

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Gerd Gross

***In vitro* Untersuchungen allergenspezifischer T-Zellen
mittels ELISpot-Assay bei der Spättypallergie
gegen Betalaktam-Antibiotika**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock



vorgelegt von

Maraïke Annika Niemer aus Münster

Rostock 2013

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

- Gutachter:**
1. Herr Prof. Dr. med. Gerd Gross
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
Universität Rostock
 2. Herr Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Abteilung für Pneumologie
Universität Rostock
 3. Herr Prof. Dr. med. Axel Trautmann
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Universität Würzburg

Datum der Einreichung: 12.07.2013

Datum der Verteidigung: 29.10.2014

Für meine Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Grundlagen der Immunantwort.....	1
1.2	Unerwünschte Arzneimittelreaktionen.....	3
1.3	Allergische Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Arzneimittel.....	4
1.3.1	Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I).....	4
1.3.2	Zytotoxische Überempfindlichkeitsreaktion (Typ II).....	4
1.3.3	Immunkomplex-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion (Typ III)	4
1.3.4	Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp (Typ IV)	5
1.3.5	Mechanismen der Antigenerkennung bei der Spättypallergie gegen Arzneimittel.....	6
1.4	Klinische Manifestationen der Arzneimittelallergie.....	8
1.4.1	Makulopapulöses Exanthem (MPE)	8
1.4.2	Erythema exsudativum multiforme (EEM).....	9
1.4.3	Stevens-Johnson Syndrom (SJS) und toxische epidermale Nekrolyse (TEN)	10
1.5	Diagnostik der Spättypallergie gegen Betalaktame.....	11
1.5.1	Anamnese und klinische Untersuchung	11
1.5.2	In vivo Testverfahren	11
1.5.3	In vitro Testverfahren.....	12
2	ZIELSETZUNG.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	Studiendesign.....	18
3.1.1	Vorversuche.....	18
3.1.2	Hauptversuche.....	18
3.2	Patienten.....	18
3.3	Material	19
3.3.1	Geräte.....	19
3.3.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
3.3.3	Reagenzien.....	21
3.3.4	Allergene.....	22
3.3.5	Antikörper	23
3.3.6	Lösungen.....	24
3.3.7	Software.....	25

3.4	Methoden.....	25
3.4.1	Versuche zur Optimierung des ELISpot-Assays	25
3.4.2	Anamnese.....	25
3.4.3	Allergietestungen.....	26
3.4.4	Blutgewinnung	28
3.4.5	Isolierung der PBMC	28
3.4.6	Herstellung der Allergenlösungen	28
3.4.7	Detektion von Zytokin-freisetzenden Zellen im ELISpot-Assay	29
3.4.8	Depletierung von CD8 ^{pos} bzw. CD4 ^{pos} T-Lymphozyten mittels MACS	31
3.4.9	Immunhistochemische Färbungen von Hautbiopsaten	33
3.4.10	Auswertung.....	33
4	ERGEBNISSE	36
4.1	Ergebnisse der Versuche zur Optimierung des ELISpot-Assays.....	36
4.2	Patientencharakteristika	37
4.3	Ergebnisse der allergologische Testungen	39
4.4	Ergebnisse des ELISpot-Assays	40
4.4.1	Bestimmung der optimalen Betalaktamkonzentration	40
4.4.2	Festlegung der Cut-off Werte	44
4.4.3	Spontane Zytokinfreisetzung aus PBMC (Leerwerte)	44
4.4.4	Zytokinfreisetzung aus PBMC nach Stimulation mit dem verdächtigten Penicillin	44
4.4.5	Abhängigkeit der Zytokinproduktion im ELISpot-Assay von klinischen Parametern.....	48
4.4.6	Zytokinfreisetzung aus PBMC nach Stimulation mit verschiedenen Betalaktamen.....	51
4.5	Ergebnisse des ELISpot-Assays nach Depletierung CD4 ^{pos} bzw. CD8 ^{pos} Zellen	57
4.6	Reproduzierbarkeit	61
4.7	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Hautbiopsaten	63
5	DISKUSSION	65
5.1	Diskussion von Material und Methoden	65
5.1.1	Patienten und Kontrollpersonen	65
5.1.2	ELISpot-Assay	66
5.1.3	Cut-off Kriterien.....	67
5.1.4	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISpot-Assays	68
5.2	Diskussion der Ergebnisse	70

5.2.1	Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen	70
5.2.2	Sensitivität und Spezifität des ELISpot-Assays.....	71
5.2.3	Ergebnisse des ELISpot-Assays nach Stimulation mit weiteren Betalaktamen.....	74
5.2.4	Betalaktam-spezifische Zytokinprofile	76
5.2.5	Beteiligung CD4 ^{pos} bzw. CD8 ^{pos} T-Lymphozyten	79
5.2.6	Ausblick	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	LITERATURVERZEICHNIS	i
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	xiii
9	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	xv
10	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	xvii
11	DANKSAGUNGEN	xviii
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	xix
13	ANHANG	xx
14	THESEN ZUR DISSERTATION	xxvii

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen der Immunantwort

Das Immunsystem dient dem Schutz vor Infektionen, Toxinen und anderen schädigenden Substanzen, wobei es sich verschiedener zellulärer und nicht zellulärer Mechanismen bedient. Es wird zwischen Antworten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems unterschieden, die stark miteinander vernetzt sind (Parkin und Cohen, 2001).

Die Antworten des angeborenen Immunsystems stellen eine schnell verfügbare Abwehr gegen Pathogene dar. Sie sind jedoch nicht spezifisch und führen zu keiner Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Wesentliche Komponenten des angeborenen Immunsystems umfassen neben physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Barrieren auch das Komplementsystem. Zudem nehmen zelluläre Mechanismen durch Makrophagen, Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wichtige Funktionen ein. Die Zellen des angeborenen Immunsystems verwenden für die Erkennung von Pathogenen verschiedene Rezeptoren. Diese Mustererkennungsrezeptoren (PRR, pattern recognition receptors), zu denen als wichtiges Beispiel die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR, toll-like receptors) gehören, erkennen Strukturen, die auf Mikroorganismen, nicht jedoch auf körpereigenen Zellen vorkommen. Ihre Aktivierung stimuliert unter anderem die Phagozytose, fördert die Opsonierung von Pathogenen und löst eine Entzündungsreaktion aus. Des Weiteren wird die Initiation einer adaptiven Immunantwort durch Toll-ähnliche Rezeptoren unterstützt (Parkin und Cohen, 2001; Murphy et al., 2009).

Bei der erworbenen oder adaptiven Immunantwort entstehen antigenspezifische Effektorzellen, deren Rezeptoren gezielt gegen ein Pathogen gerichtet sind und eine effektivere Elimination von Krankheitserregern ermöglichen. Zudem wird über die Ausbildung von Gedächtniszellen eine lang anhaltende, spezifische Immunität geschaffen (Murphy et al., 2009). Die Effektorzellen des erworbenen Immunsystems sind B-Lymphozyten als Träger der humoralen Immunität und T-Lymphozyten als Vermittler der zellulären Immunität. B-Lymphozyten können nach Antigenkontakt zu Plasmazellen heranreifen und Antikörper freisetzen (Parkin und Cohen, 2001). Bei den T-Lymphozyten werden zwei funktionelle Hauptgruppen unterschieden. Die Zellen der einen Gruppe tragen den Oberflächenmarker CD8, die Zellen der anderen Gruppe den Oberflächenmarker CD4.

Naive CD8^{pos} T-Lymphozyten differenzieren sich nach Aktivierung zu zytotoxischen CD8^{pos} T-Effektorzellen und wirken direkt zytotoxisch auf Zellen, die ihre spezifischen Antigene an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden präsentieren. Die Zellschädigung erfolgt dabei über die Freisetzung von Granula, in denen verschiedene Gruppen zytotoxischer Proteine, wie Granzyme, Perforin und Granulysin, in aktiver Form gespeichert sind. Sie induzieren in der Zielzelle einen programmierten Zelltod (Apoptose). Einen weiteren Mechanismus der zytotoxischen T-Lymphozyten zur Apoptoseinduktion stellt die Bindung des membranständigen FasLiganden an Fas auf Zielzellen dar.

Zytotoxische T-Zellen können auch Zytokine freisetzen, wobei die genauen Funktionen nicht bekannt sind.

CD4^{pos} T-Lymphozyten werden durch spezifische Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden dargeboten werden, aktiviert und können sich zu unterschiedlichen CD4^{pos} T-Effektorzellen differenzieren, die vielfältige Funktionen aufweisen. Die Hauptfunktion dieser sogenannten T-Helferzellen besteht in der Koordinierung der Immunreaktion, sie können jedoch auch eine zytotoxische Aktivität aufweisen (Parkin und Cohen, 2001; Murphy et al., 2009). T-Helferzellen werden entsprechend ihrer Zytokinproduktion in funktionell heterogene Subpopulationen unterteilt. Die ersten beiden Untergruppen, die differenziert wurden, waren die T-Helfer (T_H)1- und T_H2-Zellen (Mosmann et al., 1986; Parronchi et al., 1991; Salgame et al., 1991). T_H1-Zellen sezernieren vor allem Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-2 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α . Durch diese Zytokine wird insbesondere die zelluläre Immunabwehr gefördert. Das vornehmlich produzierte Zytokin IFN- γ führt über eine Aktivierung von Makrophagen und Stimulation der Produktion von opsonierenden IgG-Antikörpern zu einer verbesserten Phagozytose von Krankheitserregern. Es verbessert zudem die Antigenpräsentation und hat antivirale und antineoplastische Effekte. T_H1-Zellen können selbst zytotoxisch wirken und über die freigesetzten Zytokine die Differenzierung von CD8^{pos} T-Lymphozyten zu zytotoxischen T-Zellen fördern (Abbas et al., 1996; Schreiber und Schreiber, 2003). T_H2-Zellen bilden nach Aktivierung IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Ihnen wird vorwiegend eine Förderung der humoralen Immunantwort zugeschrieben (Abbas et al., 1996). IL-4 induziert einen Antikörperklassenwechsel zum IgE hin und fördert die Differenzierung und Proliferation von T_H2-Zellen (Wills-Karp und Finkelman, 2008). IL-5 übernimmt eine entscheidende Rolle für Wachstum, Differenzierung, Überleben und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten (Choy Kok et al., 2003). IL-13 fördert Wachstum und Reifung von B-Zellen und induziert eine IgE Antwort (Wills-Karp und Finkelman, 2008). CD4^{pos} T-Lymphozyten, die sowohl die charakteristischen Zytokine der T_H1-Zellen als auch der T_H2-Zellen produzieren, werden als T_H0-Zellen bezeichnet (Abbas et al., 1996). Mit der Einführung neuerer Methoden zum Nachweis einer Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau zeigte sich, dass viele T-Lymphozyten Zytokine produzierten, die nicht in das T_H1-/T_H2-Konzept passten (Abbas et al., 1996). Das T_H1-/T_H2-Konzept wurde daraufhin durch die Beschreibung weiterer T-Helferzell-Subtypen erweitert. Beispiele sind regulatorische T-Zellen, folliculäre T-Helferzellen, T_H17-Zellen, T_H22-Zellen und T_H9-Zellen. Die unterschiedlichen T-Helferzell-Subtypen interagieren nicht nur funktionell, sondern können sich zum Teil auch zu anderen Subtypen umdifferenzieren (Wan und Flavell, 2009; O'Shea und Paul, 2010)

Analog zum T_H1/T_H2-Konzept der CD4^{pos} T-Lymphozyten können auch zytotoxische CD8^{pos} T-Lymphozyten entsprechend ihrer Zytokinproduktion in T_C1- und T_C2-Zellen eingeteilt werden (Bloom et al., 1992). Um dem Umstand Rechnung zu tragen, dass auch andere Zellen die gleichen Zytokine sezernieren können wie T-Lymphozyten, werden die Zytokine entsprechend dem Subtypen der T-Helferzellen, der diese produziert, als Typ 1 bzw. Typ 2 Zytokine bezeichnet. Eine Immunantwort, bei der IFN- γ , TNF und/oder IL-2 vermehrt sind, wird demzufolge als Typ 1 Antwort bezeichnet und eine Immunreaktion mit vornehmlicher Produktion von IL-4, IL-5, IL-6 und/oder IL-13 als Typ 2 Immunantwort (Clerici und Shearer, 1994; Lucey et al., 1996).

1.2 Unerwünschte Arzneimittelreaktionen

Unerwünschte Arzneimittelreaktionen wurden von der WHO (1972) definiert als gesundheitsschädliche und unerwünschte Reaktionen auf Arzneimittel, welche bei einer Dosierung auftreten, die beim Menschen zur Diagnostik oder Therapie von Erkrankungen eingesetzt wird. Sie stellen in der Medizin ein weit verbreitetes Problem dar. In epidemiologischen Studien wurde nachgewiesen, dass etwa 7% der Allgemeinbevölkerung und 10-20% der stationären Patienten betroffen sind (Gomes und Demoly, 2005). Unerwünschte Arzneimittelreaktionen können in 6 Kategorien eingeteilt werden, von denen sich zwei - Typ A und Typ B Reaktionen - auf Ereignisse beziehen, die im engen zeitlichen Zusammenhang mit der Medikamenteneinnahme auftreten (Rawlins und Thompson, 1977; Edwards und Aronson, 2000). Ungefähr 80% aller unerwünschten Arzneimittelreaktionen werden zu den Typ A Reaktionen gezählt (Hunziker et al., 2002). Sie sind direkt auf die pharmakologische Wirkung des Medikamentes zurückzuführen und treten somit dosisabhängig und vorhersehbar auf. Typ B Reaktionen machen etwa 13% aus (Hunziker et al., 2002), sind unvorhersehbar und treten nicht streng dosisabhängig auf. Sie können immunologisch oder nicht-immunologisch vermittelt sein (Edwards und Aronson, 2000) und umfassen neben Intoleranzreaktionen, idiosynkratischen und pseudoallergischen Reaktionen auch die allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen (Bircher, 1996). Intoleranzreaktionen sind überschießende Reaktionen entsprechend dem pharmakologischen Wirkspektrum der Substanz, die schon durch subtherapeutische Dosen ausgelöst werden können. Ein Beispiel ist das durch Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Hemmer ausgelöste Angioödem (Bircher, 1996). Idiosynkratische Reaktionen sind abnorme Reaktionen auf ein Arzneimittel, die sich nicht dem pharmakologischen Spektrum der auslösenden Substanz zuordnen lassen und denen teilweise prädisponierende Faktoren wie Enzymvarianten zugrunde liegen. Ein Beispiel ist die Auslösung von Porphyranschüben durch Arzneimittel (Bircher, 1996). Pseudoallergische Reaktionen entsprechen nicht-immunologisch vermittelten Arzneimittelnebenwirkungen mit Symptomen passend zu einer Allergie, meist einer Soforttypallergie. Als Beispiel kann die durch direkte Histaminliberation ausgelöste Anaphylaxie-ähnliche Symptomatik nach Röntgenkontrastmittelgabe genannt werden (Bircher, 1996). Im Unterschied zu den zuvor genannten Typ B Reaktionen ist bei den allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen eine spezifische Sensibilisierung gegen ein Arzneimittel oder dessen Metaboliten erforderlich (Johansson et al., 2004). Allergische Überempfindlichkeitsreaktionen machen etwa 6-10% aller unerwünschten Arzneimittelreaktionen aus (Gruchalla, 2003). Sie werden ausführlich in Kapitel 1.3 beschrieben.

