

**AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR
DERMATOLOGIE UND ALLERGOLOGIE DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Thomas Ruzicka

**Evaluation lymphozytärer In-vitro-Verfahren zur
Detektion einer Nickelsensibilisierung**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von
Sascha Ständer
aus
Stuttgart
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Thomas Ruzicka

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Franz-Xaver Reichl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2018

Meiner geliebten Tochter Clara Ojdana

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	PATIENTEN	10
2.2	FRAGEBOGEN	12
2.3	EPIKUTANTEST	12
2.4	LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTEST	13
2.5	ZYTOKINANALYSE MITTELS ZYTOMETRISCHEM BEAD ASSAY	14
2.6	STATISTISCHE METHODEN	14
3	ERGEBNISSE	15
3.1	EPIKUTANTEST REAKTIONEN	15
3.2	REAKTION IM LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTEST	21
3.3	SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DES LYMPHOZYTENTRANSFORMATIONSTESTS IN BEZUG AUF DEN EPIKUTANTEST	25
3.4	ZYTOKINMESSUNGEN BEI 30 PATIENTEN	26
3.5	INTERLEUKIN 8 UND INTERLEUKIN 5 ALS QUOTIENT ZUR DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN NICKELALLERGISCHEN UND NICHT-ALLERGISCHEN INDIVIDUEN	30
5	DISKUSSION	32
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	39
7	DANKSAGUNG	40
4	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
9	LITERATURVERZEICHNIS	42

Abkürzungsverzeichnis:

LTT – Lymphozytentransformationstest

ECT – Epikutantest

PHA – Phytohaemagglutinin

TT – Tetanustoxoid

PBMC- peripheral blood mononuclear cells, Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

SI – Stimulationsindex

INF – Interferon

IL – Interleukin

TNF – Tumornekrosefaktor

NK-Zellen – Natürliche Killerzellen

1 EINLEITUNG

1.1. Allergische Reaktionen

Allergische Reaktionen sind überschießende spezifische Überempfindlichkeitsreaktionen. Hier reagiert das Immunsystem nach anfänglicher Sensibilisierung bei erneutem Kontakt auf einen meist natürlich vorkommenden Stoff, welcher bei Gesunden ohne krankmachende Reaktion vertragen wird.

Man unterscheidet verschiedene Arten von allergischen Reaktionen abhängig von deren klinischem Verlauf und der Ausprägung, sowie der zugrundeliegenden Pathophysiologie. Ein gängiges Modell, auch wenn dies vermutlich vereinfacht ist und nicht die gesamte Vielfalt der allergischen Reaktionen widerspiegelt, ist die Einteilung nach Coombs und Gell¹. Diese wurde in den 60er Jahren entwickelt und unterscheidet vier Reaktionstypen. Die ersten drei sind antikörpervermittelt, der vierte ist zellulär, d.h. vorwiegend über T-Lymphozyten getragen.

Typ I:

Typ I Allergien sind in der Klinik auch als Sofort-Typ-Allergien bekannt und werden hauptsächlich durch Immunglobulin E (IgE) vermittelt. Die klinische Manifestation variiert von der isoliert auftretenden Urtika bis hin zum generalisierten anaphylaktischen Schock bei Beteiligung verschiedener Organsysteme. Auch die allergische Rhinokonjunktivitis und das allergische Asthma bronchiale sind Beispiele für Erkrankungen, welchen pathophysiologisch eine Typ I Allergie zugrunde liegt. Das molekulare Korrelat zu dieser Reaktion bildet die Antigen-Bindung und nachfolgende Quervernetzung von IgE-Antikörpern auf IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten und insbesondere Mastzellen. Die dadurch bedingte Freisetzung von Histamin und anderen proinflammatorischen und vasoaktiven Substanzen führt zu der oben genannten Symptomatik.

Typ II:

Dieser Typ entspricht einer zytotoxischen Reaktion. Es kommt durch zellgebundene Immunglobuline zur Aktivierung der Komplementkaskade und als Konsequenz zur Lyse der Zelle. Zusätzlich kann es durch aktivierte Komplementfragmente zur Rekrutierung und Migration von zusätzlichen proinflammatorischen Effektorzellen, wie zum Beispiel Makrophagen oder Natürlicher Killer Zellen (NK-Zellen) kommen. Diese werden ebenfalls aktiviert und setzen zytotoxische Substanzen frei. Dieser zugrundeliegende Pathomechanismus erklärt das klinische Erscheinungsbild verschiedener autoimmunologischer Erkrankungen und bei einigen Medikamenten-Allergien. Ein klassisches Beispiel für die Typ II Reaktion ist auch die Transfusionsreaktion.

Typ III:

Bei der Entstehung der Typ III Reaktion spielen Immunkomplexe pathophysiologisch die entscheidende Rolle. So kommt es durch Antikörper-Antigen Komplexe, welche vornehmlich an Basalmembranen kleiner Gefäße akkumulieren, zu einer Komplement-Aktivierung und als Folge zu einer proinflammatorischen Immunantwort. Ein Beispiel dafür ist die Serumkrankheit.

Typ IV:

Auch Allergie vom verzögerten Typ (Spättyp) genannt. Bestimmend für diesen Typ sind sensibilisierte T-Lymphozyten, die nach Antigenkontakt über Stunden bis Tage z.B. ein allergisches Kontaktekzem entstehen lassen. Weitere klinische Beispiele sind Arzneimittellexantheme, die Tuberkulinreaktion sowie die Graft-versus-Host-Krankheit und Transplantat-Abstoßungsreaktionen. Insbesondere das allergische Kontaktekzem kann zu einem hohen Leidensdruck führen, wenn wiederholte Krankheitsschübe auftreten, aufgrund einer Sensibilisierung gegen häufige Kontaktallergene im privaten oder beruflichen Umfeld. Aus diesem Grund hat eine zuverlässige Diagnostik und Therapie einen hohen Stellenwert in der Allergologie.

1.2 Das allergische Kontaktekzem

Das allergische Kontaktekzem ist ein klassisches Beispiel für eine Spättyp-Allergie. Es ist eine entzündliche Dermatose mit epidermaler Beteiligung, welche eine Überempfindlichkeit gegenüber meist niedermolekularen Substanzen widerspiegelt. Diese niedermolekulare Substanz – beispielsweise Metall (Nickel)Ionen - wird als potentielles Kontaktallergen als Hapten nach Proteinbindung in einer ersten Phase über antigenpräsentierende Langerhans-Zellen in Haut und speziell in regionalen Lymphknoten T-Lymphozyten präsentiert. In einem präferentiellen Zytokin-Milieu (unter anderem INF-gamma, IL-2, IL-4, IL-4, IL-12) wird die Sensibilisierung gebahnt sowohl von CD4-positiven T-Lymphozyten vom TH1-Typ als auch von CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten. Das führt bei erneutem Allergenkontakt (Auslösephase) zu verschiedenen Phänomenen, wie Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und epidermaler Schädigung mit interzellulärem Ödem (histologisch „Spongiose“). Während bei wiederholtem Kontakt mit Irritantien generell ein kumulativ-toxisches Ekzem entsteht, ist nur bei stattgefundenener spezifischer lymphozytärer Sensibilisierung ein kontaktallergisches Ekzem möglich. Bei der Spättyp-Allergie unterscheidet man also die Induktionsphase und die Auslösephase bei bereits Sensibilisierten.

1.3 Epidemiologie des Kontaktekzems auf Nickel

Nickel ist eines der häufigsten Kontaktallergene. Die Nickelsensibilisierungsrate der Allgemeinbevölkerung wird mit ca. 13% angegeben und variiert geschlechterspezifisch^{2,3}. So konnten bereits im Jahr 1979 Prystowsky et al. in einer Kohorte von 1158 Amerikanern zeigen, dass die Nickel-Allergie bei Frauen zehnfach häufiger ist als bei Männern (9% im Vergleich zu 0,9%). Auch zeigte die Arbeitsgruppe, dass eine Nickelallergie bei Individuen nach Ohringstechen (und Tragen von Modeschmuck-Ohringen, oder bei lokaler Rötung nach Modeschmuckexposition) an der Haut signifikant höher war als bei Individuen ohne eine solche Anamnese⁴.

Daraufhin folgten weitere Arbeiten, die ähnliche Angaben zur Geschlechterverteilung sowie der Assoziation zu nickelhaltigem Modeschmuck machten. So zeigten Larsson-

Stymne und Widström 1985 eine Prävalenz einer Nickel-Allergie von 9% bei 960 epikutan getesteten Schulmädchen im Alter zwischen 8-15, wobei die Prävalenz von Modeschmuck, Piercings und Ohrlochstechern bei 73% lag. Mädchen mit einem Piercing hatten auch in dieser Studie eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, eine Nickel-Allergie zu haben im Vergleich zu dem Kollektiv, das keine Piercings angab ($p < 0,001$)⁵. Interessanterweise zeigte eine Arbeit mit einem Kollektiv von Frauen höheren Alters (mittleres Alter zwischen 18-26 Jahren) eine deutlich höhere Prävalenz der Nickelallergie an. So beobachteten Mattila et al. in einer Gruppe von 284 finnischen Studenten bei 38,8% der weiblichen Studierenden einen positiven Epikutantest für Nickel⁶. Diese Prävalenzzunahme mit dem Alter könnte für eine höhere Prävalenz bei längerer oder wiederholter Exposition gegenüber dem Kontaktallergen Nickel im Laufe der Jahre sprechen. Das unterstreichen auch „gegenläufige“ Daten, die nach Einführung der Europäischen Nickeldirektive einen entsprechenden Rückgang der Nickelsensibilisierung in jüngeren Bevölkerungsanteilen widerspiegeln⁷.

1.4 Klinisches Erscheinungsbild

Ein allergisches Kontaktekzem durch Nickel kann lokalisiert (z.B. Hände), mit Streureaktionen oder auch generalisiert speziell bei hämatogener Auslösung auftreten. Akute Dermatitis oder – bei andauernder Exposition – chronisches Ekzem weisen klinische Charakteristika auf: Erythem mit ödematöser Schwellung und epidermaler Komponente; Dyshidrosis oder Blasenbildung; Schuppung, Krusten oder bei Chronifizierung Hyperkeratosen; Juckreiz und Kratzspuren. Wenn bei anhaltender Allergenexposition ein chronisches Stadium entsteht, dann dominieren Hyperkeratosen, Schuppung und eine Lichenifikation. Die Ausweitung über „Streuerde“ ist typisch. Die Histopathologie zeigt eine epidermale Verdickung und Spongiose, lymphozytäre Infiltrate und oft auch eosinophile Granulozyten.

1.5 Diagnostik

Epikutantest

Bei klinischem Verdacht auf eine Spättypallergie, speziell auf ein kontaktallergisches Ekzem wird der Epikutantest durchgeführt.

