Befunden fehlen, was den Spielraum an Interpretationsmöglichkeiten vergrößert. Zu berücksichtigen ist auch, dass die Höhe des SI nicht mit der Schwere der klinischen Symptome korreliert. Das heißt ein hoher SI ist nicht gleichbedeutend mit einer stark ausgeprägten Allergie und umgekehrt bedingen hochgradige allergische Symptome keinen extrem hohen SI im LTT (Porebski, Gschwend-Zawodniak., & Pichler, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Auswertung Mittelwerte aus drei Parallelansätzen verwendet (siehe 2.2.3)

4.3 Ist die Modifikation des LTT sinnvoll?

Die Erhöhung der Sensitivität von Allergietests ist ein wichtiges Ziel, um die diagnostische Aussagekraft einer Methode zu verbessern. Schon in früheren wissenschaftlichen Arbeiten wurde die Modifikation des LTT beschrieben. Der Zusatz von Prostaglandin-Inhibitoren bei der LTT-Diagnostik von medikamentös-verursachten, immunogenen Hepatitiden führte zur Erhöhung des SI und zur Steigerung der Sensitivität (Victorino & Maria, 1986). Andere Autoren verwendeten Zytokine (Interleukin-1 (IL-1); Interferon-gamma (IFN- γ), Cyclooxygenase-Inhibitoren (Indometacin) oder Neuraminidase als Modifikatoren (De Gruijl et al., 1994; Berg & Becker, 1995).

Die Ergebnisse dieser Studien waren ohne Einfluss auf die diagnostische Routine. Eine modifizierte Methode, die die Sensitivität des LTT erhöht ohne die Spezifität herabzusetzen, wurde bisher nicht gefunden. Daher haben modifizierte LTT bisher klinisch noch keine Bedeutung. Bislang liegen noch keine Daten zur Verwendung von Antikörpern gegen CD3/CD28 als zusätzliche Stimulation im LTT vor.

4.4 Die Rolle von CD3/CD28

Das Prinzip des LTT beruht auf der Messung der Proliferation von T-Lymphozyten. Im Rahmen einer Immunantwort werden T-Zellen aktiviert, indem sie mit ihrem Antigen-spezifischen TZR an das von MHC-Molekülen präsentierte prozessierte Antigen auf

APC binden. Neben diesem Antigen-spezifischen Kontakt kommt es zu einer weiteren Bindung zwischen T-Zelle und APC über zwei Membranmoleküle (CD28 auf der T-Zelle und B7 auf der APC). Das durch diese Bindung ausgelöste kostimulatorische Signal ist für die Aktivierung und damit auch für die klonale Proliferation der T-Zellen *in vivo* von großer Bedeutung (Weaver & Unanue, 1990; Schwartz, 1992; Jenkins & Johnson, 1993; Rudd, 1996; Van Neerven et al., 1998; Arosa, 2002; Suciú-Foca, Manavalan, & Cortesini, 2003).

Die vorliegende Untersuchung liefert Hinweise, dass es sinnvoll sein kann, die T-Zellen im LTT zusätzlich mit Antikörper gegen CD3/CD28 zu stimulieren. Durch das zusätzliche kostimulatorische Proliferationssignal konnte die Sensitivität des LTT gesteigert werden. Nachteilig wirkte sich die verminderte Spezifität aus. In weiterführenden Studien wären insbesondere größere Patientenkollektive wünschenswert.

4.5 Verbesserungsvorschläge zur Modifikation des LTT

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es durch Modifikationen möglich ist, die Sensitivität des LTT zu verbessern. Möglicherweise ließe sich so auch die Diagnostik von Aminopenicillin-Allergien optimieren. Allerdings sind weitere Studien notwendig, um Faktoren zu definieren, die die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit des LTT erhöhen.

Möglicherweise müsste der LTT zeitnah zum Auftreten der allergischen Symptome durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit, war dies nicht immer gegeben. Die Ergebnisse geben jedoch keinerlei Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen der Länge des Intervalls zwischen Auftreten der klinischen Symptome und Blutentnahme für den LTT bestand (Daten nicht gezeigt). Allerdings kann eine solche Korrelation aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten auch nicht ausgeschlossen werden. Kano et al. betonen die Wichtigkeit des Zeitpunktes der Durchführung des LTT. Bei Patienten mit makulo-papulösem Exanthem sollte der LTT möglichst innerhalb einer Woche nach Auftreten der Symptome durchgeführt werden. Bei Patienten mit DRESS sollte dagegen fünf bis acht Wochen gewartet werden, um das Ergebnis zu optimieren (Kano, Hirahara, Mitsuyama, Takahashi, & Shiohara, 2007).

Weiter sollten auch andere an allergischen Reaktionen beteiligte Immunmodulatoren als mögliche Kostimulatoren im LTT in Betracht gezogen werden. Interessante Kandidaten

für alternative Kostimulatoren sind IL-5 Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), IFN- γ und Chemokine (IL-8), die als Mediatoren der Entzündungsreaktion des Immunsystems bei einer allergischen Reaktion fungieren.