Betalaktam-Antibiotika sind die häufigsten Auslöser von allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Arzneimittel (Torres und Blanca, 2010). Bis zu 15% der Bevölkerung geben in der Anamnese an, eine Penicillinallergie zu haben (Kerr, 1994; Wyatt, 1996; Macy et al., 1997; MacLaughlin et al., 2000; Gomes et al., 2004; Trcka et al., 2004; Borch et al., 2006), wobei sich durch eine allergologische Diagnostik nur bei 10% bis 40% eine tatsächliche Penicillinallergie bestätigen ließ (Surtees et al., 1991; Romano et al., 1995; Terrados et al., 1995; Trcka et al., 2004; Bousquet et al., 2008; Silva et al., 2009). Insgesamt führt die Einnahme von Amoxicillin bei 5,1% der behandelten

Patienten zu allergischen Reaktionen an der Haut, Ampicillin bei 3,3%, Benzylpenicillin bei 1,9% und Cephalosporine bei 2,1% (Bigby et al., 1986).

1.3 Allergische Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Arzneimittel

Der Begriff „Allergie“ (griech.: allos, anders; ergon, Tätigkeit) wurde von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet (1906) eingeführt als eine allgemeine Beschreibung für die veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus auf verschiedene Fremdstoffe bei wiederholtem Kontakt. Heutzutage wird unter einer Allergie eine „spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krank machenden Überempfindlichkeit“ verstanden, wobei die Reaktion typischerweise gegen exogene und ansonsten unschädliche Stoffe gerichtet ist (Ring, 2007). Nach Entdeckung des Penicillins 1929 durch Sir Alexander Fleming (1929), wurde es 1941 erstmals in der Behandlung von Patienten eingesetzt (Abraham et al., 1941). Bereits wenige Jahre später folgten Fallberichte über allergische Reaktionen gegen Penicilline (Lyons, 1943; Pyle und Rattner, 1944; Barker, 1945).

Von Coombs und Gell (1963) wurde eine Einteilung allergischer Reaktionen an Hand ihrer Effektoormechanismen in vier Haupttypen vorgenommen, die auch bei Arzneimittelallergien Anwendung findet. Während die allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I, Typ II und Typ III durch spezifische Antikörper vermittelt werden, spielen bei den Spättypreaktionen (Typ IV) allergenspezifische T-Lymphozyten die entscheidende Rolle.

1.3.1 Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I)

Das Antigen interagiert mit IgE-beladenen Mastzellen oder basophilen Granulozyten und induziert eine Freisetzung von Mediatoren, wie Histamin, Leukotrienen, Prostaglandinen und Tryptase, die zu den typischen Symptomen führen. Klinische Beispiele sind die Urtikaria, das Angioödem und der anaphylaktische Schock (Coombs und Gell, 1963; Pichler et al., 2010).

1.3.2 Zytotoxische Überempfindlichkeitsreaktion (Typ II)

Durch eine Interaktion von IgG- und IgM-Antikörpern mit Antigenen auf der Zelloberfläche vorzugsweise von Blutzellen kommt es zu einer Sequestrierung durch das retikuloendotheliale System oder zu einer Zytolyse durch Komplementaktivierung. Klinische Folgen von zytotoxischen Überempfindlichkeitsreaktionen sind Agranulozytose, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie (Coombs und Gell, 1963; Pichler et al., 2010).

1.3.3 Immunkomplex-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion (Typ III)

Das Antigen bildet Immunkomplexe mit Antikörpern, die sich im Gewebe ablagern und über eine Komplementaktivierung zu einer Entzündungsreaktion führen. Klinische Manifestationen sind Vaskulitis, Serumkrankheit und allergische Alveolitis (Coombs und Gell, 1963; Pichler et al., 2010).

1.3.4 Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp (Typ IV)

Typ IV Reaktionen werden durch allergenspezifische T-Zellen vermittelt (Coombs und Gell, 1963). Spättypallergien gegen Arzneimittel können sehr unterschiedliche klinische Manifestationen aufweisen. Diese Heterogenität spiegelt sich auch in den Subtypen der beteiligten T-Lymphozyten wider. Auf der Basis dieser Beobachtungen wurde für Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp gegen Arzneimittel eine Subklassifikation erarbeitet, die den verschiedenen klinischen Manifestationen bestimmte Effektormechanismen zuordnet (Abb. 1). Da jedoch meist mehrere der beschriebenen Mechanismen beteiligt sind, stellt die Einteilung in Typ IVa bis Typ IVd nur den jeweiligen Hauptmechanismus dar (Pichler, 2003; Pichler et al., 2010).

Typ IVa Reaktionen entsprechen einer T_H1 Immunreaktion (Abb. 1). T_H1 -Zellen aktivieren über die Freisetzung von IFN- γ Makrophagen und induzieren die Produktion komplementfixierender Antikörper. Sie wirken zudem kostimulierend auf proinflammatorische Prozesse und fördern die Aktivierung $CD8^{pos}$ T-Lymphozyten. Typ IVa Reaktionen spielen eine bedeutende Rolle bei der Tuberkulinreaktion und der allergischen Kontaktdermatitis (Pichler, 2003; Pichler et al., 2010).

Typ IVb Reaktionen liegt eine T_H2 Immunreaktion zugrunde (Abb. 1). T_H2 -Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13. Es resultiert eine eosinophile Entzündung. B-Lymphozyten werden aktiviert und Makrophagen inaktiviert. Typische klinische Beispiele sind makulopapulöse und bullöse Exantheme sowie Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) (Pichler, 2003; Pichler et al., 2010).

Typ IVc Reaktionen werden auch als zytotoxische Immunreaktionen bezeichnet (Abb. 1). Zytotoxische T-Zellen induzieren den Zelltod von Keratinozyten durch die Freisetzung von Perforin, Granzymen und Granulysin oder über eine Interaktion des FasLiganden mit Fas. Typ IVc Reaktionen treten bei den meisten Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp auf (Kuechler et al., 2004), in der Regel gemeinsam mit anderen Typ IV Immunmechanismen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei bullösen Exanthenen, sind aber auch bei makulopapulösen und pustulösen Exanthenen sowie der allergischen Kontaktdermatitis beteiligt (Pichler, 2003; Pichler et al., 2010).

Typ IVd Reaktionen sind durch eine T-Zell induzierte neutrophile Entzündung gekennzeichnet (Abb. 1). T-Lymphozyten fördern über die Freisetzung von CXCL8 und GM-CSF eine Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Dieser Mechanismus ist charakteristisch für pustulöse Exantheme, insbesondere die akute generalisierte exanthematische Pustulose (AGEP) (Pichler, 2003; Pichler et al., 2010).

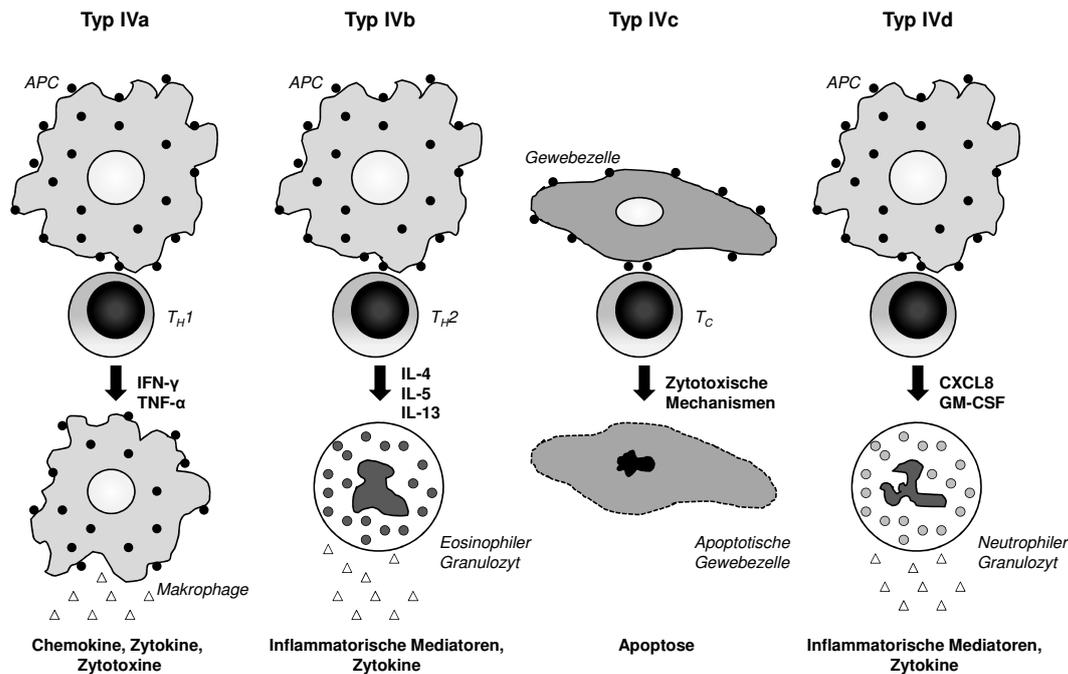


Abbildung 1 Erweiterte Klassifikation der Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp gegen Arzneimittel. Adaptiert nach Pichler et al. (2010). Erklärungen zu den einzelnen Immunreaktionen finden sich im Text. APC, Antigen-präsentierende Zelle; CXCL, CXC-Chemokin Ligand; GM-CSF, Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor; IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumor Nekrose Faktor; T_C, zytotoxischer T-Lymphozyt; T_{H1}, T-Helfer 1 Zelle; T_{H2}, T-Helfer 2 Zelle.

1.3.5 Mechanismen der Antigenerkennung bei der Spättypallergie gegen Arzneimittel

Bei der Spättypallergie gegen Arzneimittel erkennen T-Lymphozyten ihre Antigene über spezifische T-Zell-Rezeptoren. Die Mechanismen der Antigenerkennung sind dabei unter anderem von der molekularen Struktur des Arzneimittels abhängig. Nur wenige Medikamente, wie beispielsweise Insulin, bestehen aus hochmolekularen Proteinen und stellen somit komplette Antigene dar. Diese können von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und über MHC-Rezeptoren T-Lymphozyten präsentiert werden (Yawalkar und Pichler, 2004). Die meisten Arzneimittel sind hingegen kleinmolekulare Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 1000 Dalton, welche als Haptene bezeichnet werden und selbst keine kompletten Antigene darstellen. Sie werden dem Hapten-Carrier (engl.: carrier, Trägersubstanz) Konzept zufolge erst durch Kopplung an eine Trägersubstanz, meist ein körpereigenes Protein, zu einer potentiell immunogenen Substanz. Diese wird dann von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und über MHC-Moleküle präsentiert und kann zu zellulären oder humoralen Immunreaktionen führen (Landsteiner und Jacobs, 1935). Um eine solche kovalente Bindung eingehen zu können, müssen die Arzneimittel chemisch reaktiv sein. Jedoch können auch reaktionsträge Substanzen, sogenannte Prohaptene, zu reaktiven Substanzen metabolisiert werden (Naisbitt et al., 2001). Ein weiterer Mechanismus, der die Erkennung von Arzneimitteln durch T-Zellen beschreibt, ist das Konzept der pharmakologischen Interaktion von Medikamenten mit Immunrezeptoren (p-i Konzept). Es besagt, dass chemisch inerte Medikamente nichtkovalent mit MHC-Komplexen oder T-Zell-Rezeptoren interagieren und so ohne

Antigenprozessierung zu einer direkten MHC-abhängigen Aktivierung von T-Lymphozyten führen können (Schnyder et al., 1997; Zanni et al., 1998; Pichler, 2002).

Eine Sensibilisierung kommt dennoch nur bei einem geringen Teil der exponierten Personen zustande. Eine Erklärung hierfür stellt das Danger (engl.: danger, Gefahr) Konzept von Matzinger (1994) dar, welches aussagt, dass eine Immunreaktion im Sinne einer effektiven Sensibilisierung nur stattfinden kann, wenn Antigen-präsentierende Zellen bestimmte aktivierende Signale erhalten. Es wird dabei zwischen endogenen Gefahrensignalen, wie Zytokinen, Hitzeschockproteinen oder intrazellulären Komponenten, die bei einer Zellschädigung freigesetzt werden, und exogenen Gefahrensignalen, wie Bakterienbestandteilen oder chemische Substanzen, die möglicherweise die Antigen-präsentierenden Zellen direkt schädigen, unterschieden (Gallucci und Matzinger, 2001). Auf Arzneimittelallergien übertragen können die Gefahrensignale entweder durch das Arzneimittel selbst, durch einen reaktiven Metaboliten oder durch Umgebungsfaktoren, wie Infektionen oder chirurgische Eingriffe, induziert werden (Seguin und Uetrecht, 2003).

Die Antigenerkennung von Betalaktam-Antibiotika kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Betalaktame sind typische Haptene, die durch ihren reaktiven Betalaktam- oder Thiazol-Ring kovalent an Aminosäuren, vorzugsweise Lysin, in Proteinen oder Peptiden binden und über das Hapten-Carrier Konzept zu Immunreaktionen führen können. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass Betalaktame direkt kovalent an MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe binden und so T-Lymphozyten ohne Antigenprozessierung stimulieren können (Schneider und De Weck, 1965; Padovan et al., 1997; Zanni et al., 1998; Yawalkar und Pichler, 2004).

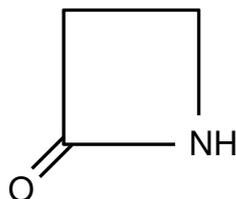


Abbildung 2 Strukturformel des Betalaktamringes. Adaptiert nach Bircher (1996).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Betalaktam-Antibiotika können Kreuzsensibilisierungen entstehen, die klinisch berücksichtigt werden müssen. Zu den Betalaktam-Antibiotika werden Penicilline, Cephalosporine, Monobaktame, Carbapeneme und Clavame gezählt. Allen ist als Grundstruktur der Betalaktamring gemeinsam (Abb. 2), der durch weitere Ringstrukturen und/oder Seitenketten ergänzt wird (Bircher, 1996; Baldo, 1999; Torres und Blanca, 2010). Da die antigenen Determinanten sehr variabel sind und neben der Betalaktam-Grundstruktur oder den Seitenketten auch das ganze Molekül umfassen können (Baldo, 1999; Torres und Blanca, 2010), ist auch das Ausmaß der Kreuzreaktivität sehr unterschiedlich. So liegt beispielsweise zwischen Penicillinen und Cephalosporinen eine Kreuzreaktivität nur sehr selten vor, wenn sie unterschiedliche Seitenketten tragen (Audicana et al., 1994; Novalbos et al., 2001; Trcka et al., 2007; Moreno et al.,

2008; Torres und Blanca, 2010). Bei gleicher Seitenkette kann sie über 30% betragen (Audicana et al., 1994; Miranda et al., 1996; Moreno et al., 2008; Torres und Blanca, 2010). Zwischen Aminopenicillinen und Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin treten häufiger Kreuzreaktionen auf (Trcka et al., 2007).