Der Epikutantest (ECT) ist gegenwärtig der Goldstandard in der Diagnostik einer Kontaktsensibilisierung⁸. Aus ökonomischer Sicht und auch aufgrund der einfachen Durchführbarkeit und Zuverlässigkeit des Testes stellt er die erste wichtige Säule der Diagnostik dar. Bei der Durchführung werden die zu testenden Kontaktallergene in standardisierter Konzentration in kleinen Aluminiumkammern mit Hilfe eines Pflasters (englisch auch patch test) auf dem Rücken des Patienten angebracht. Dieses Pflaster mit den entsprechenden Allergenen wird nach 48 Stunden entfernt und die Reaktionen am Rücken werden das erste Mal abgelesen. Weitere Ablesungen erfolgen nach 72 Stunden – und weniger häufig – auch als Spätablesung nach 5-7 Tagen. Bei einer Sensibilisierung sind ekzematöse Hautreaktionen zu sehen, die von irritativen Reaktionen abzugrenzen sind und ein geschultes und erfahrenes Auge erfordern. Man unterscheidet Reaktionen von -, ?, +, ++, +++ bis ir, wobei – keine Reaktion, ? eine fragliche Reaktion (nur Erythem), + ein Erythem mit Infiltrat, ++ ein Erythem mit Infiltrat, Papeln und Vesikeln und +++ ein Erythem mit Infiltrat und zusätzlich konfluierende Vesikel bezeichnet. Sind verschiedene unspezifische Veränderungen zu sehen (Seifeneffekte, Vesikel, Blasen, Nekrosen), so spricht man von einer irritativen Reaktion (ir). Die Interpretation des Hautbefundes bzw. Testergebnisses ist somit eine Herausforderung und erfordert ein hohes Maß an klinischer Erfahrung und Präzision. Eine Voraussetzung für die Durchführbarkeit des Epikutantest ist eine gesunde Haut.

Lymphozytentransformationstest

Während der Epikutantest als Allergietest eine klinische „Provokationstestung“ an der Haut ist, lässt der Lymphozytentransformationstest nicht unmittelbar auf eine gefundene

Allergie schließen. Der Lymphozytentransformationstest (LTT) ist eine In-vitro-Methode zum Nachweis einer Antigensensibilisierung. Der Lymphozytentransformationstest wird eher als wissenschaftlicher Ansatz z.B. bei der Frage nach einer Arzneimittel- oder Metall-(speziell Nickel-) Sensibilisierung eingesetzt. Dieser Test wurde in den 60-er Jahren etabliert und laufend verfeinert. Im Laufe der Zeit wurde eine Methode mit höherer Sensitivität angewandt. Da sich teilende Zellen Thymidin in neu entstehende DNA einlagern, wurde jetzt die Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin zur Zellkultur als Detektionssystem für Zellproliferation eingeführt^{9,10}. Eine Quantifizierung der Zellproliferation wird durch Relation der Thymidineinbaurrate (Radioaktivität als „cpm“=counts per minute) im stimulierten versus unstimulierten in-vitro-Zellkulturansatz möglich.

Bei der klassischen Durchführung des Lymphozytentransformationstest werden zunächst periphere mononukleäre Zellen aus venösem Blut über Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dann werden die Zellen in komplettiertem Medium aufgenommen und mit Kontrollstimuli sowie dem zu testenden Allergen mehrtägig kultiviert. Im Falle einer Sensibilisierung erfolgt eine Proliferation („Transformation“) der ansonsten „ruhenden“ T-Lymphozyten. Der Lymphozytentransformationstest ist eine kontrovers diskutierte Methode, zu der generell unter dem Abschnitt „Material und Methodik“ sowie ausführlicher in der Diskussion Stellung genommen wird.

Lymphozytentransformationstest und Nickelallergie

Während der Lymphozytentransformationstest zu Beginn seiner Entwicklung hauptsächlich im Bereich der Medikamentenunverträglichkeit evaluiert und auch hoch publiziert wurde¹¹, entstanden erst im Verlauf Arbeiten in Bezug auf den Lymphozytentransformationstest als diagnostisches Mittel zur Detektion einer Metallallergie, insbesondere der Nickelallergie, welche jedoch gegenläufige Aussagen zur diagnostischen Stärke postulierten. Cederbrant et al. prognostizierten, dass sich der Lymphozytentransformationstest zur Diagnose einer Nickelallergie nicht etablieren würde, da die Zahl der falsch-positiven Ergebnisse in diesem Verfahren zu hoch seien

¹². Trotz der zunehmenden Anzahl von Publikationen in den letzten Jahren gerade in diesem Gebiet scheint es einen mangelnden Konsensus zu geben, welche die optimalen Bedingungen zur Durchführung dieses Testes sind.

ZIELE DIESER ARBEIT

Der Epikutantest ist Goldstandard für den Nachweis einer Spättyp-Allergie (Typ-IV-Allergie). Schon lange wird geforscht, ob die zugrundeliegende T-Lymphozyten-Sensibilisierung nicht auch in einem In-vitro-Test nachweisbar ist. Speziell zu „Nickelallergie“ gibt es aber meist nicht vergleichbare Ansätze der verschiedenen Laborgruppen – und es existieren praktisch keine größeren Studien zur Evaluierung des Lymphozytentransformationstest. So soll die hier vorliegende Arbeit Fragen zum Thema „Nickelallergie – Epikutantest – Lymphozytentransformationstest“ klären helfen, indem folgende Ziele verfolgt werden:

1. Aus dem Patientengut, das zur Abklärung von Hauterkrankungen an der Klinik für Dermatologie und Allergologie einen Standard-Epikutantest erhält: Definition von Patientenkollektiven mit / ohne anamnestischem Verdacht auf Nickelallergie (z.B. Modeschmuckunverträglichkeit) mit / ohne positive Nickel-Epikutantestreaktion.
2. Verarbeitung von Blutproben dieser Kollektive im Lymphozytentransformationstest-Verfahren unter Einsatz von Nickel- und Kontroll-Stimuli.
3. Lymphozytentransformationstest-Durchführung mit verschiedenen Allergen-(Nickel-)Konzentrationen zur Ermittlung der besten spezifischen (und am wenigsten unspezifischen) Stimulationsbedingung.
4. Dementsprechend Optimierung des Lymphozytentransformationstest -Protokolls im Hinblick auf korrektes Erkennen eines (im Epikutantest verifizierten) Nickel-Allergie-Status bei gleichzeitig möglichst „Nicht-Lymphozytentransformationstest-Reaktivität“ bei Epikutantest-negativen Blutspendern.
5. Frage nach unterschiedlich ausgeprägter Nickel-Lymphozytentransformationstest-Reaktivität in Abhängigkeit von der Reaktionsstärke im Epikutantest.
6. Analyse des In-vitro-Zytokinmusters im Vergleich Nickel-Epikutantest-/Lymphozytentransformationstest-positiver versus –negativer Blutspender. Damit Frage nach einer möglichen Zytokinkonstellation, die eine unspezifisch-

irritative Zellantwort von einer spezifischen (Sensibilisierungs-abhängigen) unterscheidet.

Zusammenfassend soll also im Hinblick auf Nickelallergie ein optimiertes Lymphozytentransformationstest-Protokoll unter Einbeziehen der Epikutantest-Reaktivität erarbeitet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Insgesamt wurden 100 Individuen in dieser Arbeit untersucht, welche sich aufgrund eines Verdachtes auf Metallallergie oder einer Dermatitis anderer Genese (insbesondere jedoch zum Ausschluss eines allergischen Kontaktekzems) in der Hautklinik vorstellten. Einschlusskriterien waren, dass keine immunsuppressive topische oder systemische Therapie erfolgt war sowie die Abwesenheit von Metallimplantaten im Sinne von Knie- oder Hüft-Totalendoprothesen, Metallplatten in Gelenken, oder Schrauben in Knochen. Auch wurde explizit auf die Abwesenheit von Piercings jeglicher Art geachtet. Dentalimplantate (da aus Titan oder Keramik) wurden hier nicht berücksichtigt. Die hundert Probanden wurden weiter eingeteilt in 50 Patienten (14 weiblich, 36 männlich; mittleres Alter $53,50 \pm 17,90$ (Standardabweichung) Jahre), welche anamnestisch über keine Hautreaktionen nach Metallkontakt, jedoch über eine Dermatitis nach Exposition eines anderen Stoffes, berichteten. Diese 50 Patienten wurden als Negativ-Kontrollen rekrutiert. Die andere Gruppe bestand aus 50 Patienten (46 weiblich, 4 männlich; mittleres Alter $64,84 \pm 8,92$ (Standardabweichung) Jahre), welche von einem lokalen Pruritus, einer Rötung, oder einem Ekzem nach Kontakt mit Metallutensilien an der Haut berichteten und somit eine positive Anamnese für den Verdacht auf eine Metall(Nickel)allergie hatten.

Nachdem die informierte Einwilligung der Patienten eingeholt war, wurde die Anamnese strukturiert mit Hilfe eines vorgefertigten standardisierten Fragebogens erhoben. Zusätzlich wurde im Anschluss bei allen Patienten ein Epikutantest durchgeführt, wobei mindestens die 29 Allergene der Standardreihe der Deutschen Kontaktallergie Gruppe eV (DKG) auf dem Rücken der Patienten aufgebracht wurde und je nach speziellen anamnestischen Angaben zusätzliche Reihen.

Zuvor wurden von allen Patienten Blutproben aus der peripheren Armvene entnommen. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der LMU genehmigt. Die Charakteristika der Patienten werden in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Charakteristika der 100 eingeschlossenen Patienten

	Kontrollen		Patienten mit V.a. Nickelallergie	
Alter (in Jahren) (±Standardabweichung)	53,50 ± 17,90		64,84 ± 8,92	
Geschlecht, n (%)	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
	36 (72)	14 (28)	4(8)	46(92)
Atopie, n (%)	20 (40)		27 (55,1)	

Zusätzlich wurde bei 30 von insgesamt 100 Patienten eine Zytokinanalyse anhand der Lymphozytentransformationstest-Zellkulturüberstände durchgeführt. Von diesen 30 Patienten hatten 15 einen negativen Epikutantest und eine negative Anamnese in Bezug auf nickelhaltige Utensilien. Diese Kontrollen hatten ebenfalls eine negative Nikotinanamnese, hatten keinerlei Metallimplantate im Körper oder Piercings und hatten in der letzten Zeit keine immunsuppressive Therapie (3 weiblich, 12 männlich; mittleres Alter 61,47 Jahre). Die andere Hälfte dieser 30 Patienten bestand aus 15 Patienten mit einem positiven Epikutantest für Nickel (13 weiblich, 2 männlich; mittleres Alter 63,8 Jahre) sowie einem positiven Lymphozytentransformationstest und entsprechend einer positiven Anamnese. Generelle Charakteristika dieser Patienten sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Charakteristika der 30 Patienten mit Analyse des Zytokinmusters

	Kontrollen		Patienten mit V.a. Nickelallergie	
Mittleres Alter (in Jahren)	61,47		63,8	
Geschlecht, n	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
	12	3	2	13
Atopie, n	2		10	

2.2 Fragebogen

Die Anamnese-Erhebung bei den 100 Patienten erfolgte mithilfe eines standardisierten Anamnesebogens. Inhaltlich ließ sich der Fragebogen in einen allgemeinen und speziell allergologischen Teil gliedern.

Im allgemeinen Teil wurde die generelle Anamnese erhoben (Angaben zu Nikotinabusus, aktuelle Medikamentenanamnese, Nebenerkrankungen etc.). Zusätzlich wurde zielgerichtet und fokussiert die Anamnese der Hautveränderungen erhoben (Rötung, Pruritus, Ekzeme) nach Kontakt mit Metallutensilien (z.B. Armbanduhren, Jeansknöpfe, Modeschmuck etc.) auf der Haut. Auch wurde nach Erkrankungen des atopischen Formenkreises (allergisches Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis, atopisches Ekzem) gefragt sowie nach allergologischen Vorerkrankungen. Alle Teilnehmer wurden erneut über die Abwesenheit von (potentiell) nickelhaltigen metallischen Implantaten im Körper und Piercings gefragt, da Metalle im Körper Nickel freisetzen können und somit das Ergebnis dieser Arbeit verfälschen könnten.