Zytokine können im Rahmen von LTT-Untersuchungen nicht nur potenziell als Kostimulatoren, sondern auch als Messparameter eingesetzt werden. Eine hohe IL-5-Konzentration im Blut wird für die bei allergischen Reaktionen auftretenden Eosinophilie verantwortlich gemacht. IL-5 wird unter anderem von aktivierten T-Zellen produziert. Möglicherweise eignet sich daher IL-5 als Messparameter für Sensibilisierung von T-Lymphozyten (Pichler, Yawalkar, Schmid, & Helbling, 2002). Die Messung der Proliferation der T-Zellen im LTT könnte durch eine Bestimmung der IL-5-Konzentration nach Stimulation der Zellen mit dem Antigen ergänzt werden (siehe Kapitel 2.3). Die Sensitivität eines auf einer IL-5-Messung beruhenden modifizierten LTT liegt bei 92 % und damit höher als die Sensitivität des konventionellen LTT (siehe Kapitel 1.3.1 und 3.3.1; Sachs, Erdmann, Al-Masaoudi, & Merk, 2001; Sachs et al., 2002; Merk, 2005).

Auch IFN- γ eignet sich möglicherweise als Marker für die in-vitro-Diagnostik von Sensibilisierungen (Posadas, Torres, Mayorga, Juarez, & Blanca, 2002; Halevy, Cohen, & Grossman, 2005). Die ersten Studien mit IFN- γ als Messparameter ergaben Sensitivitäten von 71–78 % (Gaspard et al., 2000). Im Vergleich zu PBMC gesunder Probanden ist die Sekretion von IL-2, IL-5, IL-13 IFN- γ in PBMC aus Patienten mit β -Lactam-Allergie nach Stimulation mit dem entsprechenden Antigen signifikant erhöht (Lochmutter, Beeler, Kawabata, Gerber, & Pichler, 2009). Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität von LTT wäre auch die kombinierte Messung verschiedener Parameter denkbar.

4.6 Technische Probleme des Lymphozytentransformationstest

Beim LTT handelt es sich um ein seit den 1979er Jahren etabliertes Verfahren zur Diagnostik von immunologischen Sensibilisierungen (Reidenberg & Caccese, 1975; Bigel, Heid, Basset, & Gabriel-Robez, 1976). In der wissenschaftlichen Literatur wird der LTT als geeignete Methode zur Diagnostik von Arzneimittelallergien beschrieben (Pichler & Tilch, 2004). Allerdings nie ohne Hinweise auf die mangelnde Standardisierung des

Verfahrens (z. B. fehlende Normwerte) und die fehlende Eindeutigkeit der Ergebnisse, die häufig einen breiten Interpretationsspielraum zulassen.

Darüber hinaus können auch technische Probleme bei der Durchführung Ursache für fehlerhafte Ergebnisse sein. Als eine Hauptursache für falsch-negative Ergebnisse gilt unter anderem eine immunsuppressive Arzneimitteltherapie mit zum Beispiel Glukokortikoiden. Eine mögliche direkte pharmakologische Wirkung der Penicilline und Aminopenicilline auf die Lymphozyten ohne Beteiligung des Immunsystems (Typ A, UAW, siehe Kapitel 1.2.1) können zu falschen Testergebnissen führen. Denkbar ist auch eine polyklonale Aktivierung der T-Zellen, die Antigen-unabhängig die Proliferation der PBMC steigert. Ursächlich für falsch-negative Ergebnisse sind weiterhin technische Fehler bei der Durchführung. Die Separation der PBMC ist relativ aufwendig (siehe Kapitel 2.3.1) und die resultierenden Zellzahlen variieren. Bei einer zu niedrigen Lymphozytenzahl ist die Allergen-induzierte Proliferationssteigerung schwer nachweisbar. Eine weitere Fehlermöglichkeit ist der Einsatz von ungeeigneten Allergenmengen. Ist die Konzentration zu gering, werden die Lymphozyten nicht stimuliert, bei einer zu hohen Allergenkonzentration gehen die T-Lymphozyten vorzeitig in Apoptose (sogeannter activation-induced cell death).

Das Ergebnis eines LTT ist wie oben schon erwähnt im hohen Maße vom Zeitpunkt der Testung abhängig. Je größer der Zeitraum zwischen dem Auftreten der Symptome und der Testung ist, desto kleiner wird die Wahrscheinlichkeit, mit dem LTT eine bestehende Allergie aufzudecken. Der Zeitabstand zwischen dem allergischen Symptomgeschehen und der Allergie-Testung sollte daher ein Jahr keinesfalls überschreiten (Finke, Grieco, Connell, Smith, & Sherman, 1965; Sullivan, Wedner, Shatz, Yecies, & Parker, 1981). In anderen Studien hing die Verlässlichkeit der Testergebnisse dagegen nicht mit dem zeitlichen Abstand zur Manifestation der Allergiesymptome zusammen (Mendelson, Ressler, Rosen, & Selcow, 1984; Pichichero & Pichichero, 1998).

Als Ursache für falsch-negative Ergebnisse kommt auch eine mangelnde Präsentation der angebotenen Antigene über die MHC-Moleküle in Frage. Nach dem Hapten-Carrier-Modell (siehe Kapitel 1.1.2) können kleine Moleküle nur als Antigene wirken, wenn sie an ein körpereigenes Trägerprotein (Hapten) gebunden werden. Diese Bindung an Trägerproteine ist im LTT möglicherweise nur ungenügend vorhanden.