1.4 Klinische Manifestationen der Arzneimittelallergie

Neben der Einteilung allergischer Reaktionen an Hand immunologischer Effektormechanismen hat sich in der Praxis eine klinische Einteilung an Hand der Latenzzeit bis zum Auftreten der Symptomatik bewährt. Diese klinische Einteilung lässt gewisse Rückschlüsse auf die Pathophysiologie zu und ist insbesondere für das diagnostische und therapeutische Vorgehen hilfreich (Sachs und Merk, 2005; Bircher und Scherer, 2010). Die allergischen Reaktionen gegen Penicilline wurden von Levine (1966) nach ihrem zeitlichen Verlauf in Sofortreaktionen, verzögerte Reaktionen und Spätreaktionen klassifiziert. Einer Soforttypreaktion liegt pathophysiologisch oft eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I zugrunde. Sie treten in der Regel innerhalb weniger Minuten bis zu einer Stunde nach Einnahme des Arzneimittels auf. Verzögerte Reaktionen treten frühestens einige Stunden nach Einnahme des Arzneimittels auf. Sie können zu sehr verschiedenen klinischen Symptomen führen, da auch die pathophysiologischen Mechanismen sehr heterogen sind (Bircher, 1996; Sachs und Merk, 2005; Pichler et al., 2010).

Allergische Spättypreaktionen treten meist mehr als 24 bis 72 Stunden, zum Teil 96 Stunden nach Einnahme des Arzneimittels auf und sind häufig durch eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV bedingt (Pichler, 2003; Bircher und Scherer, 2010). Das klinische Spektrum der Spättypallergie gegen Arzneimittel an der Haut ist sehr breit und reicht von milden, lokal begrenzten Reaktionen bis zu potentiell lebensbedrohlichen Verlaufsformen. Beispiele sind die Kontaktdermatitis, makulopapulöse Exantheme (MPE), Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS), Erytheme, fixe Arzneimittelexantheme, akute generalisierte exanthematische Pustulose (AGEP), lichenoides Exantheme und bullöse Exantheme, zu denen das Erythema exsudativum multiforme (EEM), das Stevens-Johnson Syndrom (SJS) und die toxische epidermale Nekrolyse (TEN) gezählt werden (Pichler, 2003; Bircher und Scherer, 2010; Burns et al., 2010; Hausmann et al., 2010). Zusätzlich zu den Veränderungen an der Haut oder auch allein können andere Organe von der Spättypallergie betroffen sein. Beispiele sind Hepatitis, interstitielle Nephritis, Pankreatitis, Myokarditis und Pneumonitis (Bircher und Scherer, 2010; Torres und Blanca, 2010). Die für die vorliegende Arbeit relevanten kutanen Manifestationen werden im Folgenden näher beschrieben.

1.4.1 Makulopapulöses Exanthem (MPE)

Unerwünschte Arzneimittelreaktionen an der Haut manifestieren sich am häufigsten in Form von makulopapulösen Exanthenen (Bigby et al., 1986). Das klinische Spektrum ist weit gefächert. Es reicht von einzelnen erythematösen Makulae und Papulae über großflächig konfluierende Exantheme, die skarlatiniform, morbilliform oder rubeoliform imponieren können, bis hin zur Erythrodermie.

Seltener sind polyzyklische, gyrierte oder retikuläre Exantheme und flächige Erytheme. Die Verteilung ist variabel, jedoch meist symmetrisch. Rumpf und Extremitäten sind typischerweise betroffen (Bircher und Scherer, 2010; Burns et al., 2010). Obgleich der exakte Mechanismus der Entstehung nicht bekannt ist, wird angenommen, dass Medikamenten-spezifische T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle einnehmen (Pichler, 2003; Fernandez et al., 2009). Unterstützt wird diese Theorie durch den Nachweis eines mononukleären Entzündungszellinfiltrates in histologischen Färbungen von Hautbiopsaten, welches vorwiegend aus CD4^{pos} T-Lymphozyten besteht (Barbaud et al., 1997; Mikami et al., 1999; Yawalkar et al., 2000a; Hari et al., 2001; Yawalkar und Pichler, 2001; Torres et al., 2006; Fernandez et al., 2008). Zudem lagen häufig positive Hauttestreaktionen vor (Romano et al., 1995; Terrados et al., 1995; Romano et al., 2002; Padial et al., 2008) und in Hautläsionen (Yawalkar et al., 2000b) oder im peripheren Blut der Patienten (Gaspard et al., 2000; Sachs et al., 2002; Beeler et al., 2008; Khalil et al., 2008; Rozieres et al., 2009; Lochmatter et al., 2009a; Martin et al., 2010; Zawodniak et al., 2010) konnten Arzneimittel-spezifische T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Während verschiedene Studien eine gut definierte Typ 1 Immunantwort befürworten (Posadas et al., 2000; Posadas et al., 2002b; Cornejo-Garcia et al., 2007; Fernandez et al., 2008), stellen andere die große Bedeutung von Typ 2 Zytokinen heraus (Hari et al., 1999; Mikami et al., 1999; Yawalkar et al., 2000c; Yawalkar und Pichler, 2001). Die zudem nachweisbare zytotoxische Aktivität gegen Keratinozyten wird sowohl durch CD4^{pos} als auch durch CD8^{pos} Zellen mediiert (Yawalkar et al., 2000a; Yawalkar und Pichler, 2001; Fernandez et al., 2008).

1.4.2 *Erythema exsudativum multiforme (EEM)*

Traditionell wurden das Erythema exsudativum multiforme, das Stevens-Johnson Syndrom (SJS) und die toxische epidermale Nekrolyse (TEN) als Spektrum einer Erkrankung angesehen, da klinisch und histologisch fließende Übergänge vorliegen. Oft wurde dabei das EEM major sogar dem SJS gleichgesetzt. Später konnte nachgewiesen werden, dass sich das EEM sowohl im klinischen Bild als auch hinsichtlich der Ätiologie vom SJS/TEN unterscheidet. Während SJS und TEN fast ausschließlich durch Arzneimittel ausgelöst werden, ist das EEM in erster Linie durch Infektionen und sehr viel seltener durch Arzneimittelreaktionen bedingt (Auquier-Dunant et al., 2002; Mockenhaupt, 2009). Die Hautveränderungen des EEM können Makulae, Papulae und urtikarielle Läsionen umfassen. Charakteristisch sind typische Kokarden, welche auch als Schießscheiben-Läsionen bezeichnet werden und aus zwei konzentrischen Ringen um ein erythematöses oder livides Zentrum bestehen. Eine zentrale Blasenbildung kann auftreten. Die Verteilung ist extremitätenbetont. Bei Beteiligung der Schleimhäute wird von einem EEM major gesprochen, ansonsten von einem EEM minor (Mockenhaupt, 2009; Burns et al., 2010). Auch beim EEM ist der Entstehungsmechanismus nicht vollständig verstanden. In histologischen Präparaten zeigt sich ein mononukleäres Entzündungszellinfiltrat, welches in der Dermis überwiegend aus CD4^{pos} T-Lymphozyten besteht, in der Epidermis aus CD8^{pos} T-Lymphozyten (Margolis et al., 1983; Rzany et al., 1996; Caproni et al., 2006b). Ferner weist auf eine durch T-Lymphozyten vermittelte Typ IV Überempfindlichkeitsreaktion hin, dass positive Spätreaktionen in Hauttestungen bei Patienten mit EEM nach Einnahme von Aminopenicillinen (Alonso et al., 1999; Neukomm et al., 2001; Perez et al., 2001; Gonzalez-Delgado

et al., 2006) und anderen Arzneimitteln (Neukomm et al., 2001; Sachs et al., 2001) auftreten können und dass Arzneimittel-spezifische T-Lymphozyten im Blut (Neukomm et al., 2001; Sachs et al., 2001) und in der Haut der Läsionen (Hertl et al., 1993) nachgewiesen werden können. Das Arzneimittel-induzierte EEM wird meist als relativ gut polarisierte Typ 1 Immunreaktion definiert (Kokuba et al., 1999; Caproni et al., 2006a; Quaglino et al., 2008), in Einzelfällen konnte hingegen eine Beteiligung von Typ 2 Zytokinen nachgewiesen werden (Mikami et al., 1999; Sachs et al., 2001; Nishio et al., 2007).

1.4.3 Stevens-Johnson Syndrom (SJS) und toxische epidermale Nekrolyse (TEN)

Das Stevens-Johnson Syndrom (SJS) und die toxische epidermale Nekrolyse (TEN) sind mit ein bis zwei Fällen pro einer Millionen Einwohner pro Jahr zwar selten, gehen aber mit einer hohen Letalität einher. Die Hautveränderungen sind charakterisiert durch das stammbetonte oder generalisierte Auftreten von atypischen, eher flachen Kokarden und Makulae, die konfluieren und eine zum Teil ausgedehnte Blasenbildung aufweisen. Gleichzeitig finden sich fast immer erosive Schleimhautveränderungen im Bereich des Mundes, der Konjunktiven und des Genitales. Eine Beteiligung der tracheobronchialen Schleimhaut ist möglich (Mockenhaupt, 2009; Harr und French, 2010). SJS und TEN werden als eine Krankheitsentität verschieden starker Ausprägung angesehen (Roujeau, 1997). Während die Hautablösung beim SJS weniger als 10% der Körperoberfläche betrifft, umfasst sie bei der TEN mehr als 30%. Tritt eine Hautablösung zwischen 10% und 30% auf, wird von einer SJS/TEN-Übergangsform gesprochen. Die Prognose ist insgesamt ungünstig und hängt vor allem vom Ausmaß der Hautablösung, dem Alter des Patienten und vorhandenen Grunderkrankungen ab. Eine genetische Prädisposition (z.B. HLA-Subtypen) scheint eine Rolle zu spielen, die spezifisch für bestimmte Arzneimittel ist und ethnische Unterschiede aufweist. Verschiedene Untersuchungen stützen zudem die Theorie, dass SJS und TEN durch T-Lymphozyten mediierte Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Arzneimittel sind (Mockenhaupt, 2009; Harr und French, 2010). Entsprechend findet sich in histologischen Präparaten ein diskretes mononukleäres Infiltrat, welches überwiegend aus CD4^{pos} T-Lymphozyten in der Dermis und zahlreichen CD8^{pos} T-Lymphozyten in der Epidermis besteht (Hertl et al., 1995; Hari et al., 2001; Nassif et al., 2004; Caproni et al., 2006b). Zugleich ist eine ausgedehnte Nekrose der Epidermis erkennbar (Rzany et al., 1996). Gelegentlich konnten positive Reaktionen im Epikutantest nachgewiesen werden (Wolkenstein et al., 1996) sowie Medikamenten-spezifische T-Lymphozyten im peripheren Blut (Beeler et al., 2006; Kano et al., 2007; Beeler et al., 2008; Zawodniak et al., 2010), in den Hautläsionen (Hertl et al., 1995) oder in der Blasenflüssigkeit (Nassif et al., 2004). An der zugrundeliegenden Immunreaktion sind sowohl Typ 1 als auch Typ 2 Zytokine beteiligt (Caproni et al., 2006a; Nishio et al., 2007; Quaglino et al., 2008). Im Vordergrund stehen zytotoxische Mechanismen, die durch CD8^{pos} sowie CD4^{pos} T-Lymphozyten vermittelt werden und zu einem ausgedehnten Zelltod von Keratinozyten führen (Posadas et al., 2002a; Posadas et al., 2002b; Nassif et al., 2004; Chung et al., 2008).

1.5 Diagnostik der Spättypallergie gegen Betalaktame

Grundsätzlich gilt, dass jede im Zusammenhang mit Arzneimitteln aufgetretene Überempfindlichkeitsreaktion sorgfältig abgeklärt werden sollte, damit der Auslöser und mögliche kreuzreaktive Substanzen identifiziert werden können. Nur so können schwere Reaktionen bei einer Reexposition oder eine unnötige Einschränkung zukünftiger Therapiemöglichkeiten verhindert werden. Die allergologische Diagnostik umfasst eine detaillierte Anamnese und körperliche Untersuchung, Hauttests und in einigen Fällen *in vitro* Testverfahren sowie Provokationstests (Aberer et al., 2003; Romano et al., 2004; Trcka et al., 2004; Przybilla et al., 2008).

1.5.1 Anamnese und klinische Untersuchung

Anamnese und klinische Untersuchung nehmen die wichtigste Funktion ein. Sie sollten durch einen allergologisch erfahrenen Arzt durchgeführt werden. Im Vordergrund stehen neben der Klassifikation der klinischen Reaktion die Identifikation der im zeitlichen Zusammenhang eingenommenen Arzneimittel sowie die Abklärung der genauen Umstände der Reaktion (Demoly et al., 1999; Romano et al., 2004; Trcka et al., 2004; Przybilla et al., 2008).

1.5.2 *In vivo* Testverfahren

Die Durchführung von Hauttestungen in der Diagnostik von Spättypallergien gegen Betalaktame wird in nationalen (Przybilla et al., 2008) und internationalen (Romano et al., 2004) Leitlinien empfohlen. Als Testverfahren stehen Epikutantest, Pricktest und Intrakutantest zur Verfügung. Der Testablauf ist in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Da der Patient während der Testung erneut in Kontakt mit dem potentiellen Allergen kommt, können lokale und systemische Nebenwirkungen auftreten. Diese sind zwar mit unter 1% selten (Valyasevi und Van Dellen, 2000), können aber zu lebensbedrohlichen Reaktionen führen (Weber-Mani und Pichler, 2008; Riezzo et al., 2010; Sala et al., 2011). Zudem können Hauttestungen in seltenen Fällen eine neue, iatrogene Sensibilisierung induzieren (Nugent et al., 2003).