2.3 Epikutantest

Der Epikutantest wurde gemäß der Richtlinie der Deutschen Kontaktallergie Gruppe eV (DKG) durchgeführt⁸. Bei allen Patienten wurde mindestens die Standardreihe mit 29 Kontaktallergenen mittels eines Pflasters am Rücken aufgeklebt. Diese enthielt Nickel (5%), Kobalt und Chrom. Zusätzliche Testreihen wurden anhand der anamnestisch erfragten Exposition aufgeklebt.

Die Substanzen wurden am oberen Rücken der Probanden angebracht. Am zweiten und dritten Tag wurden die Reaktionen am Rücken von Ärzten der Allergieabteilung der Hautklinik der LMU München abgelesen. Die Reaktion war positiv, negativ, oder irritativ. Positive Reaktionen wurden als +, ++ und +++ quantifiziert. Die Ergebnisse wurden im Informationsverbund Dermatologischer Kliniken (IVDK) dokumentiert.

2.4 Lymphozytentransformationstest

Bei allen 100 Patienten wurde der Lymphozytentransformationstest durchgeführt. Hierfür wurden von jedem Patienten 60 ml venöses heparinisiertes Blut entnommen. Um Störfaktoren eines Nickelkontaktes zu vermeiden, wurde das Blut noch vor Aufkleben des Epikutantestes abgenommen. Zunächst wurden aus dem peripheren Blut die mononukleären Zellen (PBMC) durch Dichte-Zentrifugation isoliert. Anschließend wurden die PBMCs in angereichertem RPMI-Medium mit autologem Serum resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml). Nach Aussaat in 96-Well-Zellkulturplatten (0,2 ml/well) erfolgte die Stimulation mit dem respektiven Allergen (hier Nickel) oder Kontrollsubstanzen. Insgesamt erfolgte der Lymphozytentransformationstest gemäß der Methode von Dr. B. Summer^{9,10}. Die Stimulation erfolgte im Vierfachansatz über eine Periode von 6 Tagen. Als Positivkontrollen dienten das auf T-Zellen mitogen wirkende Phytohämagglutinin (PHA) 2,4 µg/ml (Biochrom, Berlin) sowie Tetanus Toxoid (TT) 5 µg/ml (Chiron Behring, Berlin).

Da Nickel in höheren Konzentration unspezifisch stimulierend auf T-Zellen wirken kann¹³⁻¹⁵, haben wir diese Wirkung durch frühere Experimente ausgeschlossen und die drei Nickel Konzentrationen verwenden können, die die beste Unterscheidung zwischen Ni-allergischen und nicht-allergischen Individuen erlauben⁹. Aus diesem Grund wurde zu Beginn dieser Arbeit bei den Patienten relativ viel Blut abgenommen (60 ml). Nun konnte die Blutmenge auf ca 20 ml reduziert werden, was die Patientenfreundlichkeit dieses Testes weiter steigern konnte. Die drei Nickelkonzentrationen waren $7,5 \times 10^{-6}$ M NiSO₄, 1×10^{-5} M NiSO₄ und $2,5 \times 10^{-5}$ M NiSO₄^{9,10}.

Als Negativkontrollen wurden PBMCs „nur“ in Medium benutzt¹⁶. Nach fünf Tagen wurde den Zellen ³H Thymidin als radioaktive Markierung hinzugegeben. Am nächsten Tag wurde die Proliferation in Bezug auf die inkorporierte Radioaktivität gemessen. Das Ergebnis wurde als Stimations Index (SI) ausgedrückt, welcher bestimmt ist durch den Quotienten von inkorporierter Radioaktivität in stimulierten zu unstimulierten Kulturen. Ein SI > 3 wurde hierbei als positives Ergebnis im Lymphozytentransformationstest gewertet.

2.5 Zytokinanalyse mittels zytometrischem Bead Assay

Die Zytokinproduktion in den stimulierten / Kontroll-Zellkulturen wurde durch Analyse von Überständen nicht-radioaktiv markierter Parallelkulturen an Tag sechs gemessen. Die Analyse der Kontrollstimulation durch TT und PHA hatte den Zweck, mögliche Unterschiede der beiden Gruppen bezüglich „Stimulierbarkeit“ ihrer PBMC anhand der Zytokinantwort aufzudecken. Überstände dieser Kulturen, welche nicht radioaktiv markiert wurden, wurden durchflusszytometrisch über einen FACS Canto (BD Biosciences, Heidelberg) mit einem zytometrischen Bead Array (BD Biosciences, Heidelberg) auf die Anwesenheit von IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF alpha, INF gamma untersucht.

2.6 Statistische Methoden

Die Daten wurden mit dem Programm SPSS statistics 23.0 von IBM ausgewertet. Es wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test durchgeführt. Ein Ergebnis galt als signifikant, wenn $p < 0,05$.

3 ERGEBNISSE

Die häufigste Indikation für die Durchführung eines Epikutantestes war bei beiden Gruppen (Kontrollen und Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie) der Verdacht auf ein allergisches Kontaktekzem.

20 von den 50 Kontrollen sowie 27 von den 50 Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie berichteten über das Vorhandensein von mindestens einer Erkrankung des atopischen Formenkreises. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. 12 der 50 Kontrollindividuen und 6 der 50 Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie waren Raucher. Die Anwesenheit von Zahnimplantaten wurde von 4 der 50 Kontrollen und von 12 der 50 Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie angegeben.

3.1 Epikutantest Reaktionen

In dem Kontrollkollektiv reagierten 15 der 50 Patienten mit mindestens einer positiven Reaktion im Epikutantest in der Standardreihe. In Bezug auf Nickel wurde bei 2 der 50 Kontrollen eine positive Reaktion gesehen. Dagegen zeigten 30 der 50 Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie mindestens eine Reaktion in der Standardreihe des Epikutantests, 20 waren negativ. Von diesen 30 Patienten zeigten 18 Patienten eine positive Reaktion im Epikutantest auf Nickel. Dies ist in Tabelle 3 und 4 aufgeführt. Abgesehen von Nickel und Kobalt, zeigten die beiden Gruppen ein ähnliches Verteilungsmuster bezüglich der 10 häufigsten Allergene. Die Kontaktallergien der 30 Patienten, bei denen eine Zytokinmusteranalyse durchgeführt wurde zeigt Tabelle 5. Eine Übersicht der gesamten Reaktionsmuster der Kontrollpatienten im Epikutantest ist in Tabelle 6 aufgeführt. Eine Liste der Diagnosen der Kontrollindividuen zeigt Tabelle 7.

Tabelle 3: Die 10 häufigsten Kontaktallergene der Standardreihe der Kontroll-Patienten ohne Verdacht auf eine Nickel-Allergie

Kontaktallergen	Positive Reaktionen, n/50	%
Duftstoff Mix II	6	12
Perubalsam	5	10
Methylchloroisothiazolinon	5	10
Duftstoff Mix I	4	8
Kolophonium	3	6
Methyldibromoglutaronitril	3	6
Thiuram Mix	2	4
Mercapto Mix	2	4
Nickel(II) Sulfat	2	4
Epoxidharz	2	4

Tabelle 4: Die 10 häufigsten Kontaktallergene der Standardreihe der Patienten mit Verdacht auf eine Nickelallergie

Kontaktallergen	Positive Reaktionen, n/50	%
Nickel(II) Sulfat	18	36
Duftstoff Mix I	8	16
Perubalsam	8	16
Propolis	4	8
Duftstoff Mix II	3	6
Kobalt(II) Chlorid	3	6
Kolophonium	2	4
Thiuram Mix	1	2
N-Isopropyl-N-Phenyl-p-Phenyldiamin	1	2
Sandelholz Öl	1	2

Tabelle 5: Kontaktallergene und atopische Erkrankungen der 30 Patienten, bei denen eine Zytokinmusterbestimmung durchgeführt wurde (AE = Atopisches Ekzem, AA = Allergisches Asthma bronchiale, AR = Allergische Rhinokonjunktivitis)

Proband	Erkrankung des atopischen Formenkreises	Positive Reaktion im Epikutantest auf
Kontrollpatient 1	-	
Kontrollpatient 2	AR	
Kontrollpatient 3	-	
Kontrollpatient 4	-	
Kontrollpatient 5	-	
Kontrollpatient 6	-	
Kontrollpatient 7	-	
Kontrollpatient 8	-	
Kontrollpatient 9	-	
Kontrollpatient 10	-	
Kontrollpatient 11	-	
Kontrollpatient 12	-	
Kontrollpatient 13	-	
Kontrollpatient 14	-	
Kontrollpatient 15	AR	
Nickelallergischer Patient 1	-	Nickel
Nickelallergischer Patient 2	AR, AA	Nickel, Kobalt
Nickelallergischer Patient 3	AE	Nickel, Perubalsam, Bufexamac
Nickelallergischer Patient 4	AR,AA,AE	Nickel
Nickelallergischer Patient 5	-	Nickel
Nickelallergischer Patient 6	-	Nickel
Nickelallergischer Patient 7	-	Nickel
Nickelallergischer Patient 8	AR, AA	Nickel
Nickelallergischer Patient 9	AR, AA	Nickel

Nickelallergischer 10	Patient	AE	Nickel
Nickelallergischer 11	Patient	-	Nickel
Nickelallergischer 12	Patient	AR	Nickel
Nickelallergischer 13	Patient	AR	Nickel, Perubalsam, Kobalt
Nickelallergischer 14	Patient	AR, AE	Nickel, Kolophonium
Nickelallergischer 15	Patient	AA	Nickel

Tabelle 6: Übersicht der Reaktionsmuster der Kontrollpatienten im Epikutantest;
 *Natriumlaurylsulfat hat eine Sonderrolle, da es als Irritanskontrolle dient und die genannten „positiven“ Reaktionen hier irritativ sind (und nicht Kontaktallergie bedeuten)

Kontaktallergen	Positive Reaktion bei den Kontrollen	%	Positive Reaktionen bei den Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie	%
Kaliumdichromat	1/50	2	0/50	0
Thiuram-Mix	2/50	4	1/50	2
Kobalt (II)-chlorid, 6*H2O	1/50	2	3/50	6
Perubalsam	5/50	10	8/50	16
Kolophonium	3/50	6	2/50	4
N-Isopropyl-N'-phenyl-p-phenylendiamin	0/50	0	1/50	2
Wollwachsalkohole	1/50	2	0/50	0
Mercapto-Mix	2/50	4	0/50	0
Epoxidharz	2/50	4	0/50	0
Nickel (II)-sulfat, 6*H2O	2/50	4	18/50	36
p-tert.-Butylphenol formaldehyd	0/50	0	0/50	0
Formaldehyd	1/50	2	0/50	0
Duftstoff-Mix	4/50	8	8/50	16
Terpentin	1/50	2	0/50	0

(Chlor)- Methylisothiazolinon (MCI/MI)	5/50	10	0/50	0
Paraben-Mix	0/50	0	0/50	0
Cetylstearylalkohol	0/50	0	0/50	0
Zink-diethyldithiocarbamat	1/50	2	0/50	0
Dibromdicyanobutan (Methyldibromo Glut.)	3/50	6	1/50	2
Propolis	0/50	0	4/50	8
Bufexamac	0/50	0	1/50	2
Compositae Mix II	0/50	0	0/50	0
Mercaptobenzothiazol	0/50	0	0/50	0
Lyräl	2/50	4	0/50	0
Bronopol (2-Brom-2- nitropropan-1,3-diol)	1/50	2	0/50	0
Duftstoff-Mix II	6/50	12	3/50	6
Natriumlaurylsulfat (SLS)*	0/50	0	2/50	4
Ylang Ylang (I+II) Öl	0/50	0	0/50	0
Sandelholzöl	0/50	0	1/50	2
Jasmine absolut	2/50	4	1/50	2

Tabelle 7: Diagnosen der Kontrollindividuen

Diagnose	n	%
Handekzem	7/50	14
Dermatitis unklarer Genese	23/50	46
Periorale Dermatitis	1/50	2
Kontaktallergisches Ekzem	9/50	18
Toxisches Kontaktekzem	1/50	2
Atopisches Ekzem	4/50	8
Nummuläres Ekzem	2/50	4
Rosazea	2/50	4
Hyperkeratotisches Hand- und Fußekzem	1/50	2

3.2 Reaktion im Lymphozytentransformationstest

Der Lymphozytentransformationstest wurde in Bezug auf zwei Parameter ausgewertet. So wurde zunächst eine Auswertung abhängig von der Anamnese der Individuen vorgenommen und als zweites eine Auswertung in Bezug auf Nickel-Reaktivität im Epikutantest.