4.7 Ist der LTT ein geeignetes diagnostisches Mittel?

Schon in den 1960er Jahren wurde der LTT als diagnostische Mittel zur Detektion von Allergien genutzt (Vischer, 1966; Sarkany, 1967). Aufgrund einer zu geringen Sensitivität hielten andere Autoren noch 1986 den LTT für die Diagnostik als unbrauchbar (Victorino & Maria, 1985, 1986). In den 1990er Jahren etablierte sich aber die Sichtweise, dass Arzneimittelexantheme durch eine Stimulation von T-Zellen hervorgerufen werden und dass daher das Prinzip des LTT zur Diagnostik dieser Allergien geeignet ist (Koponen, Pichler, & de Weck, 1986). Daher wurde der LTT aufgrund seiner, verglichen mit anderen Testverfahren relativ hohen Sensitivität, von bestimmten Arbeitsgruppen als diagnostisches Instrument genutzt (Pichler & Tilch, 2004).

Die aktuell routinemäßig eingesetzten Diagnoseschritte bei einer Medikamentenallergie beinhalten eine ausführliche Anamnese des Patienten, eine Hauttestung und eventuell eine Expositionstestung (Barna, Gogate, Deodhar, & Moeder, 1980; Schnyder & Pichler, 2000; Naisbitt, Britschgi, et al., 2003; Schnyder & Pichler, 2000). Der LTT wird bei Medikamenten-Allergien als zusätzliche diagnostische Methode verwendet. Er ist bei einer Vielzahl von Medikamenten einsetzbar und erfasst T-Zell-induzierte Spätreaktionen. Nachteilig sind die Komplexität der Arbeitsschritte, die Erfahrung mit Zellkulturen voraussetzen, der Einsatz von radioaktiven Stoffen, die Kosten und der hohe Zeitaufwand. Außerdem kann man bei einem negativen Ergebnis eine Sensibilisierung nicht sicher ausschließen (Porebski, Gschwend-Zawodniak, & Pichler, 2011).

In der vorliegenden Versuchsreihe waren 26 Patienten trotz klinischer Symptome im Vorfeld in den Hauttests negativ. Dies konnte durch den konventionellen LTT ohne Kostimulation bei 24 Personen bestätigt werden. Die Spezifität betrug damit 92,3%. Im Vergleich ergab der LTT mit Kostimulation nur 20 negative Proben, während sechs Proben positiv ausfielen. Die Spezifität fiel auf 76,9%. Den Berechnungen von Spezifität und Sensitivität wurden die Ergebnisse der Hauttests und der Expositionstests zugrunde gelegt.

4.8 Ausblick

Eine aussagekräftige und sichere Diagnostik bei Verdacht auf eine Arzneimittel-Allergie beinhaltet neben einer sorgfältigen Anamnese eine Kombination aus verschie-

denen in-vivo- und in-vitro-Testmethoden (Lochmatter, Zawodniak, & Pichler, 2009). Zurzeit gilt in der Diagnostik von β -Lactam-Antibiotika-Allergien eine Kombination aus Hauttests und einer anschließenden oralen Exposition – bei negativem Hauttestbefund – als Goldstandard (Macy, Goldberg, & Poon, 2010; Macy & Ho, 2011). Bei Patienten, bei denen Expositionstests kontraindiziert sind, könnte der LTT als Alternativmethode angewendet werden. Jedoch bleibt zum sicheren Ausschluss einer Penicillin-Allergie auch in Zukunft die kontrollierte Expositionstestung unverzichtbar.

5 Zusammenfassung

Obwohl die Behandlung mit Penicillinen zu den effektivsten und sichersten Antibiotika-Therapien zählt, treten bei dieser Stoffklasse, verglichen mit anderen Antibiotika-Gruppen, häufiger Allergien auf. Zurzeit gilt in der Diagnostik von β -Lactam-Antibiotika-Allergien eine Kombination aus Hauttests und einer anschließenden oralen Exposition – bei negativem Hauttestbefund – als Goldstandard. Daneben wurden auch nicht-invasive in-vitro Methoden als weitere Bausteine der Allergiediagnostik von Arzneimittelreaktionen entwickelt. Zu ihnen zählt unter anderem der Lymphozytentransformationstest (LTT).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit dem Antikörper gegen CD3/CD28 auf die Ergebnisse des LTT auswirkt. Als Kenngrößen wurden die Sensitivität und Spezifität des konventionellen und des modifizierten LTT verglichen. Damit soll analysiert werden, ob ein modifizierter LTT im klinischen Alltag zur erweiterten Diagnostik angewandt werden kann.

In dieser prospektiven Studie wurden 37 Patienten mit dem Verdacht auf eine Aminopenicillin-Allergie zusätzlich zur standardisierten allergologischen Diagnostik mit dem Lymphozytentransformationstest (LTT) untersucht. Mit den Haut- und Expositionstestungen konnte bei 11 der 37 Patienten eine Spättypallergie gegen Aminopenicilline / Pencillin G/V diagnostiziert werden.

Die Sensitivität des konventionellen LTT für die Allergiediagnose betrug 63,6 %. Im kostimulierten LTT wurde die Sensitivität durch die Testmodifikation auf 81,8 % gesteigert. Bei 26 Patienten wurde eine Aminopenicillin-Allergie durch negative Hauttests und anschließende negative Expositionstests definitiv ausgeschlossen. Die errechnete Spezifität liegt bei 92,3 %. Der Anteil falsch-positiver LTT-Ergebnisse stieg durch den Zusatz von Antikörpern gegen CD3/CD28 an, die Spezifität betrug somit nur noch 76,9 %.