Hauttestungen führen nur bei einem Teil der Patienten, die ein Arzneimittelexanthem nach Einnahme eines Betalaktam-Antibiotikums gehabt hatten, zu positiven Reaktionen, auch wenn eine Spättypallergie mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann. Insgesamt lagen die Anteile positiver Reaktionen im Epikutantest zwischen 10% und 60% (de Haan et al., 1986; Osawa et al., 1990; Romano et al., 1995; Wolkenstein et al., 1996; Nyfeler und Pichler, 1997; Barbaud et al., 1998; Romano et al., 2002; Lammintausta und Kortekangas-Savolainen, 2005). Intrakutantests waren häufiger positiv (Osawa et al., 1990; Barbaud et al., 1998; Romano et al., 2002). Es wird angenommen, dass sie eine größere Sensitivität bei einer geringeren Spezifität besitzen als Epikutantestungen (Romano et al., 2002; Torres et al., 2004). Für eine genaue Beurteilung der Sensitivität von Hauttestungen ist es notwendig, die Allergie auf einem alternativen Weg sicher zu diagnostizieren. Dies ist derzeit am besten durch Provokationstestungen möglich, welche jedoch eine Gefahr für den Patienten darstellen und insbesondere bei schweren Arzneimittelreaktionen nicht

vertretbar sind. Aus diesem Grund sind nur wenige Studien veröffentlicht worden, die genaue Aussagen über die Sensitivität von Hauttestungen zulassen. Bei erwachsenen Patienten mit einer im Provokationstest bestätigten Spättypallergie gegen Betalaktame ergab sich für die Hauttests eine Sensitivität von 66% (Terrados et al., 1995) bzw. von 9% (Padial et al., 2008). Bei Kindern mit Spättypallergien gegen Aminopenicilline war die Sensitivität mit 5% noch geringer (Blanca-Lopez et al., 2009). Im Widerspruch zu dieser niedrigen Sensitivität stehen die Ergebnisse diverser Studien, in denen die Hauttestergebnisse an Hand von nachträglich durchgeführten Provokationstestungen in den meisten Fällen bestätigt werden konnten. Der negative prädiktive Wert lag dabei zwischen 87% und 100% (Romano et al., 1995; Romano et al., 2002; Macy et al., 2003; Lammintausta und Kortekangas-Savolainen, 2005; Waton et al., 2009) und der positive prädiktive Wert zwischen 81% und 100% (Romano et al., 1995; Lammintausta und Kortekangas-Savolainen, 2005). Bei Patienten mit schweren bullösen Arzneimittelreaktionen scheinen die Hauttests eine sehr geringe Sensitivität zu haben, eine Überprüfung mittels Provokationstests kann allerdings aufgrund des Schweregrades der Reaktionen nicht durchgeführt werden (Romano et al., 1995; Wolkenstein et al., 1996). Die Spezifität der Hauttests, die an Hand der Ergebnisse von Kontrollpersonen, welche Betalaktam-Antibiotika gut vertrugen, ermittelt wurde, lag zwischen 97% und 100% (Terrados et al., 1995; Wolkenstein et al., 1996; Romano et al., 2002; Torres et al., 2004; Padial et al., 2008).

Provokationstests gelten derzeit als „Goldstandard“ in der Diagnostik von Betalaktamallergien. Dem Patienten wird während der Provokationstestung unter stationärer Überwachung das Medikament in ansteigenden Einzeldosen zugeführt. Subjektive sowie objektive Symptome werden dokumentiert und von einem Allergologen ausgewertet. Provokationstests werden dann durchgeführt, wenn das fragliche Medikament durch andere Testverfahren nicht sicher identifiziert werden konnte oder wenn das Medikament bzw. die Pharmakagruppe für die zukünftige Therapie des Patienten nicht entbehrlich ist. Provokationstests werden auch genutzt, um Ausweichpräparate für die zukünftige Therapie zu identifizieren. Dennoch sind sie ethisch umstritten, da sie für Patienten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einer Arzneimittelallergie ein Risiko für möglicherweise lebensbedrohliche Reaktionen darstellen. Bei schweren Arzneimittelreaktionen, wie SJS, TEN oder DRESS, bzw. bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen und bei Schwangeren werden Provokationstests daher nicht empfohlen (Aberer et al., 2003; Przybilla et al., 2008). Obwohl falsch positive und falsch negative Ergebnisse auftreten können, heben die Ergebnisse von Demoly et al. (2010) hervor, dass der Provokationstest für den Ausschluss einer Allergie gegen Betalaktame eine sehr große Genauigkeit besitzt. Es wurden Patienten wegen einer klinischen Reaktion, die mit einer Betalaktamallergie vereinbar war, allergologisch untersucht. Von 118 Patienten, die das entsprechende Betalaktam im Provokationstest vertrugen hatten und zu einem späteren Zeitpunkt zur Behandlung einer Infektion einnahmen, entwickelten nur 7 erneut ein Arzneimittelexanthem. Es ergab sich somit ein negativer prädiktiver Wert von 94% (Demoly et al., 2010).

1.5.3 *In vitro* Testverfahren

Der Einsatz von *in vitro* Tests zur Abklärung von Spättypreaktionen durch Arzneimittel hat den Vorteil, dass die Tests für den Patienten lediglich mit einer Blutentnahme verbunden sind und kein erneuter

direkter Kontakt des Patienten mit dem verdächtigen Medikament erforderlich ist. Sie sind daher im Gegensatz zu den *in vivo* Tests sehr sicher und können auch bei Patienten mit lebensbedrohlichen allergischen Reaktionen bzw. bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen und bei Schwangeren ohne Einschränkung durchgeführt werden. Zudem können mehrere Medikamente parallel getestet werden und die Versuchsergebnisse gewähren Einblicke in die Pathophysiologie der Arzneimittelreaktion. Eine wesentliche Einschränkung besteht darin, dass wichtige physiologische Begleitfaktoren, die für die Ausprägung der Immunreaktion erforderlich sein können (Enzyme für die Metabolisierung der Wirkstoffe etc.) bei der *in vitro* Diagnostik fehlen bzw. wenn möglich gezielt hinzugesetzt werden müssen. Weiterhin zeigt ein positives Testergebnis zunächst nur eine Sensibilisierung gegen den getesteten Wirkstoff an. Eine Sensibilisierung bedeutet jedoch nicht zwangsläufig den Nachweis einer klinisch relevanten Allergie. Daher müssen *in vitro* Tests in Zusammenschau mit der Anamnese und zusätzlichen Befunden vom Allergologen ausgewertet werden. Die bisher verfügbaren *in vitro* Assays sind sehr aufwändig und noch nicht ausreichend validiert und standardisiert. Sie basieren auf dem Nachweis verschiedener Effektormechanismen von Medikamenten-spezifischen T-Gedächtniszellen, die im Rahmen der Arzneimittelreaktion entstanden sind und im Blut der Patienten zirkulieren (Abb. 3). So kann die Arzneimittel-spezifische Proliferation im Lymphozytentransformationstest (LTT) gemessen werden. Eine verstärkte Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche kann in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden oder zytotoxische Mechanismen durch Bestimmung der Freisetzung von Granzym B, Perforin oder Granulysin mittels ELISA oder ELISpot-Assay bzw. Messung der Expression von CD107a auf der Zelloberfläche in der Durchflusszytometrie analysiert werden. Die Produktion oder Sekretion von Zytokinen kann mittels Durchflusszytometrie, ELISA oder ELISpot-Assay evaluiert werden bzw. die vermehrte Expression der zugehörigen mRNA durch RT-PCR bestimmt werden (Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011).

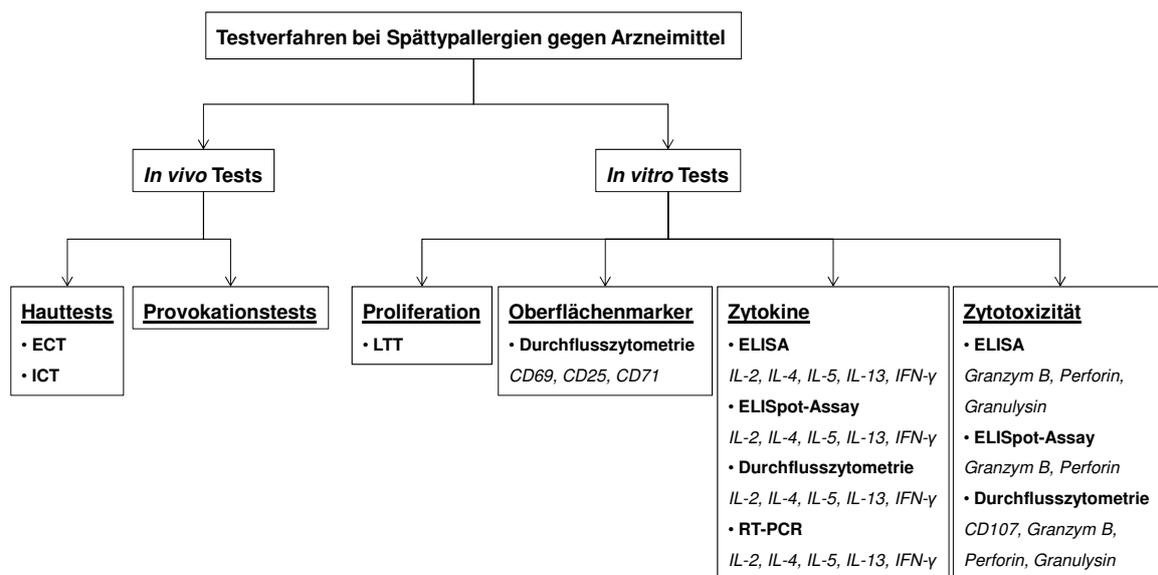


Abbildung 3 Testverfahren bei Spättypallergien gegen Arzneimittel. Adaptiert nach Lochmatter et al. (2009b). CD, Cluster of differentiation; ECT, Epikutantest; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISpot-Assay, Enzyme-linked immunospot assay; ICT, Intrakutantest; IFN, Interferon; IL, Interleukin; LTT, Lymphozytentransformationstest; RT-PCR, Reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Im LTT wird die Proliferation von PBMC nach Stimulation mit einem spezifischen Antigen an Hand der Aufnahme von ^3H -Thymidin in proliferierende Zellen gemessen (Pichler und Tilch, 2004). Insbesondere für Betalaktam-Antibiotika ist sie bereits in zahlreichen Studien untersucht worden. Bei Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Spättypallergie gegen Betalaktame lag der Anteil positiver Reaktionen im LTT zwischen 58% und 83% (Nyfeler und Pichler, 1997; Schnyder und Pichler, 2000; Hari et al., 2001; Luque et al., 2001; Sachs et al., 2002; Rozieres et al., 2009). Von Nyfeler und Pichler (1997) wurden 923 Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Arzneimittelallergie bestand, analysiert. Bei Patienten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit einer Penicillinallergie war der LTT bei 74% der Patienten positiv. Bei Patienten mit schweren bullösen Hautreaktionen wird der diagnostische Wert des LTT kontrovers diskutiert, da bei Patienten mit SJS/TEN nur selten positive Ergebnisse erzielt werden konnten (Roujeau et al., 1985). Die Spezifität des LTT lag zwischen 85% und 100% (Warrington und Tse, 1979; Nyfeler und Pichler, 1997; Schnyder und Pichler, 2000; Luque et al., 2001; Sachs et al., 2002; Rozieres et al., 2009). Limitierender Faktor für den Einsatz des LTT in der Allergiediagnostik ist die lange Versuchsdauer von ungefähr 6 Tagen, während der eine sterile Zellkultur aufrechterhalten werden muss. Weiterhin resultiert der Einsatz von radioaktivem Material in hohen Kosten und beschränkt den Einsatz auf entsprechend ausgestattete Labore (Pichler und Tilch, 2004; Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011).

Verschiedene Oberflächenmoleküle werden nach Aktivierung von T-Lymphozyten exprimiert und können in der Durchflusszytometrie analysiert werden. Beispiele sind CD25, CD69, CD71 und HLA-DR. Für die Detektion Medikamenten-spezifischer T-Lymphozyten scheint CD69 gut geeignet zu sein, da es bei verschiedenen Manifestationen einer Spättypallergie gegen Arzneimittel nachweisbar ist (Torres et al., 2006), schnell exprimiert wird und den größten Unterschied zum Leerwert aufweist (Beeler et al., 2008; Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011). In einer Studie von Beeler et al. (2008) wurde eine Arzneimittel-spezifische CD69 Expression auf CD4^{pos} und CD8^{pos} T-Lymphozyten bei allen 15 untersuchten Patienten jedoch bei keiner Kontrollperson nachgewiesen. Durchflusszytometrische Analysen haben den Vorteil, dass eine funktionelle Differenzierung der reaktiven Zellen gut möglich ist und die Inkubationszeit kürzer ist als beim LTT. Ein Nachteil ist die schlechte Standardisierbarkeit (Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011).

Zytotoxische Mechanismen sind bei fast allen klinischen Manifestationen von Spättypallergien gegen Arzneimittel beteiligt (Kuechler et al., 2004; Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011) und spielen insbesondere bei schweren bullösen Hautreaktionen eine bedeutende Rolle (Posadas et al., 2002a; Posadas et al., 2002b). Der Nachweis einer Spättypallergie gegen Arzneimittel durch Detektion zytotoxischer Mechanismen *in vitro* wurde in einer Studie von Zawodniak et al. (2010) untersucht. Es wurde neben der Freisetzung von Granzym B im ELISpot-Assay auch die Expression des Oberflächenmarkers CD107a in der Durchflusszytometrie gemessen. CD107a ist ein Membranprotein der zytotoxischen Granula und wird nach Freisetzung dieser auf der Zelloberfläche nachweisbar. Beide Tests waren bei 10 von 12 Patienten positiv. Bei Kontrollpersonen ließ sich keine Medikamenten-spezifische Zytotoxizität nachweisen.

Zytokine werden sehr früh nach einer Aktivierung von T-Lymphozyten produziert. Es ergibt sich daher der Vorteil, dass bei Zytokinassays die Inkubationszeit im Vergleich zum LTT deutlich verkürzt werden kann auf in der Regel 48 bis 72 Stunden (Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011). Mittels ELISA wurde bisher vorwiegend die Sekretion der Zytokine IFN- γ und IL-5 gemessen. Bei Bestimmung der Arzneimittel-spezifischen IFN- γ Produktion ergab sich eine Sensitivität zwischen 40% und 80% (Sachs et al., 2002; Halevy et al., 2005; Khalil et al., 2008; Martin et al., 2010) und eine Spezifität von 60% (Sachs et al., 2002) bzw. 100% (Martin et al., 2010). Im IL-5 ELISA konnte bei Patienten mit Arzneimittelallergien eine Sensitivität zwischen 43% und 90% (Sachs et al., 2002; Khalil et al., 2008; Martin et al., 2010) bei einer Spezifität von meist 100% (Sachs et al., 2002; Martin et al., 2010) erzielt werden. Eine durchflusszytometrische Analyse der allergenspezifischen Zytokinproduktion ergab positive Ergebnisse bei 46% der Patienten für IFN- γ und bei 50% der Patienten für IL-5, innerhalb der Kontrollgruppe lagen jeweils keine positiven Ergebnisse vor (Martin et al., 2010). Mittels RT-PCR konnte von Gaspard et al. (2000) bei 75% von 8 Patienten mit Spättypallergie gegen Betalaktame eine mRNA Induktion für IFN- γ nachgewiesen werden. Das Betalaktam-Antibiotikum musste jedoch vor der Stimulation an humanes Serumalbumin gekoppelt werden. Die Spezifität lag bei 64%. Eine mRNA Induktion für IL-4 war weder bei Patienten noch bei Kontrollpersonen erkennbar. Lochmatter et al. (2009a) versuchten, das am besten geeignete Zytokin für die Diagnostik einer Spättypallergie gegen Arzneimittel zu ermitteln. Sie nutzten dazu einen Bead-based Immunoassay, mit dem simultan 17 Zytokine und Chemokine nach ihrer Freisetzung und Bindung an Antikörper-beladene Kügelchen durchflusszytometrisch detektiert werden können. PBMC von 10 Patienten mit Spättypallergie gegen Aminopenicilline oder Sulfonamide sezernierten nach Stimulation mit dem entsprechenden Wirkstoff vorwiegend die Zytokine IL-2, IL-5, IL-13 und IFN- γ . Eine Freisetzung von IL-4 war nicht nachweisbar. IL-2, IL-13 und IFN- γ wurde bei 8 von 10 Patienten (80%) produziert, IL-5 bei 6 von 10 Patienten (60%). Bei Kontrollpersonen waren die Ergebnisse für die genannten Zytokine negativ.