Die ähnlichen Reaktionsmuster auf Tetanus Toxoid und Phytohämagglutinin in beiden Gruppen illustriert die Vergleichbarkeit der Reaktivität der PBMCs. So zeigten die Kontrollen eine Reaktivität von $SI = 11,15 \pm 1,09$ und die Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie eine Reaktivität von $SI = 11,61 \pm 1,69$ in Bezug auf Tetanus Toxoid. Auf Phytohämagglutinin reagierten mit einem $SI = 18,70 \pm 1,53$ Kontrollen und $21,43 \pm 2,26$

Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie. Diese vergleichbaren Reaktionsmuster auf die Positivkontrolle veranschaulicht, dass in beiden Gruppen ähnliche Bedingungen für die PBMCs herrschten. Im Folgenden werden die Reaktionen für Nickel aufgeführt.

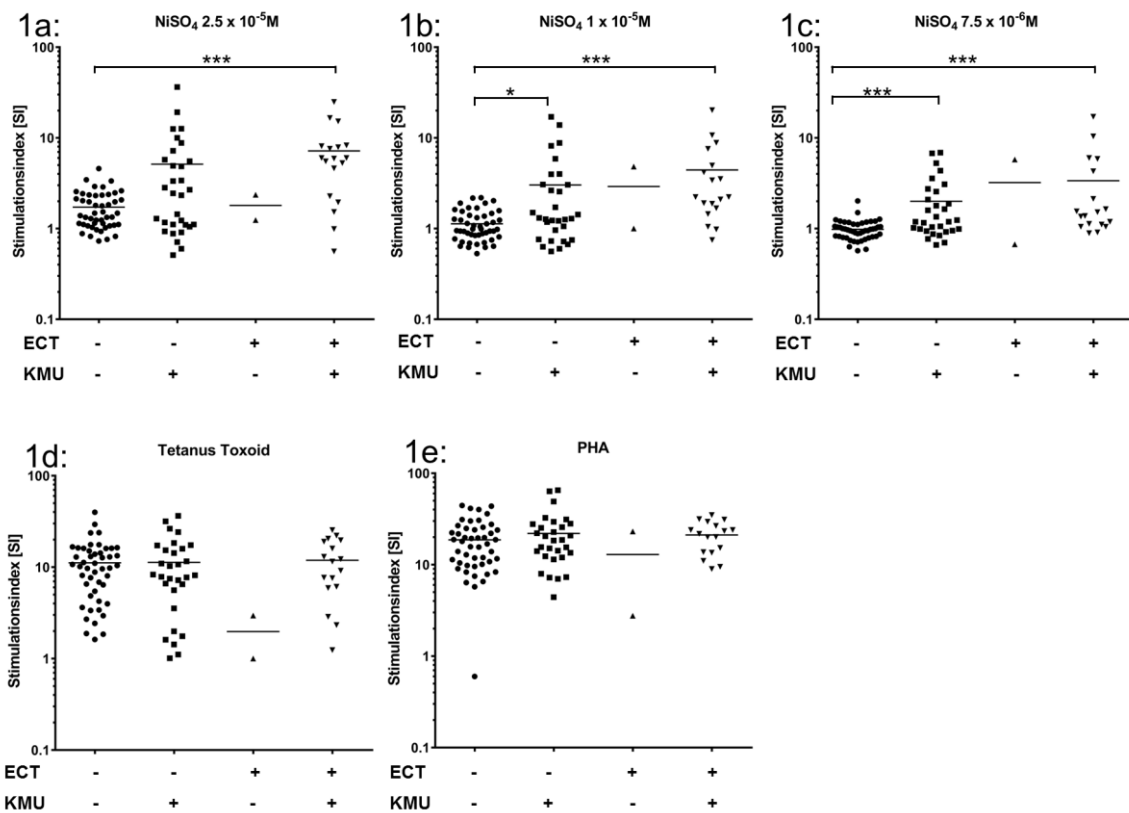
Bei der Konzentration von NiSO_4 $2,5 \times 10^{-5}$ M zeigten zwei der Kontrollpatienten eine positive und 48 eine negative Reaktion. In der Gruppe der Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie wurden 26 Patienten positiv getestet, während 24 Patienten keine Reaktivität im Lymphozytentransformationstest zeigten.

Bei der Konzentration von NiSO_4 1×10^{-5} M war einer der Kontrollpatienten positiv im Lymphozytentransformationstest und 49 negativ. In der Gruppe der Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie zeigten 17 Patienten eine positive und 33 Patienten eine negative Reaktion im Lymphozytentransformationstest.

In der Konzentration von NiSO_4 $7,5 \times 10^{-6}$ M war einer der Kontrollpatienten positiv im Lymphozytentransformationstest und 49 negativ. In der Gruppe der Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie zeigten 11 Patienten eine positive und 39 Patienten eine negative Reaktion im Lymphozytentransformationstest.

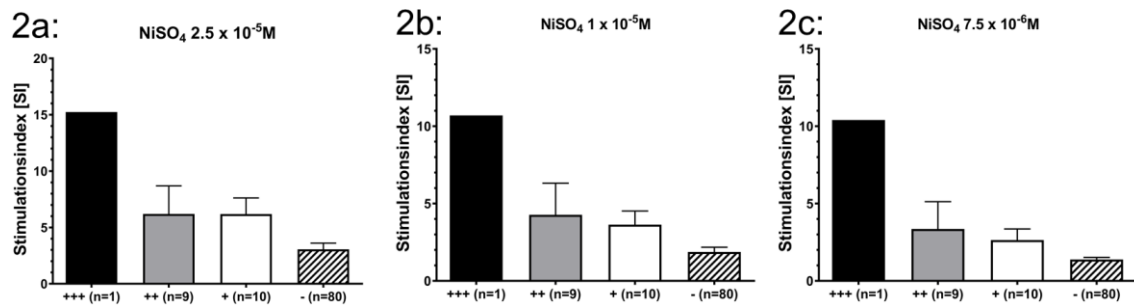
Dies ist zusammengefasst in Abbildung 1.

Abbildung 1: Reaktionen im Lymphozytentransformationstest und im Epikutantest (PT) aus Ständer et al.¹⁷.



Zusammengefasst kann man sagen, dass 20 von 100 Probanden im Epikutantest positiv auf Nickel reagiert haben während 80 von 100 eine negative Epikutantest Reaktion gezeigt haben. Hier zeigte sich, dass von den 20 Patienten mit positivem Epikutantest 17 Patienten in mindestens einer der drei Nickelkonzentrationen im Lymphozytentransformationstest positiv reagiert hatten. Von den 80 Patienten, die ein negatives Epikutantestergebnis aufwiesen, reagierten 67 Patienten auch negativ im Lymphozytentransformationstest und 13 hatten ein positives Lymphozytentransformationstest Ergebnis. Dies wird in Abbildung 2 illustriert.

Abbildung 2: Reaktivität im Lymphozytentransformationstest in Bezug auf Reaktionsstärke im Epikutantest (PT) aus Ständer et al. ¹⁷.



Wie Abbildung 2a-c zeigt, korrelierte die Stärke der Reaktion im Epikutantest mit der Höhe des SI des Lymphozytentransformationstestes.

Wenn man noch zusätzlich die Anamnese mit einbezog, konnte man zu folgenden Ergebnissen kommen:

- 1.) Die Lymphozytentransformationstest Reaktivität bei den 48 Epikutantest negativen Individuen der Kontrollgruppe zeigte sich nur bei 2 dieser Kontrollen positiv und zwar in der Konzentration NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M. In den zwei anderen Konzentrationen waren keine positiven Reaktionen im Lymphozytentransformationstest bei diesen 48 Epikutantest negativen Patienten zu testen.
- 2.) Die Lymphozytentransformationstest Reaktivität bei den 18 Epikutantest positiven Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie war bei 12 Patienten ebenfalls positiv in der Konzentration von NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M, bei 8 in der Konzentration NiSO₄ 1 x 10⁻⁵ M und bei 5 Patienten in der Konzentration NiSO₄ 7,5 x 10⁻⁶ M. Betrachtet man isoliert die beiden Nickelkonzentrationen NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M und NiSO₄ 1 x 10⁻⁵ M, so haben insgesamt 16 von 18 Patienten mit einem positiven Epikutantest und einer positiven Anamnese einen positiven Lymphozytentransformationstest.
- 3.) Die Lymphozytentransformationstest Reaktivität bei den 32 Epikutantest negativen Patienten mit Verdacht auf Nickelallergie war mit 13 Patienten in der Konzentration von NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M, 9 Patienten in der Konzentration von

NiSO₄ 1 x 10⁻⁵ M und 6 Patienten in der Konzentration NiSO₄ 7,5 x 10⁻⁶ M deutlich erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation mit der Konzentration NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M und NiSO₄ 1 x 10⁻⁵ M die größten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergab, wenn man den Epikutantest als Referenz miteinbezog. Außerdem ist es bemerkenswert, dass in der Gruppe der Anamnese-positiven Patienten d.h. mit Verdacht auf Nickelallergie, welche im Epikutantest negativ waren, ein doch relativ hoher Anteil besteht, bei dem der Lymphozytentransformationstest positiv ausgefallen ist (siehe hierzu auch Abbildung 1).

3.3 Sensitivität und Spezifität des Lymphozytentransformationstests in Bezug auf den Epikutantest

Um einen direkten Vergleich zwischen Lymphozytentransformationstest und Epikutantest anstellen zu können, wurden die Ergebnisse der Reaktivität im Lymphozytentransformationstest bei den Konzentrationen von NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M und NiSO₄ 1 x 10⁻⁵ M zusammengenommen (Lymphozytentransformationstest galt als positiv, wenn mindestens ein positives Ergebnis in einer der beiden Konzentrationen zu verzeichnen war).

Die Sensitivität errechnete sich aus den 16 von 18 Epikutantest -positiven Patienten mit Verdacht auf eine Nickelallergie, die auch im Lymphozytentransformationstest eine positive Reaktion zeigten. Die Sensitivität war somit bei 88%.

Von 48 Patienten mit einem negativen Epikutantest und einer negativen Anamnese bezüglich einer Metallallergie zeigten lediglich 2 eine positive Reaktion im Lymphozytentransformationstest, woraus sich eine Spezifität von 96% errechnet.

Offen bleibt die Frage, ob der Lymphozytentransformationstest nicht tatsächlich eine höhere Sensitivität haben könnte, da gezeigt wurde, dass ein großer Teil der Patienten

mit anamnestischem Verdacht auf eine Nickelallergie und negativem Epikutantest ein positives Ergebnis im Lymphozytentransformationstest hatten.