Prinzipiell ist der LTT eine geeignete Methode zur Diagnose von Typ IV-Sensibilisierungen gegen Aminopenicilline. Die Testergebnisse sollten aber immer im Kontext mit anderen etablierten allergologischen Testverfahren interpretiert werden. Die Frage, ob der modifizierte LTT dem konventionellen LTT überlegen ist, lässt sich

anhand der erhobenen Daten nicht eindeutig beantworten. Während die beobachtete Steigerung der Sensitivität für die Variante mit den Antikörpern CD3/CD28 spricht, erweist sich die geringere Spezifität dieser Testmodifikation als nachteilig. Insgesamt ist aufgrund der hohen Spezifität der konventionelle LTT dem modifizierten LTT als Testmethode überlegen. Der LTT könnte bei Patienten, bei denen Expositionstests kontraindiziert sind, als Alternativmethode dienen. Zum sicheren Ausschluss einer Penicillin-Allergie bleibt aber auch in Zukunft die kontrollierte Expositionstestung unverzichtbar.

6 Literaturverzeichnis

- Andersen, K. E., Hjorth, N., & Menne, T. (1984). The baboon syndrome: systemically-induced allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 10(2), 97-100.
- Arosa, F. A. (2002). CD8+CD28 - T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunol Cell Biol*, 80(1), 1-13.
- Barbaud, A. M., Bene, M. C., Schmutz, J. L., Ehlinger, A., Weber, M., & Faure, G. C. (1997). Role of delayed cellular hypersensitivity and adhesion molecules in amoxicillin-induced morbilliform rashes. *Arch Dermatol*, 133(4), 481-486.
- Barna, B. P., Gogate, P., Deodhar, S. D., & Moeder, M. (1980). Lymphocyte transformation and radioallergosorbent tests in drug hypersensitivity. *Am J Clin Pathol*, 73(2), 172-176.
- Beeler, A., & Pichler, W. J. (2006). In vitro tests of T cell-mediated drug hypersensitivity. *Expert Rev Clin Immunol*, 2(6), 887-900.
- Berg, P. A., & Becker, E. W. (1995). The lymphocyte transformation test- a debated method for the evaluation of drug allergic hepatic injury. *J Hepatol*, 22(1), 115-118.
- Bernstein, I. L., Li, J. T., Bernstein, D. I., Hamilton, R., Spector, S. L., Tan, R., Sicherer, S., Golden, D. B., Khan, D. A., Nicklas, R. A., Portnoy, J. M., Blessing-Moore, J., Cox, L., Lang, D. M., Oppenheimer, J., Randolph, C. C., Schuller, D. E., Tilles, S. A., Wallace, D. V., Levetin, E., & Weber, R. (2008). Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 100 (3 Suppl 3), 1-148.
- Bigel, P., Heid, E., Basset, A., & Gabriel-Robez, O. (1976). Lymphocyte transformation test in Gell's and Coombs' drug reactions. *Hautarzt*, 27(2), 68-73.
- Blanca, M. (1994). Allergic reactions to beta-lactams. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 22(3), 107-108.
- Blanca, M., Mayorga, C., Torres, M. J., Reche, M., Moya, M. C., Rodriguez, J. L., Romano, A., & Juarez, C. (2001). Clinical evaluation of Pharmacia CAP System RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy*, 56(9), 862-870.
- Brander, C., Mauri-Hellweg, D., Bettens, F., Rolli, H., Goldman, M., & Pichler, W. J. (1995). Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals. *J Immunol*, 155(5), 2670-2678.
- Britschgi, M., Steiner, U. C., Schmid, S., Depta, J. P., Senti, G., Bircher, A., Burkhard, A., Yawalkar, N., & Pichler, W. J. (2001). T cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. *J Clin Invest*, 107(11), 1433-1441.

- Bussa, S., Rumi, C., Leone, G., & Bizzi, B. (1993). Evaluation of a new whole blood cytometric lymphocyte transformation test for immunological screening. *J Clin Lab Immunol*, *40*(1), 39-46.
- Carr, T. F., & Saltoun, C. A. (2012). Chapter 2: Skin testing in allergy. *Allergy Asthma Proc*, *33*(1), 6-8.
- Cederbrant, K., Marcusson-Stahl, M., & Hultman, P. (2000). Characterization of primary recall in vitro lymphocyte responses to bacampicillin in allergic subjects. *Clin Exp Allergy*, *30*(10), 1450-1459.
- Chandra, R. K., Joglekar, S. A., & Tomas, E. (1980). Penicillin allergy: anti-penicillin IgE antibodies and immediate hypersensitivity skin reactions employing major and minor determinants of penicillin. *Arch Dis Child*, *55*(11), 857-860.
- Coombs, R. R. (1968). Immunopathology. *Br Med J*, *1*(5592), 597-602.
- Cox, L., Williams, B., Sicherer, S., Oppenheimer, J., Sher, L., Hamilton, R., & Golden, D. (2008). Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Ann Allergy Asthma Immunol*, *101*(6), 580-592.
- De Gruijl, T. D., Moore, J. J., de Vries, E., von Blomberg-van der Flier, B. M., Fonk, J. C., & Scheper, R. J. (1994). Augmentation of antigen-specific lymphoproliferative responses in vitro by biological response modifiers. *Clin Exp Immunol*, *96*(3), 535-540.
- De Weck, A. L., Spengler, H., & Geczy, A. F. (1974). Proceedings: Stimulation of penicillin-sensitive lymphocytes by antigenic determinants covalently bound to cell membranes. *Monogr Allergy*, *8*(0), 120-124.
- Demoly, P., & Bousquet, J. (2001). Epidemiology of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *1*(4), 305-310.
- Demoly, P., Pichler, W. J., Pirmohamed, M., & Romano, A. (2008). Important questions in Allergy: 1 - drug allergy/hypersensitivity. *Allergy*, *63*(5), 616-619.
- Denman, E. J., & Denman, A. M. (1968). The lymphocyte transformation test and gold hypersensitivity. *Ann Rheum Dis*, *27*(6), 582-589.
- Descotes, J., & Choquet-Kastylevsky, G. (2001). Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*, *158*(1-2), 43-49.
- DeShazo, R. D., & Kemp, S. F. (1997). Allergic reactions to drugs and biologic agents. *JAMA*, *278*(22), 1895-1906.
- DeSwarte, R. D. (1986). Drug allergy: an overview. *Clin Rev Allergy*, *4*(2), 143-169.