Als weitere *in vitro* Testmethode steht der ELISpot-Assay zur Verfügung, mit dem eine Zytokinfreisetzung auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden kann. Er wurde 1983 zunächst für den Nachweis Antikörper-produzierender B-Zellen entwickelt (Czerkinsky et al., 1983; Sedgwick und Holt, 1983) und als „reverse“ ELISpot-Assay 1988 für den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen an Hand ihrer Sekretion von Zytokinen etabliert (Czerkinsky et al., 1988). In den folgenden Jahren wurde der ELISpot-Assay durch die Einführung spezieller ELISpot-Platten und die Entwicklung automatisierter Lesegeräte optimiert und findet derzeit eine breite Anwendung in unterschiedlichen Fachgebieten. Unter anderem wird er für die Untersuchung und Überwachung von Immunantworten bei Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, Transplantationen und Neoplasien eingesetzt. Auch für die Überwachung von Immunreaktionen bei Patienten, die eine Immuntherapie gegen Neoplasien erhalten, wird der ELISpot-Assay genutzt. Des Weiteren spielt er eine bedeutende Rolle in der Erforschung von Immunreaktionen im Zusammenhang mit Impfungen und in der Entwicklung von neuen Impfstoffen gegen Viren (v.a. HIV), Bakterien und Tumoren (Cox et al., 2006). Im Bereich der Allergologie ist der ELISpot-Assay bisher vor allem als *in vitro* Testverfahren bei Kontaktallergien mit gutem Erfolg verwendet worden (Jakobson et al., 2002; Lindemann et al., 2003; Masjedi et al., 2003; Minang et al., 2005; Minang et al., 2006; Spiewak et al., 2007; Lindemann et al., 2008; Wahlkvist et

al., 2008). Erste Anwendungen des ELISpot-Assays zur Untersuchung von Spättypallergien gegen Arzneimittel sind vorgenommen worden. Beeler et al. (2006) beschrieben erstmals, dass spezifische T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit einer Spättypallergie gegen Arzneimittel im ELISpot-Assay durch ihre Freisetzung von IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ nachgewiesen werden können. Bei allen 5 Patienten, die nach der Einnahme verschiedener Medikamente ein MPE, AGEP, SJS oder DRESS entwickelten, war eine spezifische Zytokinproduktion nachweisbar. Aussagen über Sensitivität und Spezifität der Assays waren nicht möglich, da keine Cut-off Kriterien definiert wurden. In zwei weiteren Studien wurde der IFN- γ ELISpot-Assay an größeren Patientenkollektiven erprobt. Rozieres et al. (2009) untersuchten PBMC von 22 Patienten, die ein MPE nach der Einnahme von Amoxicillin gehabt hatten, im IFN- γ ELISpot-Assay. Es ergab sich eine Sensitivität von 91% bei einer Spezifität von 95%. Zudem konnte von den Autoren gezeigt werden, dass der ELISpot-Assay zum Nachweis klinisch relevanter Spättypallergien geeignet ist. So waren die Testergebnisse sowohl bei 15 Patienten mit Soforttypallergie gegen Amoxicillin als auch bei 11 Patienten, die ein MPE im zeitlichen Zusammenhang mit der Einnahme von Amoxicillin gehabt hatten, aber Penicilline in allergologischen Hauttests und oralen Provokationstestungen vertragen hatten, negativ. Khalil et al. (2008) konnten diese guten Resultate nicht bestätigen. Sie untersuchten die Amoxicillin-spezifische IFN- γ Freisetzung im ELISpot-Assay aus PBMC von 12 Patienten mit einer Spättypallergie gegen Amoxicillin. Es konnten fast keine Amoxicillin-spezifischen Zellen nachgewiesen werden. Im ELISpot-Assay kann neben der Freisetzung von Zytokinen auch die Sekretion zytotoxischer Proteine bestimmt werden. Die Quantifizierung von Granzym B freisetzenden Zellen im ELISpot-Assay wurde von Zawodniak et al. (2010) bei Patienten mit Spättypallergien gegen verschiedene Arzneimittel vorgenommen.

2 ZIELSETZUNG

Im Gegensatz zu den Soforttypallergien gegen Betalaktame, bei denen mit dem Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum der Patienten ein validierter *in vitro* Test vorliegt, steht bei den Spättypallergien derzeit kein standardisiertes *in vitro* Testsystem mit ausreichender Sensitivität und Spezifität für den Einsatz in der allergologischen Diagnostik zur Verfügung. Die derzeit eingesetzten Hauttests und Provokationstests sind für die Patienten sehr zeitaufwändig und der Kontakt mit dem potentiellen Allergen kann neben unangenehmen Hautreaktionen auch lebensbedrohliche allergische Reaktionen auslösen. Es wird daher seit Jahren versucht, einen geeigneten *in vitro* Test für die Diagnostik von Spättypallergien gegen Arzneimittel zu entwickeln. Da Arzneimittel-spezifische T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der zugrunde liegenden Immunreaktion einnehmen, basieren diese Testverfahren insbesondere auf dem Nachweis der Effektormechanismen von T-Lymphozyten. Der LTT wird am häufigsten eingesetzt, weist jedoch viele Nachteile auf. Mit dem ELISpot-Assay können antigenspezifische T-Lymphozyten auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden. Der ELISpot-Assay soll in der vorliegenden Arbeit für den Einsatz in der *in vitro* Diagnostik von Spättypallergien gegen Betalaktame modifiziert und als Testmethode evaluiert werden. Neben der Betalaktam-spezifischen Freisetzung von IFN- γ soll die Sekretion der Typ 2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 gemessen werden.

Nach einer methodischen Optimierung des ELISpot-Assays für die Quantifizierung allergenspezifischer T-Zellen soll die Betalaktam-spezifische Zytokinfreisetzung aus PBMC von Patienten mit Penicillinallergie vom Spättyp während klinischer Remission charakterisiert und mit den Ergebnissen von Kontrollpersonen verglichen werden. Im Vordergrund steht die Frage, ob sich die Frequenz Betalaktam-spezifischer Zellen zwischen Patienten und Kontrollpersonen unterscheidet. An Hand der sich ergebenden Sensitivität und Spezifität für die einzelnen Zytokine soll das am besten geeignete Zytokin für die Trennung zwischen Patienten und Kontrollpersonen ermittelt werden. Es soll auch überprüft werden, wie sich die Zytokinproduktion nach Stimulation der PBMC mit verschiedenen Betalaktam-Antibiotika verhält, die entweder vom Patienten toleriert wurden oder gegen die in Hauttests eine Sensibilisierung nachgewiesen werden konnte. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Testwiederholung soll kontrolliert werden.

Da ein besseres Verständnis der immunologischen Mechanismen für weitere Fortschritte in der *in vitro* Diagnostik essentiell ist, gilt besonderes Interesse auch der Frage, ob die Betalaktam-spezifischen T-Lymphozyten nach Allergenkontakt ein bevorzugtes Zytokinmuster sezernieren und ob auffällige Unterschiede zwischen Patienten mit verschiedenen klinischen Parametern erkennbar sind. Weiterhin soll analysiert werden, ob die Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay durch CD4^{pos} und/oder CD8^{pos} T-Zellen vermittelt wird.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studiendesign

Die vorliegende experimentelle Studie wurde in zwei Abschnitten durchgeführt:

3.1.1 Vorversuche

Vorversuche zur Optimierung des ELISpot-Assays mit PBMC von 8 Patienten mit Nickelallergie und 10 Kontrollpersonen wurden in der Zeit von Februar 2008 bis September 2008 durchgeführt. Es sollte ermittelt werden, ob der ELISpot-Assay in der Form, in der er im Labor der Hautklinik der Universität Rostock genutzt wurde, geeignet war, in Hauttestungen bestätigte Allergien *in vitro* nachzuweisen. Nickelsulfat wurde als Allergen gewählt, da von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, dass die *in vitro* Nickelstimulation der PBMC von Nickel-allergischen Patienten eine starke Typ 1 und Typ 2 Zytokinantwort induziert (Jakobson et al., 2002; Lindemann et al., 2003; Minang et al., 2005; Minang et al., 2006; Spiewak et al., 2007).

3.1.2 Hauptversuche

Die Untersuchung der Betalaktam-spezifischen Zytokinproduktion bei 20 Patienten mit Penicillinallergie und 21 Kontrollpersonen fanden in der Zeit von September 2008 bis April 2010 statt. Es wurde im ELISpot-Assay zunächst die Freisetzung von IFN- γ , IL-4, IL-5 und IL-13 aus PBMC nach Inkubation mit verschiedenen Betalaktamen in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Patienten, deren PBMC in diesen Versuchen mit einer starken Zytokinfreisetzung reagiert hatten, wurde nochmals Blut abgenommen und ELISpot-Assays auch nach Depletion der CD8^{pos} bzw. CD4^{pos} T-Lymphozyten durchgeführt. Bei 4 Patienten wurden zudem immunhistochemische Färbungen von Hautbiopsaten vorgenommen, die zum Zeitpunkt des Arzneimittelexanthems entnommen worden waren.

3.2 Patienten

Die 8 Patienten mit Nickelallergie wurden aus der allergologischen Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik Rostock rekrutiert. Alle hatten in den Jahren zwischen 2004 und 2008 im Epikutantest stark auf Nickelsulfat (++) bzw. (+++) reagiert. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren sie gesund. Als Kontrollpersonen (n=10) wurden Studenten oder Mitarbeiter der Universität Rostock untersucht, die zuvor im Epikutantest Nickelsulfat vertragen hatten und auch anamnestisch keinen Hinweis auf eine Nickelallergie boten.

Auch die Rekrutierung der 20 Patienten mit Penicillinallergie erfolgte aus der allergologischen Sprechstunde der Hautklinik der Universität Rostock. Alle Patienten hatten im zeitlichen Zusammenhang mit der Einnahme eines Betalaktam-Antibiotikums ein Arzneimittellexanthem entwickelt, das klinisch zu einer Spättypallergie passte. Bei allen Patienten waren zwischen April 2005 und November 2009 Hauttestungen mit Betalaktam-Antibiotika durchgeführt worden. In mindestens einem Hauttest konnte eine positive Spätreaktion auf das verdächtige Penicillin nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten gesund. Als Kontrollpersonen (n=21) dienten Mitarbeiter und Patienten der Hautklinik sowie Studenten der Universität Rostock. Alle Kontrollpersonen hatten in den vorausgegangenen Monaten oder Jahren Betalaktam-Antibiotika eingenommen und diese gut vertragen. Sie wurden in der Verteilung von Alter und Geschlecht der Patientengruppe soweit möglich angepasst. Auf Hauttestungen mit Betalaktamen wurde bei Kontrollpersonen wegen des Risikos einer iatrogenen Sensibilisierung verzichtet (Nugent et al., 2003).

Ausschlusskriterien waren ein Alter unter 18 Jahren, das Vorliegen einer schwerwiegenden akuten oder chronischen Erkrankung bzw. einer aktiven und progredienten Neoplasie, die Einnahme von immunmodulierenden Arzneimitteln in den vorausgegangenen drei Monaten sowie das Auftreten von allergischen Reaktionen in den drei Monaten vor der Untersuchung.

Die Patienten und Kontrollpersonen wurden über die Freiwilligkeit der Teilnahme an der Studie informiert. Sie wurden über Studienablauf, Datenschutz und Risiken der Blutentnahme aufgeklärt und willigten schriftlich ein. Das Forschungsvorhaben wurde zuvor der Ethikkommission des Universitätsklinikums Rostock vorgelegt (Reg.-Nr. A 13/2008). Die Ethikkommission äußerte keine berufsrechtlichen oder berufsethischen Bedenken.

3.3 Material

3.3.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	LVSA 40/60	ZIRBUS technology, Bad Grund
Begasungsbrutschrank	Function Line	Heraeus Instruments, Hanau
Eismachine	Scotsman AF80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills (U.S.A.)
Elektrisches Pipettiergerät	Accu Jet	Brand, Wertheim
ELISpot-Reader	compact	Carl Zeiss Micro Imaging, Göttingen
Feinwaage	CP124S-OCE	Sartorius, Göttingen
Laborglasflaschen, Schott Duran, 250 ml	21 801 365 / 21 820 365	Schott, Mainz
Kühl-/Gefrierschrank	Comfort electronic	Siemens, München

Kühlzentrifuge	GPKR	Beckman, Krefeld
MACS MultiStand	130-042-303	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnet, QuadroMACS	130-090-976	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Wilovert S	Helmut Hund, Wetzlar
Mikroskop Histologie	Primo Star	Carl Zeiss, Jena
Mörser	3820.1	Carl Roth, Karlsruhe
Neubauer Zählkammern	717805	Brand, Wertheim
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS 15	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Spülflaschen, 500 ml	2402-0500	Nalgene, Rochester, U.S.A.
Vakuumpumpe	N026.3AN.18	unbekannt
Vortex	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	W 350	Memmert, Schwabach

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Aluminiumfolie	2596.1	Carl Roth, Karlsruhe
Bechergläser, verschiedene Größen		Rasotherm, Jena
Blutentnahmekanüle, BD Valu-Set™	387455	BD Diagnostics, Heidelberg
Einmalspritzen		B. Braun, Melsungen
1 ml	9161406V	
20 ml	4606205V	
Einweg-Stabpipetten		Greiner Bio-One, Frickenhausen
2 ml	710180	
5 ml	606180	
10 ml	607180	
25 ml	760180	
Erlenmeyer-Kolben, verschiedene Größen		Rasotherm, Jena
Finn Chambers on Scanpor, 8 mm	AL7002	SmartPractice, Barsbüttel
Fixomull Stretch, hypoallergenes Klebevlies	0908800	BNS medical GmbH, Hamburg
Gewebekulturschalen	628160	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Kanüle, BD Microlance™	302200	BD Diagnostics, Heidelberg
MACS Separations Säulen LS	130-042-401	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Messzylinder, 1000 ml		Rasotherm, Jena
Multi-Adapter für S-Monovette	14.1205	Sarstedt, Nümbrecht
MultiScreen HA Filtrationsplatte	MAHAS 4510	Millipore, Schwalbach
MultiScreen IP Filtrationsplatte	MAIPS 4510	Millipore, Schwalbach
Pipettentips, autoklavierbar		Eppendorf, Hamburg
0,1 – 10 µl	0030 073.363	
2 – 200 µl	0030 073.428	
50 – 1000 µl	0030 073.460	
Prick Lanzette	197-00	ALK-Abelló Arzneimittel, Wedel
S-Monovette, 9 ml, Ammoniumheparin	02.1064	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter, 0,22 µm Porengröße	SLGPO33RS	Millipore, Schwalbach
Spritzenfilter, 0,45 µm Porengröße	SLHVO33RS	Millipore, Schwalbach
Steritop-GP Filtereinheit, 250 ml Trichter	SCGPT02RE	Millipore, Schwalbach
Zellsieb, 70 µm Porengröße	734-0003	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen „Cellstar“		Greiner Bio-One, Frickenhausen
15 ml	188271	
50 ml	227261	