3.4 Zytokinmessungen bei 30 Patienten

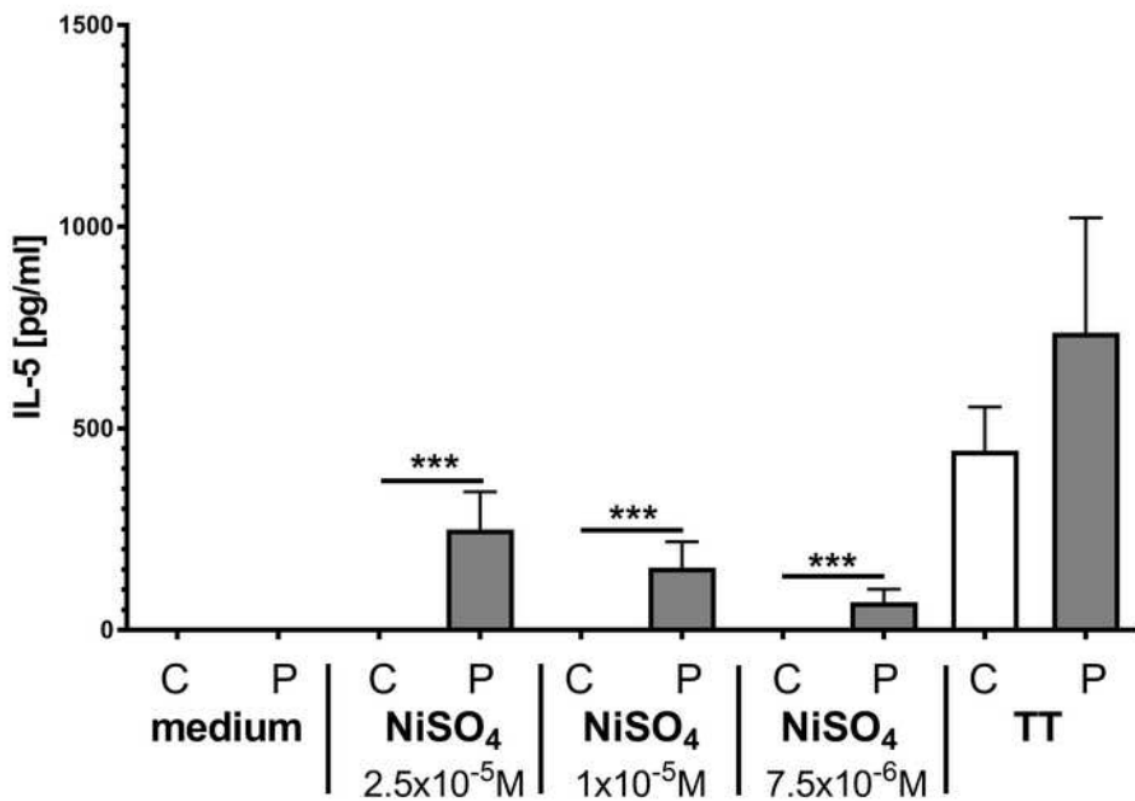
Von den neun gemessenen Zytokinen konnte bei vier Zytokinen ein Unterschied in beiden Gruppen gemessen werden. Diese waren IL-5, IL-8, TNF alpha und INF gamma. Am signifikantesten waren jedoch die Unterschiede zwischen den Gruppen bei den Zytokinen IL-5 und IL-8. So zeigte die Gruppe der 15 Patienten mit einem negativen Epikutantest und negativen Lymphozytentransformationstest eine signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-8 unter Stimulation mit Nickelsalzen. Das Zytokin mit der höchsten Korrelation zur Lymphozytentransformationstest Reaktivität bei Nickelstimulation war jedoch IL-5 ($p < 0,0001$) (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Korrelation nach Spearman. Unterschied zwischen IL-5 und IL-8 in Relation zum Lymphozytentransformationstest (aus Summer et al. Manuskript in Revision)

	Korrelation SI/IL-8 (Spearman)	Korrelation SI/IL-5 (Spearman)
NiSO₄ 2.5x10⁻⁵M	-0.286	0.640
NiSO₄ 1x10⁻⁵M	-0.409	0.709
NiSO₄ 7.5x10⁻⁶M	-0.311	0.691
Tetanus toxoid	0.043	0.061

Am höchsten war der Unterschied in der IL-5 Ausschüttung zwischen den 15 Kontrollpatienten und 15 Patienten mit positivem Lymphozytentransformationstest und Epikutantest, wenn man die Proben mit der Konzentration von NiSO_4 $2,5 \times 10^{-5}$ M stimulierte (Abbildung 3)($p < 0,0001$).

Abbildung 3: Unterschiedliche IL-5 Freisetzung bei 15 Kontrollen (C) und 15 Patienten (P) mit positivem Lymphozytentransformationstest und Epikutantest bei NiSO_4 $2,5 \times 10^{-5}$ M



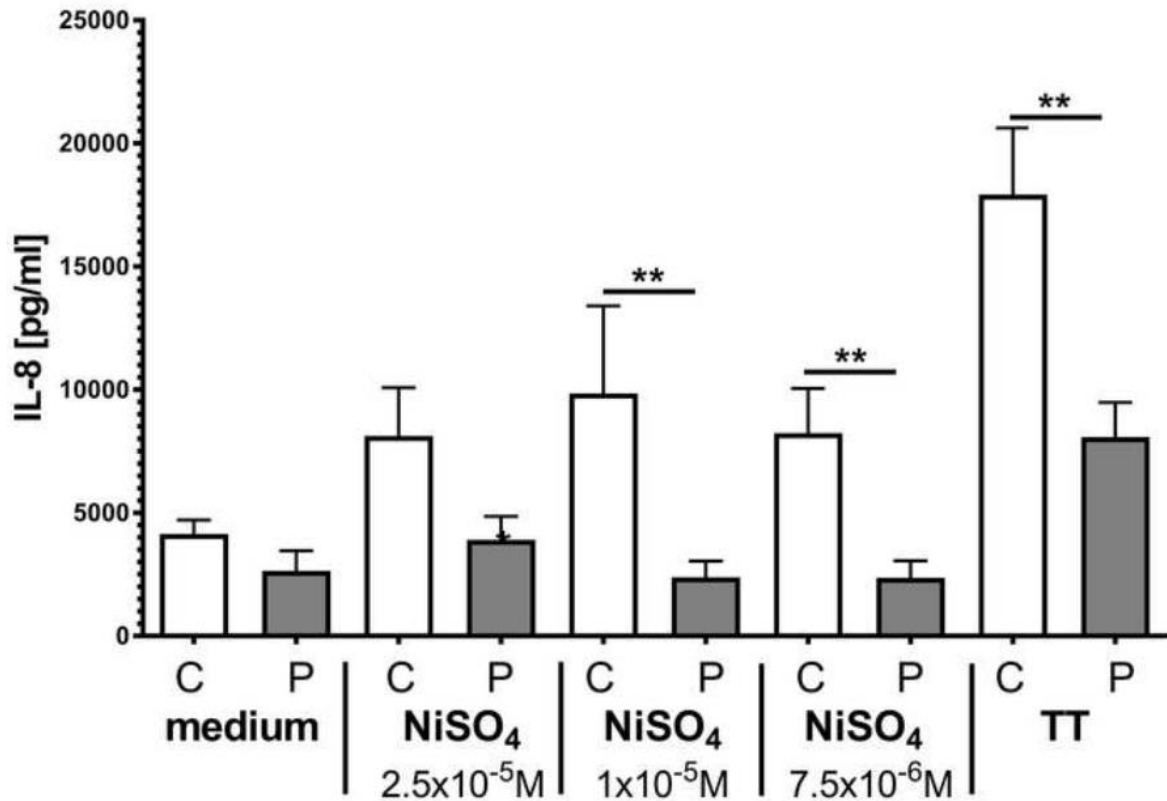
Insgesamt konnten folgende Werte für Interleukin 5 in der Gruppe der 15 Patienten mit positivem Lymphozytentransformationstest und Epikutantest und in der Gruppe mit negativem Lymphozytentransformationstest und Epikutantest gemessen werden:

- 1.) Für die Nickelkonzentration NiSO_4 $2,5 \times 10^{-5}$ M $249,36 \pm 92,99$ pg IL-5/ml
beziehungsweise $1,70 \pm 0,61$ pg IL-5/ml
- 2.) Für die Nickelkonzentration NiSO_4 1×10^{-5} M $154,77 \pm 61,19$ pg IL-5/ml
beziehungsweise $0,33 \pm 0,23$ pg IL-5/ml
- 3.) Für die Nickelkonzentration NiSO_4 $7,5 \times 10^{-6}$ M $68,83 \pm 32,44$ pg IL-5/ml
beziehungsweise $0,17 \pm 0,17$ pg IL-5/ml

Als Negativkontrolle wurde der Überstand aus nur Medium-stimulierten Kulturen benutzt, welche auch keine spontane IL-5 Freisetzung zeigten.

Interleukin 8 hingegen wurde vermehrt von den 15 Kontrollen mit negativem Lymphozytentransformationstest und Epikutantest bei Stimulation mit Nickel freigesetzt (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: IL-8 Freisetzung bei 15 Epikutantest und Lymphozytentransformationstest negativen Kontrollen (C) und bei 15 Epikutantest und Lymphozytentransformationstest positiven Patienten (P).



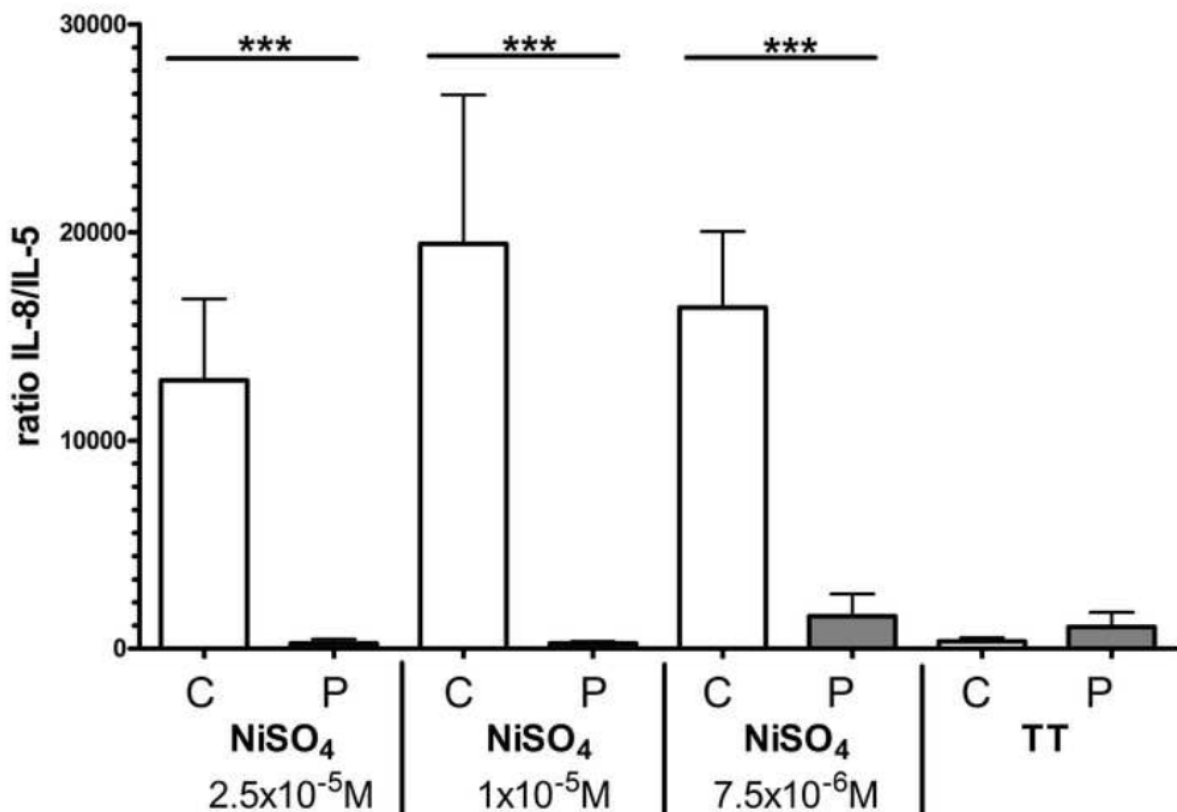
Die Produktion von IL-8 war bei den Epikutantest und Lymphozytentransformationstest negativen Kontrollen signifikant höher unter der Stimulation von Nickel, als bei den Epikutantest und Lymphozytentransformationstest positiven Patienten. Im Folgenden sind die Werte des freigesetzten IL-8 aufgelistet:

- 1.) Für die Nickelkonzentration NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M 8119 ± 1969 pg IL-5/ml beziehungsweise 3911 ± 943,4 pg IL-5/ml
- 2.) Für die Nickelkonzentration NiSO₄ 1 x 10⁻⁵ M 9851 ± 3559 pg IL-5/ml beziehungsweise 2388 ± 661,8 pg IL-5/ml
- 3.) Für die Nickelkonzentration NiSO₄ 7,5 x 10⁻⁶ M 8239 ± 1815 pg IL-5/ml beziehungsweise 2367 ± 693,5 pg IL-5/ml

3.5 Interleukin 8 und Interleukin 5 als Quotient zur Differenzierung zwischen nickelallergischen und nicht-allergischen Individuen

Diese Ergebnisse zeigen, dass PBMCs von Patienten mit einem positiven Lymphozytentransformationstest und Epikutantest, also Individuen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit, eine klinisch manifeste Allergie auf Nickel zu haben eine vermehrte IL-5 Produktion in vitro bei gleichzeitiger verringerter IL-8 Freisetzung zeigen. Komplette gegenteilig verhalten sich die PBMCs bei den 15 Patienten mit einem negativen Lymphozytentransformationstest und Epikutantest, bei denen über diese beiden Testansätze keine Nickelallergie darstellbar ist. Hier zeigt sich umgekehrt proportional ein IL-8 Anstieg und ein IL-5 Abfall. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch den IL-8/IL-5 Quotienten zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern unterschieden werden könnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 illustriert.

Abbildung 5: IL-8, IL-5 Quotient TT – Tetanustoxoid, ***= $p < 0,001$ aus Summer et al. Manuskript in Revision



Die Sensitivität und Spezifität für den Lymphozytentransformationstest, IL-5, IL-8 und den Quotienten von IL-5/IL-8 ist in Tabelle 9 aufgeführt und beträgt bei NiSO₄ 2,5 x 10⁻⁵ M jeweils 93 %.

Tabelle 9: Sensitivität und Spezifität für den Lymphozytentransformationstest, IL-5, IL-8 und den Quotienten von IL-5/IL-8 bei den 30 Patienten mit Zytokinprofil (aus Summer et al. Manuskript in Revision)

		Sensitivity [%]	Specificity [%]
LTT	Ni 2.5x10⁻⁵M	73	100
	Ni 1x10⁻⁵M	60	100
	Ni 7.5x10⁻⁶M	47	100
IL-5	Ni 2.5x10⁻⁵M	93	87
	Ni 1x10⁻⁵M	87	87
	Ni 7.5x10⁻⁶M	67	93
IL-8	Ni 2.5x10⁻⁵M	73	60
	Ni 1x10⁻⁵M	87	67
	Ni 7.5x10⁻⁶M	87	80
Ratio IL-5/IL-8	Ni 2.5x10⁻⁵M	93	93
	Ni 1x10⁻⁵M	87	93
	Ni 7.5x10⁻⁶M	73	93

5. DISKUSSION

Kontaktallergien auf Nickel sind in der Regel Typ IV Reaktionen, welche auch als Reaktionen vom Spättyp bezeichnet werden. Aufgrund der hohen Exposition gegenüber Nickel vor allem bei Frauen mit zunehmend steigender Exposition durch Ohringe und Modeschmuck beträgt die Prävalenz einer Nickelsensibilisierung in der europäischen Gesamtbevölkerung für das weibliche Geschlecht 10-15% und für das männliche in etwa 2-5%^{2,3}. Diese relativ hohe Prävalenz von Nickelsensibilisierungen wird vermutlich weiter aufrechterhalten durch die kontinuierliche Einarbeitung von Nickel in verschiedenen Gegenständen, obwohl die europäische Nickeldirektive dies eigentlich stoppen sollten^{7,18}.

Als geeignetes Nachweisverfahren einer Sensibilisierung gegenüber Nickel hat sich in der Vergangenheit der Epikutantest in der klinischen Praxis etabliert. Man kann diesen als Goldstandard zum Nachweis der T-Zell-vermittelten Antwort betrachten. Jedoch ist auch der Epikutantest hinsichtlich seiner Reproduzierbarkeit limitiert¹⁹⁻²¹. So zeigten Ale et al., dass 22 von 435 Probanden, bei denen auf dem Rücken links und rechts ein Epikutantest auf Nickel durchgeführt wurde, eine unterschiedliche Reaktion zeigten, dergestalt, dass entweder einmal rechts oder links eine positive Reaktion gesehen wurde, obwohl auf beiden Seiten exakt dieselbe Testsubstanz appliziert wurde. Daraus ergab sich eine Reproduzierbarkeit von etwa 95%. Die Reaktionsstärke war in 91% der Fälle identisch²¹. Betrachtet man diese interessante Arbeit, so wird in Erinnerung gerufen, dass es sich bei dem Epikutantest um ein biologisches Testmodell handelt, welches abhängig ist von physiologischen Schwankungen des Organismus, sowie zahlreichen anderen Bedingungen, die zu einer Veränderung der epidermalen Barriere oder der hormonellen Situation oder anderen Charakteristiken des Individuums führen²². So zeigten Uter et al. in einer mutizentrischen Arbeit mit einer großen Fallzahl, dass bei einfach positiven Reaktionen im Epikutantest (+) eine relativ große Schwankung besteht, welche auf meteorologische Schwankungen zurückzuführen ist. Insbesondere die Veränderung der Luftfeuchtigkeit und Hitze in den Monaten Dezember, Januar und Februar im Vergleich zu den warmen Monaten im Juli und August schien einen Einfluss auf die epidermale Barriere und somit auf das Testergebnis zu haben. Jedoch waren diese Schwankungen bei eindeutig positiven Reaktionen (++, +++) deutlich geringer²³.

Eine italienische Arbeitsgruppe um Bonamonte konnte 4 Jahre später zeigen, dass die Reaktionen im Epikutantest nicht nur saisonale Schwankungen zu verzeichnen hatte, sondern auch Schwankungen während des menstruellen Zyklus. Anhand der klinischen Beobachtung, dass physiologische Hautparameter wie die Evaporation, die Hydratation und die epidermale Barriere menstruellen Schwankungen unterliegen, war es naheliegend, dass auch die Epikutantestreaktion davon abhängig sein könnte, da bereits gezeigt werden konnte, dass Östrogen eine Inhibition der T-Zell medierten Induktion der Immunantwort bewirkt. Die Arbeitsgruppe konstatierte, dass bei fruchtbaren Frauen klinisch eine Exazerbation eines allergischen Kontaktekzems in der prämenstruellen Phase beobachtet werden kann und dass allergische Reaktionen, welche T-Zell mediiert sind (Allergische Reaktion vom Spättyp), weniger stark während der Ovulationsphase ausgeprägt sind. Aus diesen Aussagen wurde gefolgert, dass auch Epikutantest Reaktionen während dieser Phase der Ovulation eine schwächere oder gar falsch negative Reaktion zeigen könnten und eine erneute Testung nach dieser Phase sinnvoll wäre²⁴. Ob dies jedoch klinisch aus unserer Sicht empfohlen werden kann ist fraglich, da es durch erneute Expositionen zu einer Induktion einer Sensibilisierung kommen kann.

Fraglich ist auch die klassische Methode der Ablesung, da einige Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass eine spätere Ablesung der Epikutantestreaktion (zum Beispiel nach einer Woche) sinnvoll wäre, da einige Kontaktallergene erst spät zu einer klinischen Manifestation führen²⁵⁻²⁸. So zeigten Thomas et al. in einer Untersuchung, dass alleiniges klassisches Ablesen der Reaktionen an den Tagen 2 und 3 insgesamt 32 positive Reaktionen auf Nickel, Kobalt oder Chrom nicht detektiert hätten (Gesamtkollektiv von 250 Patienten) und folgerten somit, dass es nützlich und sinnvoll wäre, eine Ablesung an Tag 6 durchzuführen²⁸. Daraus ergäben sich jedoch zeitliche und ökonomische Schwierigkeiten. Insgesamt wäre dies verbunden mit 4 Terminen und damit einem zusätzlichen Aufwand für Patienten, für das pflegerische Personal sowie für die ärztlichen Mitarbeiter. Alles in Allem scheint der Epikutantest ein guter Test mit seiner klinischen Berechtigung zu sein, der jedoch in einigen Bereichen limitiert ist.

Seit den 1960er Jahren ist ein weiteres in vitro Verfahren zur Detektion einer Sensibilisierung von Lymphozyten gegenüber einem bestimmten Allergen verfügbar. Der Lymphozytentransformationstest wurde in verschiedenen Publikationen

beschrieben^{11,29,30} und die Meinungen zu der diagnostischen Aussagekraft gingen weit auseinander. Dennoch zeigte der Lymphozytentransformationstest insbesondere in Bezug auf die Aufdeckung einer Medikamentenallergie eine gute Alternative zum Epikutantest auf^{16,31-37}. So analysierten Nyfeler und Pichler retrospektiv 923 Patienten in Bezug auf ihre Lymphozytentransformationstest Reaktivität. Die meisten dieser Patienten berichteten, eine Betalaktam Allergie zu haben. In Analogie zu den Ergebnissen von Trautmann et al³² berichteten sie, dass unter optimalen Durchführungsbedingungen und einer Standardisierung der Abläufe im Labor eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 85% erreicht werden kann³⁷.

Um in dieser hier vorgelegten Arbeit die Sensitivität und Spezifität zu berechnen, wurde als Referenz der Goldstandard „Epikutantest“ betrachtet. Zusätzlich wurden die Patienten weiter unterteilt in eine Gruppe mit anamnestisch geringer Wahrscheinlichkeit und eine Gruppe hoher Wahrscheinlichkeit, eine Nickelallergie zu haben. Um „Confounder“ auszuschalten, wurde mehrfach sichergestellt, dass die Patienten im Körper keine potentiell Nickel-freisetzende Metallimplantate oder Piercings haben, da diese möglicherweise durch kontinuierliche Freisetzung von Nickel eine geänderte Immunreaktivität gegenüber Nickel und damit eine Änderung der Lymphozytentransformationstest Reaktivität bedingen könnten.