- Devos, S. A., & Van Der Valk, P. G. (2002). Epicutaneous patch testing. *Eur J Dermatol*, 12(5), 506-513.
- Dobozy, A., Hunyadi, J., & Simon, N. (1972). Lymphocyte transformation test in detection of drug hypersensitivity. *Lancet*, 2(7790), 1319.
- Finke, S. R., Grieco, M. H., Connell, J. T., Smith, E. C., & Sherman, W. B. (1965). Results of Comparative Skin Tests with Penicilloyl-Polylysine and Penicillin in Patients with Penicillin Allergy. *Am J Med*, 38, 71-82.
- Gaspard, I., Guinépain, M. T., Laurent, J., Bachot, N., Kerdine, S., Bertoglio, J., Pallardy, M., & Lebecq, H. (2000). Il-4 and IFN-gamma mRNA induction in human peripheral lymphocytes specific for beta-lactam antibiotics in immediate or delayed hypersensitivity reactions. *J Clin Immunol*, 20(2), 107-116.
- Gill, F. A. (1967). The association of increased spontaneous lymphocyte transformation in vitro with clinical manifestations of drug hypersensitivity. *J Immunol*, 98(4), 778-785.
- Gomes, E. R., & Demoly, P. (2005). Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5(4), 309-316.
- Halevy, S., Cohen, A. D., & Grossman, N. (2005). Clinical implications of in vitro drug-induced interferon gamma release from peripheral blood lymphocytes in cutaneous adverse drug reactions. *J Am Acad Dermatol*, 52(2), 254-261.
- Halpern, B., Ky, N. T., Amache, N., Lagrue, G., & Hazard, J. (1967). Diagnosis of drug allergy "in vitro" by use of the lymphoblastic transformation test (LTT). *Presse Med*, 75(10), 461-465.
- Handisurya, A., Stingl, G., & Wohrl, S. (2009). SDRIFE (baboon syndrome) induced by penicillin. *Clin Exp Dermatol*, 34(3), 355-357.
- Hari, Y., Frutig-Schnyder, K., Hurni, M., Yawalkar, N., Zanni, M. P., Schnyder, B., Kappeler, A., von Greyerz, S., Braathen, L. R., & Pichler, W. J. (2001). T cell involvement in cutaneous drug eruptions. *Clin Exp Allergy*, 31(9), 1398-1408.
- Hausermann, P., Harr, T., & Bircher, A. J. (2004). Baboon syndrome resulting from systemic drugs: is there strife between SDRIFE and allergic contact dermatitis syndrome? *Contact Dermatitis*, 51(5-6), 297-310.
- Hausmann, O., Schnyder, B., & Pichler, W. J. (2010). Drug hypersensitivity reactions involving skin. *Handb Exp Pharmacol*, 196, 29-55.
- Heinzerling, L., Mari, A., Bergmann, K. C., Bresciani, M., Burbach, G., Darsow, U., Durham, S., Fokkens, W., Gjomarkaj, M., Haahtela, T., Todo Bom, A., Wöhr, S., Maibach, H., & Lockey, R. (2013). The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy*, 3(1), 3.

- Idsoe, O., Guthe, T., Willcox, R. R., & de Weck, A. L. (1968). Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bull World Health Organ*, 38(2), 159-188.
- International drug monitoring: the role of national centres. Report of a WHO meeting. (1972). *World Health Organ Tech Rep Ser*, 498, 1-25.
- Jenkins, M. K., & Johnson, J. G. (1993). Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr Opin Immunol*, 5(3), 361-367.
- Jurado-Palomo, J., Cabanas, R., Prior, N., Bobolea, I. D., Fiandor-Roman, A. M., Lopez-Serrano, M. C., Quirce, S., & Bellon, T. (2010). Use of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of DRESS syndrome induced by ceftriaxone and piperacillin-tazobactam: two case reports. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 20(5), 433-436.
- Kano, Y., Hirahara, K., Mitsuyama, Y., Takahashi, R., & Shiohara, T. (2007). Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption. *Allergy*, 62(12), 1439-1444.
- Karakaya, G., Ozturk, A. B., & Kalyoncu, A. F. (2011). Prediction of atopy by skin prick tests in patients with asthma and/or persistent rhinitis. *Allergol Immunopathol (Madr)*.
- Karow, T. , & Lang-Roth, R., (2008). *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie*. 16. Auflage. Köln, 721-732.
- Koponen, M., Pichler, W. J., & de Weck, A. L. (1986). T cell reactivity to penicillin: phenotypic analysis of in vitro activated cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*, 78(4 Pt 1), 645-652.
- Laubenthal, H., & Hugler, P. (1998). Hypersensitivity reactions. *Internist (Berl)*, 39(2), 171-178.
- Lin, R. Y. (1992). A perspective on penicillin allergy. *Arch Intern Med*, 152(5), 930-937.
- Lochmatter, P., Beeler, A., Kawabata, T. T., Gerber, B. O., & Pichler, W. J. (2009). Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy*, 64(9), 1269-1278.
- Lochmatter, P., Zawodniak, A., & Pichler, W. J. (2009). In vitro tests in drug hypersensitivity diagnosis. *Immunol Allergy Clin North Am*, 29(3), 537-554.
- Luque, I., Leyva, L., Jose Torres, M., Rosal, M., Mayorga, C., Segura, J. M., Blanca, M., & Juarez, C. (2001). In vitro T cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy*, 56(7), 611-618.