3.3.3 Reagenzien

Produktbezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Acetacetat, 2 N	A8976	Sigma, Steinheim
AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) - Tabletten	A6926	Sigma, Steinheim
Aqua ad iniectabilia	3880087	B. Braun, Melsungen
BCIP/NBT Plus Substrat	3650-10	Mabtech AB, Hamburg
BSA (albumin bovine serum)	A1470-25G	Sigma, Steinheim
DPBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	BE17-512F	Lonza, Köln
DPBS 10x	14200-083	Invitrogen, Darmstadt
EDTA, 0,5 M	E7889-100ml	Sigma, Steinheim

Ethanol, 96 Vol%, unvergällt	34081390	Zentralapotheke des Universitätsklinikums Rostock
FCS, Fetales Kälberserum „Gold“ PAA	34410290	Zentralapotheke des Universitätsklinikums Rostock
Gentamicin Sulfat, 10 mg/ml	BE02-012E	Lonza, Köln
Heparin-Natrium „Liquemin N 25000“	19101121	Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen
Histamindihydrochlorid, 10mg/ml	1035942	ALK Abelló, Wedel
H ₂ O ₂ , 30 Vol%	1.085.971.000	Merck, Darmstadt
Human AB-Plasma	H4522	Sigma, Steinheim
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	3820084	B. Braun, Melsungen
L-Glutamin (200mM)	17-605	Lonza, Köln
Lymphoprep™	1114547	Axis-Shield, Oslo (Norwegen)
NEAA (Non-essential Amino Acid Solution)	13-114	Lonza, Köln
NN-Dimethylformamid	D4551	Sigma, Steinheim
Penicillin-Streptomycin Mixture	DE10-602	Lonza, Köln
PHA-L (Leucoagglutinin)	L4144	Sigma, Steinheim
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	BE12-167F	Lonza, Köln
Sodiumacetat, 3 M	71196	Fluka Chemie, Buchs (Schweiz)
Streptavidin-ALP (S-ALP)	3310-10	Mabtech, Hamburg
Tween 20	P7949	Sigma, Steinheim
Vectastain ABC Kit Elite	PK-6100	Vector Lab., Burlingame

3.3.4 Allergene

Beschreibung	Katalognummer	Hersteller
HAUTTESTUNGEN		
Amoxicillin-ratiopharm® 1000mg Filmtabletten	PZN-2394428	Ratiopharm, Ulm
Ampicillin-ratiopharm® 1000mg Filmtabletten	PZN-3020948	Ratiopharm, Ulm
Ampicillin-ratiopharm® 0,5g Injektionslösung, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung	PZN-2036611	Ratiopharm, Ulm
Megacillin oral 600mg Filmtabletten (Wirkstoff: Phenoxymethylpenicillin)	PZN-7266994	Grünenthal, Aachen

Penicillin G 0,5 Mega I.E. Jenapharm®, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung (Wirkstoff: Benzylpenicillin)	PZN-4021281	Mibe, Brehna
Cefpodoxim-ratiopharm® 200mg Filmtabletten	PZN-4478477	Ratiopharm, Ulm
Unacid® PD oral Filmtabletten (Wirkstoff: 375mg Sultamicillin)	PZN-3751712	Pfizer Pharma, Berlin
<u>ELISpot-Assay</u>		
Amoxicillin	A 8523	Sigma, Steinheim
Ampicillin-ratiopharm® 0,5g Injektionslösung, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung	PZN-2036611	Ratiopharm, Ulm
Ceftriaxon-ratiopharm® 1 g, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung	PZN-1627540	Ratiopharm, Ulm
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	1.06727.0100	Merck, Darmstadt
Penicillin G 0,5 Mega I.E. Jenapharm®, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung (Wirkstoff: Benzylpenicillin)	PZN-4021281	Mibe, Brehna

3.3.5 Antikörper

Name	Spezies	Klon	Katalognr.	Hersteller
<u>MACS</u>				
MACS CD4 MicroBeads, human			130-045-101	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS CD8 MicroBeads, human			130-045-201	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<u>ELISpot-Assay</u>				
<u>Human IFN-γ ELISpot kit (ALP)</u>			3420-2A	Mabtech AB, Hamburg
Anti-human IFN- γ mAb 1-D1K	Maus	1-D1K		
Anti-human IFN- γ mAb 7-B6-1, biotinyliert	Maus	7-B6-1		
<u>Human IL-4 ELISpot kit (ALP)</u>			3410-2A	Mabtech AB, Hamburg
Anti-human-IL4 mAb IL4-I	Maus	IL4-I, 82.4		
Anti-human-IL4 mAb IL4-II, biotinyliert	Maus	IL4-II, 12.1		

<u>Human IL-5 ELISpot kit (ALP)</u>			3490-2A	Mabtech AB, Hamburg
Anti-human-IL5 mAb TRFK5	Ratte	TRFK5		
Anti-human-IL5 mAb 5A10, biotinyliert	Ratte	5A10		
<u>Human IL-13 ELISpot kit (ALP)</u>			3470-2A	Mabtech AB, Hamburg
Anti-human-IL13 mAb IL13-I	Maus	IL13-I		
Anti-human-IL13 mAb IL13-II, biotinyliert	Maus	IL13-II		

IMMUNHISTOCHEMIE

Anti-human CD3	Kaninchen		A0452	Dako, Hamburg
Anti-human CD4	Maus	4B12	AM421	BioGenex Laboratories, San Ramon (U.S.A.)
Anti-human CD8	Maus	C8/144B	M7103	Dako, Hamburg
Anti-human CD20	Maus	L26	M755	Dako, Hamburg
Anti-human CD56	Maus	123C3	MSG006	ZYTOMED Systems, Berlin
Anti-human CD79 α	Maus	JCB117	M7050	Dako, Hamburg

3.3.6 Lösungen

Name	Zusammensetzung
DPBS-BSA	DPBS + 0,5% BSA
DPBS-FCS	DPBS + 0,5% FCS
DPBS-Heparin	500 ml DPBS + 500 μ l Heparin (5000 U/ml)
DPBS-Tween 0,05%	DPBS (1x) + 0,05% Tween20
DPBS-Tween 0,1%	DPBS (1x) + 0,1% Tween20
Kulturmedium	RPMI 1640 + 10% Humanserum + 1% NEAA + 1% L- Glutamin + 0,5% Gentamicin
MACS-Puffer	DPBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA

3.3.7 Software

Software	Hersteller
KS ELISPOT 4.13	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Deutschland GmbH, München
Microsoft Office PowerPoint 2007	Microsoft Deutschland GmbH, München
Microsoft Office Visio 2007	Microsoft Deutschland GmbH, München
SPSS 15.0 für Windows	SPSS GmbH Software, München

3.4 Methoden

3.4.1 Versuche zur Optimierung des ELISpot-Assays

Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung wurde bei Patienten und Kontrollpersonen die Anamnese mit Hilfe eines Fragebogens erhoben. Eine Tabelle mit den Daten der Probanden ist im Anhang (XX) aufgeführt. Es wurden jeweils 40 ml Blut entnommen und die PBMC isoliert. Diese wurden im ELISpot-Assay auf die Nickel-spezifische Sekretion von IFN- γ , IL-4, IL-5 und IL-13 hin untersucht. Nickelsulfat wurde dazu entsprechend der aktuellen Literatur in einer Endkonzentration von 50 μ M im ELISpot-Assay eingesetzt (Lindemann et al., 2003). Verschiedene Zellzahlen (5×10^5 bzw. 1×10^6 PBMC je Well), verschiedene Inkubationszeiten (20 h bzw. 48 h), verschiedene Färbungen (AEC bzw. BCIP/NBT) und verschiedene ELISpot-Platten (HA-Platten bzw. IP-Platten) wurden untersucht. Die PBMC-Isolierung und der ELISpot-Assay sind in Kapitel 3.4.5 und 3.4.7 beschrieben.

Die nachfolgenden Kapitel beziehen sich auf die Hauptversuche zur Penicillinallergie.

3.4.2 Anamnese

Die Anamnese wurde mit Hilfe eines Fragebogens in Anlehnung an Demoly et al. (1999) erhoben (s. Anhang, XXI ff.). Es wurden insbesondere Fragen zu der Arzneimittelreaktion gestellt, um Hinweise auf das auslösende Betalaktam-Antibiotikum und die Art des Arzneimittellexanthems zu erhalten. Auch die Akten der Patienten wurden eingesehen, und, wenn vorhanden, Fotos der Hautveränderungen beurteilt. Weitere Fragen beschäftigten sich mit der Eigenanamnese, der Medikamentenanamnese und der Familienanamnese hinsichtlich allergischer Erkrankungen. Das Vorliegen einer Atopie wurde durch Erhebung des Erlanger Atopie Scores abgeschätzt, der modifiziert nach Diepgen et. al. (1991) durchgeführt wurde (s. Anhang, XXIV).

3.4.3 Allergietestungen

Die allergologische Diagnostik wurde im Rahmen der routinemäßigen Patientenversorgung durchgeführt und war bereits vor Aufnahme der Patienten in die vorliegende Studie abgeschlossen. Die Auswertung der Allergietestungen im Rahmen dieser Studie erfolgte daher retrospektiv. Weil die Reaktionen in den Hauttests jedoch für die Auswahl und Klassifizierung der Patienten essenziell waren, wird das methodische Vorgehen der allergologischen Diagnostik kurz beschrieben.

Die Testungen der Patienten wurden frühestens 4 Wochen nach Abheilung der Hautveränderungen in der allergologischen Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik Rostock durchgeführt. Nach ausführlicher Anamnese wurde eine allergologische Stufendiagnostik durchgeführt (Trcka et al., 2004). Es wurde zunächst das Gesamt-IgE und spezifische IgE-Antikörper gegen Betalaktame im venösen Blut bestimmt. Danach folgten Hauttests. Anschließend wurden orale Expositionstestungen vorgenommen. Die methodische Durchführung erfolgte nach Trautmann (2006), sowie nationalen (Przybilla et al., 2008) und internationalen Richtlinien (Romano et al., 2004).

3.4.3.1 Gesamt-IgE und spezifisches IgE

Bei allen Patienten wurde die Konzentration des Gesamt-IgE sowie spezifischer IgE-Antikörper gegen verschiedene Betalaktam-Antibiotika im venösen Blut bestimmt. Diese Untersuchung wurde durch die Klinik für Innere Medizin (Abteilung für Pneumologie) der Universität Rostock durchgeführt. Für das Gesamt-IgE galt bei Erwachsenen ein Normwert von <120 kU/l.

3.4.3.2 Hauttestungen

Der Epikutantest wurde am oberen Rücken der Patienten als Abriss-Epikutantest durchgeführt, da durch Entfernung der oberen Hornschichten die Sensitivität der Testung erhöht werden kann (Spier und Sixt, 1955; Fernandes et al., 2007; Dickel et al., 2009; Dickel et al., 2010). Dazu wurde ein Fixomull Stretch Fixierpflaster mehrfach auf das Testareal aufgeklebt und wieder abgezogen. Die in Tablettenform vorliegenden Medikamente (Amoxicillin, Ampicillin, Megacillin, Cefpodoxim und ggf. Unacid) wurden im Mörser zerstoßen. In die kleinen Metallschalen der Finn Chambers wurde etwa $30 \mu\text{l}$ sterile 0,9%ige NaCl-Lösung gegeben und das Medikamentenpulver hinzugefügt. Benzylpenicillin wurde in 5 ml steriler NaCl-Lösung gelöst und eine kleine Menge in die Metallschale gegeben. Die Teststreifen wurden dann auf das Testareal aufgeklebt und für 48 h fixiert. Die Ablesung der Reaktion erfolgte nach 48 h, 72 h und 96 h (Tabelle 1). Die Patienten wurden gebeten, sich auch im Fall später auftretender Testreaktionen in der Klinik vorzustellen.

Tabelle 1 Klassifizierung von Epikutantestreaktionen. Adaptiert nach Fregert (1981).

Symbol	Morphe	Bedeutung
-	Keine Reaktion	Negativ
?	Nur Erythem, kein Infiltrat	Fraglich
+	Erythem, Infiltrat, evtl. diskrete Papeln	Einfach positive Reaktion
++	Erythem, Infiltrat, Papeln, Vesikel	Zweifach positive Reaktion
+++	Erythem, Infiltrat, konfluierende Vesikel	Dreifach positive Reaktion
ir	Verschiedene Veränderungen (Seifeneffekt, Nekrose, Blase)	Irritativ
nt		Nicht getestetes Allergen

Für den Prick Test wurden die Tabletten gemörsert und das Benzylpenicillin-Pulver wie oben beschrieben in NaCl-Lösung gelöst. Auf die Volarseite des Unterarms wurden zunächst Tropfen steriler NaCl-Lösung aufgebracht und dann eine kleine Menge des Antibiotikums hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Die Benzylpenicillin-Lösung wurde unverdünnt aufgetragen. Als Negativkontrolle diente NaCl-Lösung, als Positivkontrolle Histamin-Lösung. Die Epidermis wurde mit einer kleinen Lanzette durch die Tropfen hindurch angeritzt. Die Ablesung erfolgte nach 20 min zur Beurteilung von Soforttypreaktionen. Zur Erfassung von Spättypallergien erfolgte zusätzlich eine Ablesung nach 48 h, 72 h und 96 h. Die Spätreaktionen wurden klassifiziert wie in Tabelle 1 für den Epikutantest aufgeführt.

Im Intrakutantest wurden ausschließlich Ampicillin und Benzylpenicillin getestet, da diese in löslicher Form für eine intravenöse Applikation zur Verfügung stehen. Sie wurden zunächst in 5 ml Aqua ad iniectabilia gelöst und anschließend 0,05 ml dieser Lösung mit 0,45 ml NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 50 mg/ml verdünnt. Zwischen 0,03 und 0,05 ml davon wurden intrakutan injiziert. Als Negativkontrolle diente NaCl-Lösung, als Positivkontrolle Histamin-Lösung. Die Ablesung der Testreaktionen erfolgte wie beim Pricktest nach 20 min zur Erfassung von Soforttypreaktionen und nach 48 h, 72 h und 96 h zur Erfassung von Spättypreaktionen (Tabelle 1).