In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass die drei Nickelkonzentrationen die beste Möglichkeit besitzen, zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern zu unterscheiden. Diese waren: NiSO_4 $2,5 \times 10^{-5}$ M, NiSO_4 1×10^{-5} M und NiSO_4 $7,5 \times 10^{-6}$. In weiteren Schritten wurde in der aktuellen Arbeit gezeigt, dass insbesondere NiSO_4 $2,5 \times 10^{-5}$ M und NiSO_4 1×10^{-5} M aussagekräftig sind und NiSO_4 $7,5 \times 10^{-6}$ eine wahrscheinlich zu niedrige Konzentration ist, um selbst bei sensibilisierten Patienten eine Reaktion der Lymphozyten hervorzurufen³⁸. Aus diesem Grund berechneten wir in Abhängigkeit des Epikutantestes und der allergologischen Anamnese, vor allem in Bezug auf Nickel, eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 96%. Betrachtet man die Ergebnisse von Nyfeler und Pichler, welche mit einer Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 85% ebenfalls einen aussagekräftigen Test angepriesen haben, so ist eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 96% ein deutlicher Schritt nach vorne.

Doch auch andere Autoren berichten über ähnliche Ergebnisse bezogen auf die Aussagekraft des Lymphozytentransformationstests in Abhängigkeit vom Epikutantest^{39,40}. So berichteten Spoerri et al im Jahr 2015, dass die Korrelation von Lymphozytentransformationstest und Epikutantest signifikant positiv bei Nickel und Palladium waren. Die Arbeitsgruppe fand eine Sensitivität und Spezifität von 74,4 % und 80,0% für Nickel, allerdings wurde nur eine Nickelkonzentration untersucht (8,4 µg NiSO₄³⁹).

In unserer Arbeit wurden hingegen insbesondere die oben genannten beiden Nickelkonzentrationen berücksichtigt. Zunächst wurden diese einzeln betrachtet und im Anschluss wurde die Bedingung aufgestellt, dass der Lymphozytentransformationstest in mindestens einer dieser Konzentrationen einen SI-Wert > 3 haben muss, um als positiv zu gelten. Diese Ergebnisse im Lymphozytentransformationstest wurden dem Epikutantest gegenübergestellt und in Bezug auf die anamnestischen Angaben der Patienten analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass eine große Anzahl von Patienten, die eine Metallunverträglichkeit anamnestisch Angaben und im Epikutantest ein negatives Testergebnis hatten, im Lymphozytentransformationstest hingegen häufiger positiv waren. Noch bleibt die Frage offen, ob der Lymphozytentransformationstest in der hier geschilderten Variante häufiger eine Nickelallergie detektiert, und/oder aber die Anamnese der Patienten bezüglich der Nickelallergie nicht ausreichend valide ist⁴¹.

Leider fehlte zum Zeitpunkt der hier geschilderten Experimente eine mögliche hilfreiche Information, da bis dahin nur Testablesungen nach 2 und 3 Tagen erfolgten. Wie oben bereits diskutiert, ist eine zusätzliche Epikutantest-Ablesung nach einer Woche sinnvoll. Dies wird in Deutschland bisher nicht routinemäßig gemacht, aber mehrfach in der Literatur propagiert. Auch Thomas et al. berichteten über eine Zunahme von 34% bei erkennbaren Nickeltestreaktionen bei einer zusätzlichen Ablesung des Testergebnisses an Tag 6. Möglicherweise ist die geringere Zahl der Epikutantest positiven Patienten im Vergleich zu den Lymphozytentransformationstest positiven Patienten auch Ausdruck einer erst später auftretenden Epikutantestreaktion. Aber möglich wäre auch, dass die Patienten, die über eine Hautreaktion nach Metallkontakt klagen, diese als Allergie fehlinterpretieren. Möglicherweise handelte es sich nur um eine Irritation oder Ähnliches.

Eine skandinavische Arbeitsgruppe ist der Validität der selbstberichteten Nickelallergie auf der Spur gewesen und das Ergebnis zeigte sich eher ernüchternd. Die Validität der selbstberichteten Nickelallergie war mit einem positiven prädiktiven Wert von gerade 60 % eher gering⁴¹. Denkbar ist also auch die Möglichkeit, dass die geringe Anzahl der positiven Epikutantest Ergebnisse von der geringen Aussagekraft, oder Beurteilbarkeit der Patienten herrührt, ob eine Nickelallergie besteht oder nicht. Interessanterweise zeigte diese Gruppe ebenfalls, dass Frauen, die häufiger eine Nickelallergie angaben, auch häufiger ein Ekzem in der Kindheit hatten. Es ist durchaus möglich, dass Patienten, die an einer atopischen Diathese leiden, häufiger aufgrund der gestörten epidermalen Barriere Irritationen zu verzeichnen haben, welche dann als allergische Reaktion durch die Patienten „gelesen“ wird^{41,42}. Doch auch in dieser Studie wurde keine 7 Tage Ablesung des Epikutantest durchgeführt, sodass dies nur Spekulationen bleiben und auch in unserer Gruppe zeigte sich nur ein moderater Unterschied in Bezug auf Atopie, der dieses Phänomen der geringen Validität der selbstberichteten Nickelallergie nicht erklären könnte.

Die sorgfältige Auswahl der Nickelkonzentration war auch dem geschuldet, dass Nickelsalze in sehr hohen Konzentrationen unspezifisch mitogen wirken, wie bereits von Kimber und Cederbrant et al beschrieben^{13,43}. Im Jahre 2010 entdeckte die Gruppe um Goebler, dass es auf dem Toll like 4 Rezeptor eine spezifische Region gibt, an der Nickel binden kann und somit eine Induktion der Genexpression proinflammatorischer Zytokine bewirken kann¹⁵. Um diese Effekte zu minimieren wurden besonders niedrige Konzentrationen benutzt, um jene ungerichtete und unspezifische Reaktion zu vermeiden. Auch zeigt das Ergebnis dieser Arbeit in Bezug auf die Reaktivitätsstärke von Lymphozytentransformationstest und Epikutantest, dass diese gut positiv korreliert. So haben Patienten mit einer ++ oder +++ Reaktion auch einen deutlich höheren SI Wert im Vergleich zu + Reaktionen im Epikutantest. Zudem zeigten die Positivkontrollen mit TT und PHA in beiden Gruppen eine vergleichbare Reaktionsstärke, woraus eine Vergleichbarkeit der PBMC Reaktionen geschlossen werden kann.

In Anbetracht der Ergebnisse aus der Analyse der 100 Patienten zur Validität des Lymphozytentransformationstest konnte diese Arbeit zeigen, dass der Lymphozytentransformationstest gemeinsam mit Epikutantest und Anamnese ein gutes

zusätzliches Werkzeug zur Detektion einer möglichen Nickelallergie ist, sofern man die Abläufe der Durchführung standardisiert. Zusätzlich ist der Lymphozytentransformationstest eine gute Alternative bei Nichtdurchführbarkeit des Epikutantest.

Welche diagnostischen Möglichkeiten stehen noch zusätzlich zur Verfügung? Betrachtet man die Ergebnisse in der Zytokinanalyse der 30 Patienten, so zeigt sich, dass bei Nickelallergikern deutlich IL-5 überwiegt, was auch in Übereinstimmung mit der Diskussion ist, dass TH-2 Immunantworten, welche durch IL-4 und IL-5 dominiert werden, eine immer wichtiger werdende Rolle für die Nickelallergie spielt^{44,45}. Dies entspricht nicht der früheren Lehrmeinung, dass die Nickelallergie klassisch alleiniger einer IFN gamma mediierten TH-1 Antwort entspricht^{46,47}. Möglich wäre auch anzunehmen, dass sowohl TH-1 und TH-2 Immunreaktionen bei der Nickelallergie versetzt eine Rolle spielen, so wie es in Analogie zum atopischen Ekzem propagiert wird, dass TH-2 vornehmlich in der akuten und TH-1 in der chronischen Phase dominiert.

Auffällig bei dem Kollektiv der 15 Patienten mit vermuteter Nickelallergie ist, dass ein großer Teil ebenfalls über Atopie berichtet. Könnte dies unter Umständen den Anstieg von IL-5 erklärt haben? Analog zur Arbeit von Spiewack et al⁴⁸ wird nicht davon ausgegangen, da es zwar eine Koinzidenz von Atopie und allergischem Kontaktekzem gibt, jedoch keine wirkliche Korrelation. Zudem waren alle Patienten zu dem Zeitpunkt der Epikutantestung weitgehend erscheinungsfrei, was die Haut betrifft. In einem akuten Stadium, in dem die TH-2 Antwort dominiert hätte, wurde nicht getestet.

Zudem wurde in den Versuchen darauf verzichtet, parallel mit anderen Ansätzen, wie dem ELISA und dem ELISPOT, Zytokine zu quantifizieren. Stattdessen haben wir im „Cytometric bead assay“ versucht, ein breiteres Spektrum an Zytokinausschüttung zu erfassen, was auch bei den Kontrollen zeigen sollte, welche Zytokine bei nichtallergischen Personen mit Nickelexposition produziert werden. Auch immunregulatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin 10 wurden berücksichtigt gemäß der berichteten immunmodulatorischen Wirkung^{49,50}. Allerdings zeigte sich keine signifikant erhöhte Produktion von IL-10 bei den Kontrollpatienten. Im Sinne der unspezifischen „innate“ Immunantwort zeigten Epikutantest - und

Lymphozytentransformationstest - negative Patienten eine vergleichsweise erhöhte IL-8 Produktion. Dies ist möglicherweise als eine unspezifische entzündliche Antwort auf Nickel bei nichtsensibilisierten Patienten zu werten. In den vergangenen Jahren wurde Arbeiten publiziert, die diese Beobachtung stützen. So zeigten Lin et al., dass IL-8 vermehrt über TLR-4 und NF-kappa-B Signaltransduktionsweg induziert wird⁵¹. Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen von Tsou et al. überein⁵². Somit kann gefolgert werden, dass die IL-8 Produktion im Rahmen des angeborenen Immunsystems durch Kontakt mit Nickel oder Kobalt hochreguliert wird⁵³. In der Literatur wird zudem vermehrt der Stellenwert von Interleukin 9 in der allergischen Reaktion diskutiert. So konnten erhöhte IL-9 Konzentrationen in vitro bei Patienten mit einer manifesten Nickelallergie gemessen werden und Inhalte von Nickel-induzierten Bläschen zeigten korrespondierend erhöhte IL-9 Konzentrationen^{54,55}. Dieses Zytokin haben wir in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht – und es stehen leider keine Zellkulturüberstände mehr zur Verfügung, um dies nachzuholen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine methodische Lymphozytentransformationstest-Optimierung zu einer verbesserten Aussage bezüglich Nickelallergie führt und dass dabei die Messung des IL-8 / IL-5 Quotienten eine zusätzliche und hoch sensitive und spezifische Möglichkeit bietet.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, eine Optimierung des Lymphozytentransformationstests zum Erkennen einer Nickel-Kontaktallergie zu erreichen. Als Vergleich wurde der Epikutantest – Goldstandard der Aufdeckung von Kontaktallergien – herangezogen. Es fand sich eine optimierte Nickel-spezifische Zellproliferation in vitro, wenn PBMC aus peripheren Blutproben mit NiSO_4 $2,5 \times 10^{-5}$ M, NiSO_4 1×10^{-5} M und NiSO_4 $7,5 \times 10^{-6}$ M stimuliert wurden. Im Vergleich mit 50 Anamnese-negativen Personen hatten die 50 Anamnese-positiven (=Nickelallergie-Verdacht) Blutspender nicht nur signifikant häufiger auch eine positive Nickel-Epikutantestreaktion, sondern es fand sich mit einer Sensitivität von 88% und einer Spezifität von 96% auch eine erhöhte Lymphozytentransformationstest-Reaktion gegenüber Nickel. Es wurde weiterhin untersucht, ob in den Zellkulturen unterschiedliche Zytokinfreisetzen in Abhängigkeit von gefundener Nickel-Allergie (d.h. Epikutantest positiv/negativ) auftrat. Neben der bereits in der Literatur oft zitierten Freisetzung von INF-gamma als Hinweis auf eine TH1-/Spättyp-Sensibilisierung wurde IL-5 als Eosinophilen-Aktivator untersucht und ein mögliches Zytokin der „unspezifischen“ Immunantwort, nämlich IL-8. Es zeigte sich, dass die IL-5- und IL-8 Freisetzung invers korrelierten. Bei Bildung eines „IL-5/IL-8“ Quotienten konnten mit hoher Treffsicherheit Nickel-allergische Blutspender von nicht-allergischen Personen unterschieden werden. Daraus folgern wir, dass sich der Lymphozytentransformationstest unter optimierten Bedingungen zur Aufdeckung einer Nickel-Allergie einsetzen lässt. Weitere Experimente zur Validierung des IL-5/IL-8 Quotienten sollten in der Zukunft an einem größeren Patientenkollektiv folgen.

7. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. T. Ruzicka für die Möglichkeit der Promotion an der Klinik für Dermatologie der LMU München.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. P. Thomas für die Bereitstellung des interessanten Themas, die außergewöhnlich gute und menschliche Betreuung und Förderung während der Arbeit und für das Wecken meines forschersichen Interesses.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. B. Summer für die außerordentlich gute Betreuung und konstruktive Hilfe bei dieser Arbeit.

Bei Herrn Ralf Pohl bedanke ich mich für die exzellente technische Arbeit und Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an Frau Prof. Rueff für die Unterstützung aus der Allergie Abteilung.

Teile dieser Arbeit sind im Rahmen eines Vortrags vor dem Mainzer Allergie Symposium veröffentlicht. Zusätzlich wurde ein Teil der Arbeit in Contact Dermatitis veröffentlicht, ein weiterer Teil ist aktuell in Begutachtung in einem dermatologischen Journal. Im Lebenslauf sind die Publikationen gelistet.

Eidesstattliche Versicherung

Ständer, Sascha

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
Evaluation Lymphknoten In-vitro - Verfahren
zur Detektion einer Nickel sensibilisierung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

21.12.17, Lübeck

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Coombs RR, Gell PG. *Clinical aspects of Immunology*. The classification of allergic reactions underlying disease, (1963).
2. Schäfer, T. *et al.* Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* **56**, 1192–1196 (2001).
3. Thyssen, J. P., Linneberg, A., Menné, T. & Johansen, J. D. The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **57**, 287–299 (2007).
4. Prystowsky, S. D. *et al.* Allergic contact hypersensitivity to nickel, neomycin, ethylenediamine, and benzocaine. Relationships between age, sex, history of exposure, and reactivity to standard patch tests and use tests in a general population. *Arch. Dermatol.* **115**, 959–962 (1979).
5. Larsson-Stymne, B. & Widström, L. Ear piercing--a cause of nickel allergy in schoolgirls? *Contact Dermatitis* **13**, 289–293 (1985).
6. Mattila, L. *et al.* Prevalence of nickel allergy among Finnish university students in 1995. *Contact Dermatitis* **44**, 218–223 (2001).
7. Lidén, C. & Norberg, K. Nickel on the Swedish market. Follow-up after implementation of the Nickel Directive. *Contact Dermatitis* **52**, 29–35 (2005).
8. Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft *et al.* [Performing patch testing with contact allergens]. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* **6**, 770–775 (2008).
9. Summer, B., Ständer, S., Kapp, F. & Thomas, P. [Role of the lymphocyte transformation test in the evaluation of metal sensitization]. *Hautarzt Z. Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.* **67**, 380–384 (2016).

10. Summer, B. *et al.* Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni. *Contact Dermatitis* **63**, 15–22 (2010).
11. Sarkany, I. Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 743–745 (1967).
12. Cederbrant, K., Hultman, P., Marcusson, J. A. & Tibbling, L. In vitro lymphocyte proliferation as compared to patch test using gold, palladium and nickel. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112**, 212–217 (1997).
13. Cederbrant, K., Anderson, C., Andersson, T., Marcusson-Ståhl, M. & Hultman, P. Cytokine production, lymphocyte proliferation and T-cell receptor Vbeta expression in primary peripheral blood mononuclear cell cultures from nickel-allergic individuals. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **132**, 373–379 (2003).
14. Werfel, T., Hentschel, M., Renz, H. & Kapp, A. Analysis of the phenotype and cytokine pattern of blood- and skin-derived nickel specific T cells in allergic contact dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**, 384–386 (1997).
15. Schmidt, M. *et al.* Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.* **11**, 814–819 (2010).
16. Pichler, W. J. & Tilch, J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* **59**, 809–820 (2004).
17. Ständer, S., Oppel, E., Thomas, P. & Summer, B. Evaluation of lymphocyte transformation tests as compared with patch tests in nickel allergy diagnosis. *Contact Dermatitis* **76**, 228–234 (2017).
18. Thyssen, J. P. *et al.* Excessive nickel release from earrings purchased from independent shops and street markets--a field study from Warsaw and London. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **25**, 1021–1026 (2011).

19. Gollhausen, R., Przybilla, B. & Ring, J. Reproducibility of patch tests. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 1196–1202 (1989).
20. Schaeffer, A. C. V., Andersen, K. E., Bindslev-Jensen, C. & Mortz, C. G. The reproducibility of nickel, cobalt and chromate sensitization in patients tested at least twice in the period 1992-2014 with TRUE Test®. *Contact Dermatitis* **75**, 111–113 (2016).
21. Ale, S. I. & Maibach, H. I. Reproducibility of patch test results: a concurrent right-versus-left study using TRUE Test. *Contact Dermatitis* **50**, 304–312 (2004).
22. Thomas, P. *et al.* [Characteristics of 200 patients with suspected implant allergy compared to 100 symptom-free arthroplasty patients]. *Orthopade* **42**, 607–613 (2013).
23. Uter, W. *et al.* Another look at seasonal variation in patch test results. A multifactorial analysis of surveillance data of the IVDK. Information Network of Departments of Dermatology. *Contact Dermatitis* **44**, 146–152 (2001).
24. Bonamonte, D. *et al.* Nickel contact allergy and menstrual cycle. *Contact Dermatitis* **52**, 309–313 (2005).
25. Higgins, E. & Collins, P. The relevance of 7-day patch test reading. *Dermat. Contact Atopic Occup. Drug* **24**, 237–240 (2013).
26. Geier, J., Gefeller, O., Wiechmann, K. & Fuchs, T. Patch test reactions at D4, D5 and D6. *Contact Dermatitis* **40**, 119–126 (1999).
27. Macfarlane, A. W., Curley, R. K., Graham, R. M., Lewis-Jones, M. S. & King, C. M. Delayed patch test reactions at days 7 and 9. *Contact Dermatitis* **20**, 127–132 (1989).
28. Thomas, B. *et al.* High frequency of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading. *Contact Dermatitis* **73**, 343–349 (2015).
29. Hirschhorn, K, Bach, F., Kolodny, R. L., Firschein, I. L. & Hashem, N. Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* **142**, 1185–1187 (1963).

30. Moynihan, P. C., Jackson, J. F. & Hardy, J. D. Lymphocyte transformation as an in-vitro histocompatibility test. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 453–455 (1965).
31. Luque, I. *et al.* In vitro T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy* **56**, 611–618 (2001).
32. Trautmann, A., Seitz, C. S., Stoevesandt, J. & Kerstan, A. Aminopenicillin-associated exanthem: lymphocyte transformation testing revisited. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **44**, 1531–1538 (2014).
33. Tsuge, I. *et al.* Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* **56**, 149–155 (2007).
34. Martin, M. *et al.* In vitro detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry. *Allergy* **65**, 32–39 (2010).
35. Lochmatter, P., Beeler, A., Kawabata, T. T., Gerber, B. O. & Pichler, W. J. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* **64**, 1269–1278 (2009).
36. Kano, Y., Hirahara, K., Mitsuyama, Y., Takahashi, R. & Shiohara, T. Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption. *Allergy* **62**, 1439–1444 (2007).
37. Nyfeler, B. & Pichler, W. J. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **27**, 175–181 (1997).
38. Summer, B. In-vitro-Charakteristika der Nickel-Kontaktallergie unter Einbeziehen der periimplantären Immunreaktion bei Hüftimplantatträgern. (LMU, Dissertation, 2006).
39. Spoerri, I. *et al.* Detection of nickel and palladium contact hypersensitivity by a flow cytometric lymphocyte proliferation test. *Allergy* **70**, 323–327 (2015).

40. Pacheco, K. *et al.* Development of a validated blood test for nickel sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 767–769 (2013).
41. Josefson, A., Färm, G. & Meding, B. Validity of self-reported nickel allergy. *Contact Dermatitis* **62**, 289–293 (2010).
42. Brasch, J., Schnuch, A. & Uter, W. Patch-test reaction patterns in patients with a predisposition to atopic dermatitis. *Contact Dermatitis* **49**, 197–201 (2003).
43. Kimber, I., Quirke, S. & Beck, M. H. Attempts to identify the causative allergen in cases of allergic contact dermatitis using an in vitro lymphocyte transformation test. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **4**, 302–306 (1990).
44. Minang, J. T., Troye-Blomberg, M., Lundeberg, L. & Ahlborg, N. Nickel elicits concomitant and correlated in vitro production of Th1-, Th2-type and regulatory cytokines in subjects with contact allergy to nickel. *Scand. J. Immunol.* **62**, 289–296 (2005).
45. Minang, J. T., Areström, I., Troye-Blomberg, M., Lundeberg, L. & Ahlborg, N. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin. Exp. Immunol.* **146**, 417–426 (2006).
46. Kapsenberg, M. L., Wierenga, E. A., Stiekema, F. E., Tiggelman, A. M. & Bos, J. D. Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4+T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 59–63 (1992).
47. Sachs, B. *et al.* 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 J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **32**, 736–744 (2002).
48. Spiewak, R. Contact dermatitis in atopic individuals. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **12**, 491–497 (2012).

49. Rustemeyer, T., von Blomberg, B. M. E., van Hoogstraten, I. M. W., Bruynzeel, D. P. & Scheper, R. J. Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **34**, 1458–1466 (2004).
50. Thomas, P., Iglhaut, G., Wollenberg, A., Cadosch, D. & Summer, B. Allergy or tolerance: reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients. *BioMed Res. Int.* **2013**, 539834 (2013).
51. Lin, C.-H. *et al.* Involvement of L-type Ca²⁺ channel and toll-like receptor-4 in nickel-induced interleukin-8 gene expression. *Environ. Toxicol.* **31**, 5–12 (2016).
52. Tsou, T.-C., Liou, S.-H., Yeh, S.-C., Tsai, F.-Y. & Chao, H.-R. Crucial role of Toll-like receptors in the zinc/nickel-induced inflammatory response in vascular endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **273**, 492–499 (2013).
53. Potnis, P. A., Dutta, D. K. & Wood, S. C. Toll-like receptor 4 signaling pathway mediates proinflammatory immune response to cobalt-alloy particles. *Cell. Immunol.* **282**, 53–65 (2013).
54. Liu, J. *et al.* IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1903–1911 (2014).
55. Gutin, L., Tammara, A., Fischelevich, R. & Gaspari, A. A. Elevation of IL-9 in Extreme Patch Test Reactions Suggests It Is an Inflammatory Mediator in Allergic Contact Dermatitis. *Dermat. Contact Atopic Occup. Drug* **27**, 35–36 (2016).