- Macy, E., Goldberg, B., & Poon, K. Y. (2010). Use of commercial anti-penicillin IgE fluorometric enzyme immunoassays to diagnose penicillin allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, *105*(2), 136-141.
- Macy, E., & Ho, N. J. (2011). Adverse reactions associated with therapeutic antibiotic use after penicillin skin testing. *Perm J*, *15*(2), 31-37.
- Mauri-Hellweg, D., Zanni, M., Frei, E., Bettens, F., Brander, C., Mauri, D., Padovan, E., Weltzien, H. U., & Pichler, W. J. (1996). Cross-reactivity of T cell lines and clones to beta-lactam antibiotics. *J Immunol*, *157*(3), 1071-1079.
- Mendelson, L. M., Ressler, C., Rosen, J. P., & Selcow, J. E. (1984). Routine elective penicillin allergy skin testing in children and adolescents: study of sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, *73*(1 Pt 1), 76-81.
- Merk, H. F. (2005). Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology*, *209*(2), 217-220.
- Münch, R. (1981). Die β -Laktamase-Inhibitoren und ihre klinische Bedeutung. *Infection*, *9*(3), 114-119.
- Nagao-Dias, A. T., Teixeira, F. M., & Coelho, H. L. (2009). Diagnosing immune-mediated reactions to drugs. *Allergol Immunopathol (Madr)*, *37*(2), 98-104.
- Naisbitt, D. J., Britschgi, M., Wong, G., Farrell, J., Depta, J. P., Chadwick, D. W., Pichler, W. J., Pirmohamed, M., & Park, B. K. (2003). Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones. *Mol Pharmacol*, *63*(3), 732-741.
- Naisbitt, D. J., Farrell, J., Wong, G., Depta, J. P., Dodd, C. C., Hopkins, J. E., Gibney, C. A., Chadwick, D. W., Pichler, W. J., Pirmohamed, M., & Park, B. K. (2003). Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, *111*(6), 1393-1403.
- Nyfelner, B., & Pichler, W. J. (1997). The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy*, *27*(2), 175-181.
- Padovan, E., von Greyerz, S., Pichler, W. J., & Weltzien, H. U. (1999). Antigen-dependent and -independent IFN-gamma modulation by penicillins. *J Immunol*, *162*(2), 1171-1177.
- Patriarca, G., D'Ambrosio, C., Schiavino, D., Larocca, L. M., Nucera, E., & Milani, A. (1999). Clinical usefulness of patch and challenge tests in the diagnosis of cell-mediated allergy to betalactams. *Ann Allergy Asthma Immunol*, *83*(3), 257-266.
- Pichichero, M. E., & Pichichero, D. M. (1998). Diagnosis of penicillin, amoxicillin, and cephalosporin allergy: reliability of examination assessed by skin testing and oral challenge. *J Pediatr*, *132*(1), 137-143.

- Pichler, W. J., Yawalkar, N., Schmid, S., & Helbling, A. (2002). Pathogenesis of drug-induced exanthems. *Allergy*, *57*(10), 884-893.
- Pichler, W. J. (2002). Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *2*(4), 301-305.
- Pichler, W. J. (2003). Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med*, *139*(8), 683-693.
- Pichler, W. J., Adam, J., Daubner, B., Gentinetta, T., Keller, M., & Yerly, D. (2010). Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. *Med Clin North Am*, *94*(4), 645-664.
- Pichler, W. J., Beeler, A., Keller, M., Lerch, M., Posadas, S., Schmid, D., Spanou, Z., Zawodniak, A., & Gerber, B. (2006). Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int*, *55*(1), 17-25.
- Pichler, W. J., & Tilch, J. (2004). The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*, *59*(8), 809-820.
- Pichler, W. J., & Yawalkar, N. (2000). Allergic reactions to drugs: involvement of T cells. *Thorax*, *55 Suppl 2*, S61-65.
- Porebski, G., Gschwend-Zawodniak, A., & Pichler, W. J. (2011). In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clin Exp Allergy*, *41*(4), 461-470.
- Posadas, S. J., & Pichler, W. J. (2007). Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts. *Clin Exp Allergy*, *37*(7), 989-999.
- Posadas, S. J., Torres, M. J., Mayorga, C., Juarez, C., & Blanca, M. (2002). Gene expression levels of cytokine profile and cytotoxic markers in non-immediate reactions to drugs. *Blood Cells Mol Dis*, *29*(2), 179-189.
- Rawlins, M. D. (1981). Clinical pharmacology. Adverse reactions to drugs. *Br Med J*, *282*(6268), 974-976.
- Reddy, P. M., Nagaya, H., Pascual, H. C., Lee, S. K., Gupta, S., Lauridsen, J. I., & Jerome, D. C. (1978). Reappraisal of intracutaneous tests in the diagnosis of reaginic allergy. *J Allergy Clin Immunol*, *61*(1), 36-41.
- Reid, M. J., Lockey, R. F., Turkeltaub, P. C., & Platts-Mills, T. A. (1993). Survey of fatalities from skin testing and immunotherapy 1985-1989. *J Allergy Clin Immunol*, *92*(1 Pt 1), 6-15.
- Reidenberg, M. M., & Caccese, R. W. (1975). Lymphocyte transformation tests and suspected drug allergy. *J Lab Clin Med*, *86*(6), 997-1002.
- Rieder, M. J. (1993). Immunopharmacology and adverse drug reactions. *J Clin Pharmacol*, *33*(4), 316-323.