3.4.3.3 Orale Provokationstestungen

Für die orale Provokationstestung wurden die Patienten stationär aufgenommen und erhielten im Abstand von jeweils einer Stunde ansteigende Einzeldosen des Betalaktams. Bei Cefpodoxim betragen die Einzeldosen der Tabletten 50 mg, 100 mg und 200 mg und bei Phenoxymethylpenicillin 200.000 IE, 400.000 IE, 800.000 IE und 1,2 Mega IE. Die Testung wurde einfach verblindet durchgeführt, d.h. die Patienten wussten nicht, ob sie das Medikament oder ein Placebo erhielten. Am Tag der Medikamentengabe und am darauffolgenden Tag wurden Blutdruck, Pulsfrequenz, Haut und subjektive Symptome der Patienten engmaschig kontrolliert. Bei Testung von mehreren Medikamenten wurde jeden zweiten Tag ein neues Medikament getestet. Die Patienten wurden darüber informiert, sich zu melden, falls Testreaktionen auch nach ihrer Entlassung aus der Klinik auftraten.

3.4.4 Blutgewinnung

Es wurde mit Blutentnahme-Monovetten ca. 80 ml Blut aus einer Armvene der Probanden entnommen. Die Transport- und Lagerungszeit betrug maximal 2 Stunden.

3.4.5 Isolierung der PBMC

Die Gewinnung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das heparinisierte Vollblut wurde zu gleichen Teilen mit angewärmtem DPBS-Heparin gemischt. Das verdünnte Blut wurde dann in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig 2 : 1 über Lymphoprep geschichtet, ohne dass es zu einer Vermischung der beiden Phasen kam. Es folgte eine Zentrifugation bei 1800 U/min (800 x g) für 20 min bei 20°C ohne Bremse. Dabei wurden die Erythrozyten und Granulozyten durch das Lymphoprep hindurch an den Grund des Röhrchens zentrifugiert, während die Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten als Grenzphase zwischen dem Lymphoprep und dem verdünnten Serum verblieben. Diese Schicht wurde vorsichtig mit einer Stabpipette abgesaugt und in ein neues 50 ml Röhrchen mit eiskaltem DPBS überführt. Es erfolgte eine sofortige Zentrifugation bei 1500 U/min (500 x g) für 10 min bei 4°C, sowie zwei weitere Waschschrte und Zentrifugationen bei 1200 U/min (250 x g) für 10 min bei 4°C zur Entfernung des Lymphoprep und der Thrombozyten. Anschließend wurden Zellklumpen mittels eines 70 µm Zellsiebes entfernt. Die PBMC wurden herunterzentrifugiert, der Überstand vollständig abpipettiert und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Eine kleine Menge der Zellsuspension wurde nach entsprechender Verdünnung zur Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer genutzt. Die Zellzahl wurde auf 2×10^7 / ml eingestellt. Die gewonnenen PBMC wurden entweder direkt oder nach Depletierung der CD8^{pos} bzw. CD4^{pos} Zellen im ELISpot-Assay eingesetzt.

3.4.6 Herstellung der Allergenlösungen

Zur Stimulation der PBMC im ELISpot-Assay wurden Betalaktam-Präparate verwendet, die für die intravenöse Anwendung vorgesehen sind. Da Amoxicillin nur für die Anwendung per os zur Verfügung steht, wurde der reine Wirkstoff erworben (Amoxicillin; A8523, Sigma). Jeweils 10 mg Amoxicillin wurde in Eppendorf-Röhrchen abgewogen. Alle verwendeten Antibiotika wurden zunächst in einer Konzentration von 100 mg/ml in sterilem DPBS gelöst und 1-2 h bei 4°C gelagert, um eine vollständige Lösung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Danach erfolgten die weitere Verdünnung mit Kulturmedium und der Einsatz im ELISpot-Assay. Die Amoxicillin-Lösung wurde zuvor durch einen 0,22 µm Spritzenfilter sterilfiltriert.

Bei einem Patienten hatte Phenoxymethylpenicillin das Arzneimittelexanthem ausgelöst. Für die Stimulation im ELISpot-Assay wurde Benzylpenicillin verwendet, da dieses in wasserlöslicher Form verfügbar ist und der Strukturformel des Phenoxymethylpenicillin sehr ähnelt (Baldo, 1999). Bei Patienten, die Unacid (Wirkstoff: Sultamicillin) eingenommen hatten, wurde für die *in vitro* Stimulation Ampicillin genutzt. Sultamicillin besteht aus Ampicillin und Sulbactam, die durch eine doppelte Esterbindung verbunden sind. Diese Esterbindung wird bei der enteralen Resorption durch Esterasen

der Darmwand gespalten, so dass im Körper des Patienten die Wirkstoffe Ampicillin und Sulbactam getrennt voneinander vorliegen (Lode et al., 1989; Betrosian und Douzinas, 2009). An Stelle des in den Hauttests und der oralen Provokationstestung verwendeten Cefpodoxims wurde im ELISpot-Assay das parenteral einsetzbare Ceftriaxon genutzt. Die beiden Cephalosporine unterscheiden sich in der R₂ Seitenkette, während die R₁ Seitenkette identisch ist (Baldo, 1999). Der R₂ Seitenkette wird für die Bildung der antigenen Determinanten kaum eine Bedeutung zugeschrieben, weil sie bei Bindung des Cephalosporins an das Trägerprotein verloren geht (Perez-Inestrosa et al., 2005).

3.4.7 Detektion von Zytokin-freisetzenden Zellen im ELISpot-Assay

Das Prinzip des ELISpot-Assays beruht auf der Detektion von Zytokin-freisetzenden Zellen auf Einzelzellniveau. Es werden hierzu 96-Well (engl.: well, Vertiefung) Platten mit weißen Membranen am Boden genutzt, die mit einem Primärantikörper gegen das Zytokin, dessen Sekretion gemessen werden soll, beschichtet werden. Im Folgenden wird eine definierte Anzahl von PBMC in die einzelnen Wells gegeben und ein Antigen hinzugefügt (Abb. 4A). Die von den Zellen produzierten Zytokine werden sofort nach der Freisetzung von den membrangebundenen Antikörpern immobilisiert (Abb. 4B). Nach der Inkubationszeit werden die Zellen aus den Wells herausgewaschen und ein biotinylierter Sekundärantikörper gegen das fixierte Zytokin hinzugefügt (Abb. 4C). Im Anschluss wird ein Enzym, welches an Biotin bindet, hinzugegeben und danach das Substrat. Dieses bildet nach der enzymatischen Reaktion an den Stellen, wo Zellen das interessierende Zytokin freigesetzt haben, ein farbiges, unlösliches Präzipitat (Abb. 4D). Für jede einzelne Zelle wird so ein kleiner, farbiger Spot (engl.: spot, Fleck) sichtbar.

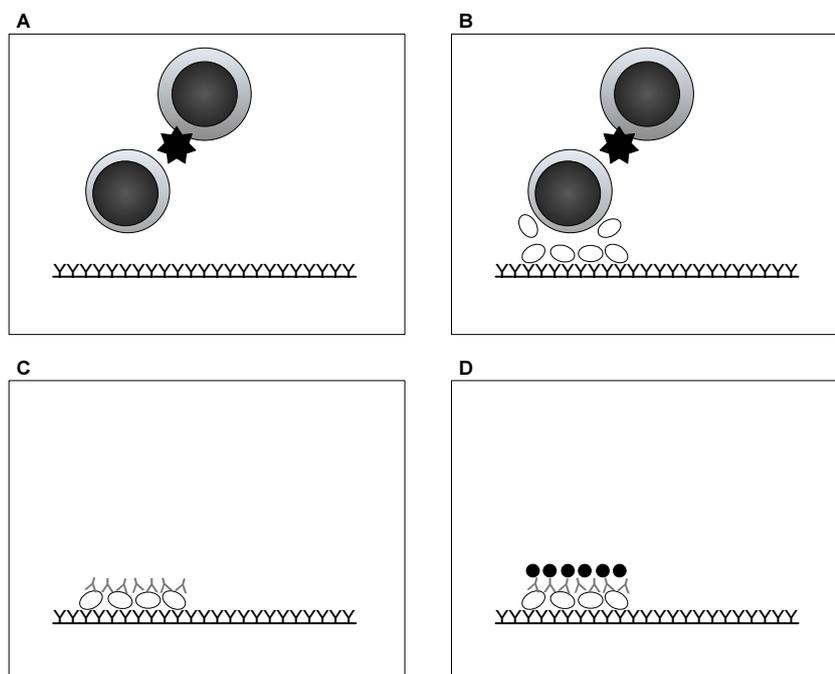


Abbildung 4 A-D Prinzip des ELISpot-Assays. Die Erklärungen erfolgen im Text.

Der ELISpot-Assay wurde mit frisch isolierten PBMC durchgeführt, frühestens 6 Wochen nach Abschluss der allergologischen Hauttestungen. Es wurden jeweils ein Patient und eine Kontrollperson parallel untersucht, um eine zu unspezifischen Reaktionen führende Kontamination der Allergenlösungen auszuschließen. Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Vertiefungen der 96-Well-Multiscreen-Platten (Typ IP; Millipore, MAIPS 4510) wurden zunächst mit 15 µl 35%igem Ethanol für eine Minute angefeuchtet, um die Hydrophobizität der PVDF-Membranen zu überwinden. Nach dreimaligem Waschen mit 150 µl DPBS erfolgte die Zugabe von 100 µl Maus-anti-human-Antikörper (IFN- γ : 10 µg/ml; IL-5: 12,5 µg/ml; IL-4 bzw. IL-13: 15 µg/ml), gelöst in DPBS. Die Platten wurden in Aluminiumfolie eingewickelt und für 24 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit 150 µl DPBS gewaschen und für 2 h mit 150 µl Kulturmedium bei 37 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren. Das Kulturmedium wurde dekantiert und 1×10^6 PBMC in 50 µl Kulturmedium vorsichtig in jede Vertiefung überführt. Es erfolgte dann die Zugabe von 50 µl Kulturmedium zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundaktivität (Leerwert) bzw. von 50 µl der frisch hergestellten Allergenlösungen. Ampicillin und Amoxicillin wurden in Konzentrationen von 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml eingesetzt, Benzylpenicillin in Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml und Ceftriaxon als Kontrollantigen in Konzentrationen von 0,1 mg/ml und 0,5 mg/ml (Gaspard et al., 2000; Yawalkar et al., 2000b; Sachs et al., 2002; Sachs et al., 2004). Als Positivkontrolle diente PHA-L in einer Konzentration von 10 µg/ml. Negativkontrollen waren Kulturmedium allein und Kulturmedium mit den verschiedenen Allergenen bzw. PHA-L, aber ohne PBMC. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, in einzelnen Versuchen wegen mangelnder Zellzahl Zweifachbestimmungen. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Die Platten wurden zuvor in Aluminiumfolie gewickelt, um eine gleichmäßigere Anfärbung der Membranen zu erreichen (Kalyuzhny und Stark, 2001). Anschließend wurden die Multiscreen-Platten sechsmal kräftig mit DPBS-Tween 0,05% gespült, um die PBMC aus den Vertiefungen herauszulösen, und 100 µl der in DPBS-BSA gelösten biotinylierten Antikörper (je 1,25 µg/ml) in jede Vertiefung gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden ungebundene Antikörper durch sechsmaliges Spülen der Vertiefungen mit DPBS-Tween 0,05% entfernt und 100 µl Streptavidin-ALP, 1:1000 verdünnt mit DPBS-FCS, in die Vertiefungen pipettiert. Die Multiscreen-Platten wurden für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert, anschließend dreimal mit DPBS-Tween 0,05% und dreimal mit DPBS gespült. BCIP/NBT Substrat wurde durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und 100 µl in jede Vertiefung pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 20-40 min, bis die dunkelblauen Spots die optimale Anfärbung erreicht hatten. Die Farbreaktion wurde unter fließendem Leitungswasser unterbrochen und die Multiscreen-Platten über Nacht im Dunkeln getrocknet. Die Auswertung der Versuche erfolgte am automatisierten ELISpot-Lesesystem unter Verwendung der Software KS ELISPOT 13 (Malkusch, 2005). Die gezählten Spots in jeder Vertiefung entsprachen dabei der Anzahl der reaktiven Zellen je 1×10^6 PBMC.

Ergänzungen zu den Versuchen zur Optimierung des ELISpot-Assays mit Nickelsulfat: Bei Verwendung von ELISpot-Platten mit Nitrozellulose-Membran (Typ HA; Millipore, MAHAS 4510) wurden die Membranen vor Zugabe des Primäntikörpers den Herstellerangaben entsprechend nicht mit Ethanol befeuchtet. Die Zugabe des Primäntikörpers erfolgte direkt in die trockenen

Vertiefungen. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie oben beschrieben, an Stelle der Betalaktam-Antibiotika wurde Nickelsulfat in einer Endkonzentration von 50 μM eingesetzt. Für die Färbung mit AEC (rote Spots) wurde nach dem Herauswaschen des Sekundäntikörpers die Enzymlösung hergestellt. Dazu wurden 10 ml DPBS-Tween 0,1% in einer Wanne mit jeweils einem Tropfen aus Fläschchen A und B des Peroxidase-Kits (Vectastain ABC Kit Elite) vermischt. 100 μl wurden in jede Well gegeben und 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte wie oben beschrieben sechsmal mit DPBS-Tween 0,05% gespült. Für die Substratlösung wurden 13,5 ml Aqua dest. mit 1,5 ml 1 N Natriumacetat vermischt. 11 ml dieser Lösung wurden in einen Erlenmeyer-Kolben überführt, in dem zuvor 46,9 ml Aqua dest. mit 4,6 ml 0,1 N Acetacetat vermischt worden waren. Eine Tablette 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) wurde in 2,5 ml NN-Dimethylformamid gelöst und 47,5 ml von der Lösung aus dem Erlenmeyerkolben hinzugefügt. Es wurden 25 μl 30%iges H_2O_2 hinzugegeben und die Substratlösung durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 μm filtriert. 100 μl der Substratlösung wurden in jede Vertiefung der ELISpot-Platte pipettiert und für 4 min bei Raumtemperatur unter Lichtexposition inkubiert. Die Platten wurden dann wie oben beschrieben gewaschen, getrocknet und ausgewertet.

3.4.8 Depletierung von CD8^{pos} bzw. CD4^{pos} T-Lymphozyten mittels MACS

Das Prinzip der Zellseparation mittels Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) ist in Abbildung 5 dargestellt. Es beruht auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an Oberflächenstrukturen, die von einem bestimmten Zelltyp (z.B. T-Helferzelle) exprimiert werden. Die Antikörper sind an superparamagnetische Nanopartikel gebunden (gesamt: MicroBeads) und ermöglichen somit eine Trennung der markierten Zellen von den restlichen Zellen im Magnetfeld. Die MicroBeads werden dazu mit einer Zellsuspension inkubiert (Abb. 5A) und die Zellsuspension anschließend durch eine Säule pipettiert, die in ein magnetisches Feld eingebracht wurde. Dadurch werden die Zellen mit den Oberflächenstrukturen, gegen die die MicroBeads gerichtet sind, in der Säule zurückgehalten, während die restlichen Zellen durchlaufen und aufgefangen werden können (Abb. 5B). Die markierten Zellen können nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld gewonnen werden. Die Selektion kann sowohl positiv (Markierung der gewünschten Zellen) als auch negativ (Markierung der nicht gewünschten Zellen) erfolgen. In dieser Arbeit wurde die negative Selektion genutzt, weil dadurch die im ELISpot-Assay genutzten Zellen nicht mit MicroBeads beladen sind und die Zellsuspension Antigen-präsentierende Zellen enthält.