- Rieder, M. J. (1997). In vivo and in vitro testing for adverse drug reactions. *Pediatr Clin North Am*, 44(1), 93-111.
- Rodriguez-Pena, R., Antunez, C., Martin, E., Blanca-Lopez, N., Mayorga, C., & Torres, M. J. (2006). Allergic reactions to beta-lactams. *Expert Opin Drug Saf*, 5(1), 31-48.
- Romano, A., Blanca, M., Torres, M. J., Bircher, A., Aberer, W., Brockow, K., Pichler, W. J., & Demoly, P. (2004). Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy*, 59(11), 1153-1160.
- Rudd, C. E. (1996). Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity*, 4(6), 527-534.
- Saal, J. G., Daniel, P. T., & Berg, P. A. (1986). Indoprofen-induced aplastic anemia in active connective tissue disease detected by drug-specific lymphocyte transformation. *Klin Wochenschr*, 64(10), 481-485.
- Sachs, B., Erdmann, S., Al-Masaoudi, T., & Merk, H. F. (2001). In vitro drug allergy detection system incorporating human liver microsomes in chlorazepate-induced skin rash: drug-specific proliferation associated with interleukin-5 secretion. *Br J Dermatol*, 144(2), 316-320.
- Sachs, B., Erdmann, S., Malte Baron, J., Neis, M., al Masaoudi, T., & Merk, H. F. (2002). Determination of interleukin-5 secretion from drug-specific activated ex vivo peripheral blood mononuclear cells as a test system for the in vitro detection of drug sensitization. *Clin Exp Allergy*, 32(5), 736-744.
- Sarkany, I. (1967). Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity. *Lancet*, 1(7493), 743-745.
- Saurat, J. H., Burtin, C. J., Soubrane, C. B., & Paupe, J. R. (1973). Cell mediated hypersensitivity in skin reactions to drugs (except contact dermatitis). *Clin Allergy*, 3(4), 427-437.
- Schnyder, B., & Pichler, W. J. (2000). Skin and laboratory tests in amoxicillin- and penicillin-induced morbilliform skin eruption. *Clin Exp Allergy*, 30(4), 590-595.
- Schnyder, B., & Pichler, W. J. (2009). Mechanisms of drug-induced allergy. *Mayo Clin Proc*, 84(3), 268-272.
- Schwartz, R. H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*, 71(7), 1065-1068.
- Siles, R. I., & Hsieh, F. H. (2011). Allergy blood testing: A practical guide for clinicians. *Cleve Clin J Med*, 78(9), 585-592.

- Stejskal, V. D., Olin, R. G., & Forsbeck, M. (1986). The lymphocyte transformation test for diagnosis of drug-induced occupational allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 77(3), 411-426.
- Suciu-Foca, N., Manavalan, J. S., & Cortesini, R. (2003). Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol*, 11(3-4), 235-244.
- Sullivan, T. J., Wedner, H. J., Shatz, G. S., Yecies, L. D., & Parker, C. W. (1981). Skin testing to detect penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 68(3), 171-180.
- Thong, B. Y. (2010). Update on the management of antibiotic allergy. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2(2), 77-86.
- Trcka, J., Seitz, C. S., Bröcker, E. B., Gross, G. E., & Trautmann, A. (2007). Aminopenicillin-induced exanthema allows treatment with certain cephalosporins or phenoxymethyl penicillin. *J Antimicrob Chemother*, 60(1), 107-111.
- Uzzaman, A., & Cho, S. H. (2012). Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc*, 33 Suppl 1, S96-99.
- Van Neerven, R. J., Van de Pol, M. M., Van der Zee, J. S., Stiekema, F. E., De Boer, M., & Kapsenberg, M. L. (1998). Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression. *Clin Exp Allergy*, 28(7), 808-816.
- Vickers, M. R., & Assem, E. S. (1974). Tests for penicillin allergy in man. I. Carrier effect on response to penicilloyl conjugates. *Immunology*, 26(2), 425-440.
- Victorino, R. M., & Maria, V. A. (1985). Modifications of the lymphocyte transformation test in a case of drug-induced cholestatic hepatitis. *Diagn Immunol*, 3(4), 177-181.
- Victorino, R. M., & Maria, V. A. (1986). Drug-induced hepatitis and lymphocyte transformation test in presence of prostaglandin inhibitor. *Lancet*, 1(8491), 1209-1210.
- Vischer, T. L. (1966). Lymphocyte cultures in drug hypersensitivity. *Lancet*, 2(7461), 467-469.
- Warrington, R. J., & Tse, K. S. (1979). Lymphocyte transformation studies in drug hypersensitivity. *Can Med Assoc J*, 120(9), 1089-1094.
- Weaver, C. T., & Unanue, E. R. (1990). The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunol Today*, 11(2), 49-55.
- Williams, P. B., Dolen, W. K., Koepke, J. W., & Selner, J. C. (1992). Comparison of skin testing and three in vitro assays for specific IgE in the clinical evaluation of immediate hypersensitivity. *Ann Allergy*, 68(1), 35-45.

7 Abkürzungsverzeichnis

CD.....	cluster of differentiation
CPM.....	counts per minute
DRESS.....	drug reaction with eosinophila and systemic symptoms
ECT.....	Epikutantest
ICT.....	Intrakutantest
IFN.....	Interferon
Ig.....	Immunglobulin
IL	Interleukin
LTT.....	Lymphozytentransformationstest
PBMC.....	peripheral blood mononuclear cells/ periphere mononukleäre Zellen
PBS.....	phosphate buffered saline
RAST.....	Radio-Allergo-Sorbent-Assay
rpm.....	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT.....	Raumtemperatur
SEM.....	Standardfehler des Mittelwertes
SI.....	Stimulationsindex
SPT.....	Skin Prick Test
TT.....	Tetanus-Toxoid
TZR.....	T-Zell-Rezeptor
UAW.....	Unerwünschte Arzneimittelwirkung

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abb. 1: Das „Hapten-Carrier-Modell“	4
Abb. 2: “Pharmacological interactions of drugs with immune receptors”	5
Abb. 3: Strukturformel des Penicillin G (A) und des Ampicillin (B).	8
Abb. 4: Aufbau des LTT modifiziert nach Bussa	12
Abb. 5: Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf des modifizierten Lymphozytentransformationstests.....	18
Abb. 6: Positiver konventioneller und modifizierter LTT mit Ampicillin.....	24
Abb. 7: Negativer konventioneller und modifizierter LTT mit Ampicillin.	28
Abb. 8: LTT mit Ampicillin. Konventionller LTT negativ, modifizierter LTT positiv	29

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tab. 1: Klassifikation der Allergien nach Coombs & Gell (Coombs, 1968)	2
Tab. 2: Klassifikation der unerwünschten Arzneimittelwirkungen Modifiziert nach Schnyder & Pichler (2009).....	7
Tab. 3: Demographische und klinische Daten der Patienten.....	14
Tab. 4: Ergebnisse der Haut- und Expositionstestungen	21
Tab. 5: Vierfeldertafel des konventionellen LTT bei Aminopenicillin-Allergie	22
Tab. 6: Vierfeldertafel des modifizierten LTT bei Aminopenicillin-Allergie.....	23
Tab. 7: Haut- und in-vitro-Tests bei Patienten (11/37) mit Aminopenicillin-Allergie.	25
Tab. 8: Stimationsindices (SI) der konventionellen und modifizierten LTTs bei den 11 Patienten von 37 mit nachgewiesener Aminopenicillin-Allergie.....	25
Tab. 9: Haut- und in-vitro-Test ohne Spätreaktionen und negativem LTT (20/37)	30
Tab. 10: Haut und Expositionstests ohne Spätreaktionen und falsch-positivem konventionellen (2/37) und falsch-positivem kostimulierten LTT (6/37).....	31
Tab. 11: Stimationsindices bei negativer Haut- und Expositionstestung und falsch- positivem LTT (konventionell und CD3/CD28).....	31

Danksagung

Ich möchte mich außerordentlich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Trautmann, Herrn Dr. med. A. Kerstan und Frau Christa Albert (MTA) für die hervorragende, geduldige und menschliche, sowie sehr herzliche Betreuung bedanken.

Lebenslauf

Klinische Tätigkeit

Seit 2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Kinder- u. Jugendpsychiatrie Universität Heidelberg; Ärztin auf der Station für Entwicklung und Psychotherapie für Jugendliche und Akutstation, sowie Mitarbeit in der Spezialambulanz AtRisk

Lehrtätigkeit

Seit WS 2012 Lehrtätigkeit im Fach Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Heidelberg: POL-Tutorin (Problem-orientiertes Lernen), Psycho-KIT-Tutorin (Psychologisches Kommunikationstraining) und OSCE-Prüferin im Rahmen des medizinischen Curriculums (HeiCuMed)
Vorlesung zum Thema „Essstörungen“ im Rahmen der Ringvorlesung Kinder- u. Jugendpsychiatrie an der Universität Heidelberg

Schul- und Hochschulausbildung

2011 2. Staatsexamen Humanmedizin Universität Würzburg
2010 Praktisches Jahr: Innere Medizin, Stadtspital Waid, Zürich
Kinder- und Jugendpsychiatrie, Universitätsspital Zürich
Chirurgie, CHU Fort-de-France, Martinique
2007 1. Staatsexamen Humanmedizin an der Universität Würzburg
2005 Studium der Humanmedizin Universität Würzburg
2004 Studium der Zahnmedizin Universität Hamburg
2003 Allgemeine Hochschulreife
1998-2003 St. Raphael-Gymnasium Heidelberg
1995-1998 Gymnasium Walldorf
1990-1994 Grundschule St. Leon-Rot

Heidelberg, den 15.07.2015