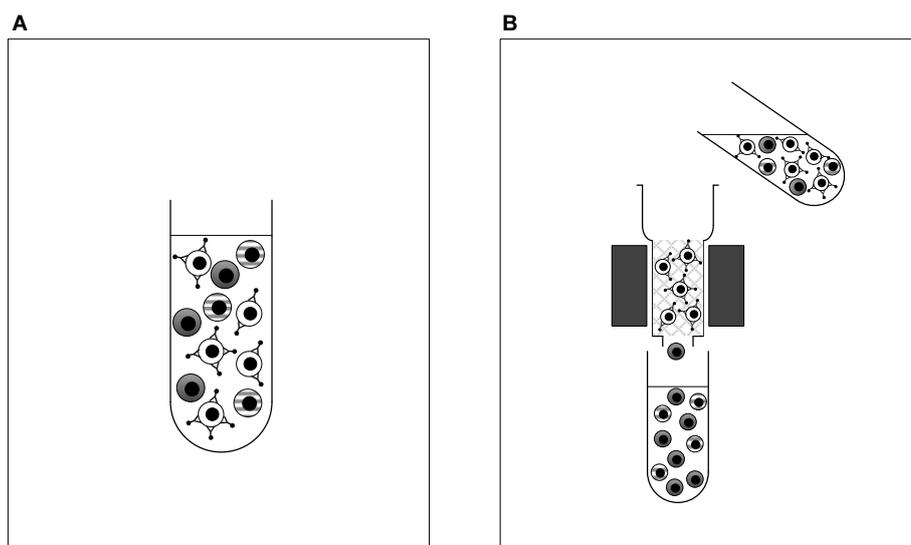


Abbildung 5 A+B Prinzip der Zelldepletierung mittels MACS. Die Erklärungen erfolgen im Text.

Bei Patienten, deren PBMC im ELISpot-Assay eine starke allergenspezifische Reaktivität gezeigt hatten, und bei Kontrollpersonen wurde frühestens 4 Wochen nach der ersten Blutentnahme nochmals Blut entnommen und die PBMC isoliert. Die gewonnenen PBMC wurden in drei 15 ml Röhrchen aufgeteilt, ein Röhrchen wurde auf Eis aufbewahrt und die PBMC später direkt im ELISpot-Assay verwendet. Aus den PBMC der anderen beiden Röhrchen wurden mittels MACS die CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} Zellen durch negative Selektion entfernt und entsprechend die CD4^{neg} bzw. CD8^{neg} Zellen im ELISpot-Assay eingesetzt. Dazu wurden die PBMC zunächst in der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Pellets in 80 µl eiskaltem MACS-Puffer je 10⁷ PBMC resuspendiert. Durch Inkubation für 15 min bei 4°C mit 20 µl CD4 bzw. CD8 MicroBeads je 10⁷ PBMC wurden die CD4^{pos} bzw. die CD8^{pos} Zellen markiert. Nicht gebundene MicroBeads wurden durch Zugabe von 9 ml MACS-Puffer und anschließende Zentrifugation entfernt. Die Zellpellets wurden nach vollständigem Abpipettieren des Überstandes in 4 ml MACS-Puffer resuspendiert und über einen Zellfilter (Porengröße 70 µm) auf die MACS-Säulen pipettiert, die zuvor in einen Magneten eingespannt und mit je 4 ml MACS-Puffer gespült worden waren. Es wurden so die markierten CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} Zellen in dem Magnetfeld zurückgehalten, die durchlaufenden CD4^{neg} bzw. CD8^{neg} Zellen wurden in einem 15 ml Röhrchen aufgefangen. Die Säulen wurden noch zweimalig mit 4 ml MACS-Puffer gewaschen, anschließend wurden die aufgefangenen Zellen herunterzentrifugiert und das Pellet nach vollständigem Abpipettieren des Überstandes in Kulturmedium resuspendiert. Durch diese Methode werden üblicherweise mindestens 85% der CD8^{pos} T-Lymphozyten bzw. mindestens 90% der CD4^{pos} T-Lymphozyten depletiert (Persönliche Kommunikation Dr. Höhlich, Miltenyi Biotech GmbH; Kammerer et al., 1997; Ma et al., 2002; El Bassam et al., 2006). Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 2x10⁷ / ml eingestellt. Die gewonnenen CD4^{neg} und CD8^{neg} Zellen sowie die PBMC wurden anschließend wie oben beschrieben im ELISpot-Assay untersucht. Die Zellzahlen je Vertiefung lagen bei 1x10⁶. Die Allergene wurden jeweils nur in der optimalen Konzentration verwendet.

3.4.9 Immunhistochemische Färbungen von Hautbiopsaten

Bei 4 Patienten war eine Probebiopsie aus dem Arzneimittelexanthem entnommen und im Histologischen Labor der Universitäts-Hautklinik Rostock mit Hämatoxylin-Eosin (HE) routinemäßig gefärbt worden. Diese Schnitte wurden für die vorliegende Dissertation erneut beurteilt, wobei der Schwerpunkt der Auswertung auf die Stärke und Verteilung des Entzündungsinfiltrates gelegt wurde. Aus noch vorhandenem in Paraffin fixiertem Gewebe wurden zudem neue Schnittpräparate angefertigt und mit Farbstoff-gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen CD3 (T-Lymphozyten), CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Lymphozyten), CD20 (B-Lymphozyten), CD56 (NK-Zellen) und CD79a (B-Lymphozyten) immunhistochemisch gefärbt. Die Färbung erfolgte nach der Alkalischen-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 3.3.5 aufgeführt. Die mikroskopische Auswertung wurde durch zwei unabhängige Untersucher vorgenommen. Es wurde zunächst die Stärke des Entzündungsinfiltrates an Hand der HE-gefärbten Schnittpräparate beurteilt und in drei Kategorien eingeteilt (+, geringes Infiltrat; ++, mäßiges Infiltrat; +++, starkes Infiltrat). Im Anschluss wurden die immunhistochemischen Färbungen betrachtet und der prozentuale Anteil der CD3^{pos}, CD4^{pos}, CD8^{pos}, CD20^{pos}, CD56^{pos} und CD79a^{pos} Zellen am Gesamtinfiltrat bestimmt.

3.4.10 Auswertung

Für die Beurteilung, gegen welche Betalaktame bei den Patienten eine Sensibilisierung vorlag, wurde zum einen die Anamnese berücksichtigt, die in allen Fällen typisch für eine Penicillinallergie vom Spättyp war. Zum anderen wurden die Ergebnisse der Hauttestungen herangezogen. Auf eine orale Provokationstestung mit Betalaktam-Antibiotika, die in den Hauttestungen zu positiven Reaktionen geführt hatten, wurde aus ethischen Gründen verzichtet.

Die Auswertung der ELISpot-Platten erfolgte am automatisierten ELISpot-Lesesystem. Jeder nachweisbare Spot entspricht dabei einer Zytokin-freisetzenden Zelle. Auf die Bezeichnung „T-Zelle“ wurde bewusst verzichtet, da insbesondere IFN- γ auch von anderen Zellen innerhalb der PBMC (z.B. Makrophagen, NK-Zellen) freigesetzt werden kann. Als allergen- bzw. Betalaktam-spezifische Zellen wurden diejenigen Zytokin-freisetzenden Zellen angesehen, die in Wells der ELISpot-Platte, in denen die PBMC mit einem Allergen stimuliert wurden, über die Anzahl der Zytokin-freisetzenden Zellen in Wells, in denen die PBMC ohne ein Allergen in reinem Kulturmedium inkubiert wurden (spontane Zytokinfreisetzung, Leerwert), hinaus gezählt werden konnten. Die Anzahl der spezifischen Zellen bezieht sich dabei immer auf 1×10^6 PBMC bzw. CD8^{neg} oder CD4^{neg} Zellen. Sie entspricht jeweils dem Mittelwert aus Dreifachbestimmungen. Da sich die Ergebnisse beim ELISpot-Assay auf einzelne Zellen beziehen, wurden rechnerisch entstandene Dezimalstellen gerundet und die ganzzahligen Werte angegeben. Wenn sich eine negative Anzahl an spezifischen Zellen ergab, wurde der Wert durch Null ersetzt.

3.4.10.1 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität eines diagnostischen Testverfahrens bezeichnet den Anteil von Patienten mit einer Krankheit, bei dem der Test positiv ausfällt. Die Spezifität eines diagnostischen Testverfahrens gibt den Anteil der gesunden Personen an, bei dem der Test negativ ausfällt. Als falsch positive Ergebnisse werden positive Testergebnisse bei gesunden Personen bezeichnet. Unter falsch negativen Ergebnissen sind negative Testergebnisse bei erkrankten Patienten zu verstehen.

3.4.10.2 Positiver und negativer prädiktiver Wert

Der positive prädiktive Wert gibt an, wie viele Probanden, bei denen ein Test positiv war, auch tatsächlich erkrankt sind. Der negative prädiktive Wert gibt analog dazu die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Proband mit negativem Testergebnis tatsächlich gesund ist.

3.4.10.3 Cut-off Wert

In der vorliegenden Arbeit sollte die diagnostische Bedeutung des ELISpot-Assays bei der Penicillinallergie vom Spättyp abgeschätzt werden. Dafür war die Festlegung eines Cut-off Wertes essentiell. Dieser Wert gilt als Grenzwert zwischen normalen und pathologischen Werten und entspricht in dieser *in vitro* Studie der Anzahl allergenspezifischer Zellen je 10^6 PBMC im ELISpot-Assay, ab der eine Zytokinfreisetzung im Rahmen einer Allergie unterstellt wird. Für die Festlegung des Cut-off Wertes wurden die Ergebnisse der ELISpot-Assays von 20 Kontrollpersonen herangezogen. Es wurde jeweils der Mittelwert aus der Anzahl Betalaktam-spezifischer Zellen je 10^6 PBMC nach Addition der zweifachen Standardabweichung vom Mittelwert innerhalb der Kontrollgruppe als Cut-off Wert festgesetzt. Als weiteres Kriterium für ein positives Testergebnis wurde definiert, dass der Stimulationsindex (SI) ≥ 2 sein musste. Der SI entspricht dem Verhältnis der Anzahl Zytokin-freisetzender Zellen in Wells der ELISpot-Platte, in denen die PBMC mit einem Allergen stimuliert wurden, zu der Anzahl Zytokin-freisetzender Zellen in Wells, in denen die PBMC ohne ein Allergen in reinem Kulturmedium inkubiert wurden (spontane Zytokinfreisetzung, Leerwert). Es wurde jeweils mit dem Mittelwert aus Dreifachbestimmungen gerechnet.

3.4.10.4 ROC-Kurven Analyse

Für die Erstellung einer Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve wird in einem Koordinatensystem die Richtigpositivrate (Sensitivität) eines Tests auf der y-Achse gegen die Falsch-positiv-Rate ($1 - \text{Spezifität}$) auf der x-Achse aufgetragen. Jeder Punkt auf der ROC-Kurve repräsentiert ein Sensitivitäts-/Spezifitäts-Paar, korrespondierend zu einem Cut-off-Wert. Mit einer winkelhalbierenden Geraden durch den Nullpunkt kann das Diagramm in zwei Dreiecke unterteilt werden. Je weiter die ROC-Kurve von dieser Geraden entfernt ist und sich in die linke obere Ecke des Koordinatensystems krümmt, desto besser trennt der Test zwischen gesunden und erkrankten Probanden (Zweig und Campbell, 1993; Perkins und Schisterman, 2006; Akobeng, 2007). Zwei Methoden sind üblich, um den Cut-off Wert aus den einzelnen Messwerten der ROC-Kurve zu

ermitteln. Zum einen kann der Punkt auf der ROC-Kurve ausgewählt werden, der den geringsten Abstand zu der linken oberen Ecke des Koordinatensystems besitzt. Zum anderen kann die Stelle auf der Kurve bestimmt werden, die den größten vertikalen Abstand zu der winkelhalbierenden Diagonalen hat. Bei letzterem Verfahren soll die Gesamtrate falscher Ergebnisse kleiner sein (Perkins und Schisterman, 2006; Akobeng, 2007). Ein Maß für die Gesamtgenauigkeit eines diagnostischen Tests ist die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC, Area under the curve). Sie kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei ein größerer Wert eine bessere Trennschärfe anzeigt. Durch direkte Vergleiche der AUC von verschiedenen Tests kann überprüft werden, welcher Test eine größere diagnostische Genauigkeit für eine bestimmte Fragestellung aufweist (Zweig und Campbell, 1993; Akobeng, 2007). Die ROC-Kurven Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um durch Vergleich der AUC bei Einsatz von verschiedenen Betalaktam-Konzentrationen im ELISpot-Assay diejenige zu finden, welche eine optimale Trennung zwischen Patienten und Kontrollpersonen an Hand ihrer Ergebnisse im ELISpot-Assay ermöglichte.

3.4.10.5 Variationskoeffizienten

Der Variationskoeffizient stellt ein Streuungsmaß dar. Er wird berechnet aus der Standardabweichung einer Messreihe geteilt durch den Mittelwert.

3.4.10.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS 15.0 für Windows. Da eine Normalverteilung der Daten an Hand der Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Tests nicht angenommen werden konnte, wurden für alle statistischen Analysen parameterfreie Tests angewandt, die auf Rängen basieren. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test (unverbundene Stichproben) bzw. der Wilcoxon Test (verbundene Stichproben) durchgeführt. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen erfolgten mittels Kruskal-Wallis Test (unverbundene Stichproben) bzw. Friedman Test (verbundene Stichproben). Ein Resultat wurde als signifikant betrachtet, wenn die Nullhypothese mit über 95%iger Wahrscheinlichkeit abgelehnt werden konnte ($p < 0,05$). Sofern nicht anders bezeichnet, sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung sowie Median (Minimum - Maximum) angegeben. Graphiken wurden mit Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office PowerPoint 2007 und Microsoft Office Visio 2007 erstellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Versuche zur Optimierung des ELISpot-Assays

Die Vorversuche wurden mit PBMC von nickelallergischen Patienten (n=8) und gesunden Kontrollpersonen (n=10) durchgeführt. Als wichtigstes Resultat zeigte sich, dass die Nachweisbarkeit Zytokin-freisetzender Zellen stark vom Typ der verwendeten ELISpot-Platten und von der Art der Färbung abhing. Die ersten Versuche fanden unter Verwendung von ELISpot-Platten mit Nitrozellulose-Membran (HA-Platten; Millipore, MAHAS 4510) und AEC-Färbung (rote Spots) statt. Es war eine Nickel-spezifische IFN- γ Freisetzung bei den Patienten nachweisbar, eine allergenspezifische Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 konnte hingegen nicht detektiert werden (Abb. 6A). Auch die Membranen der Positivkontrollen (PHA-Stimulation) zeigten bei Messung von den Typ 2 Zytokinen teilweise eine blasse, fleckige Anfärbung, jedoch keine eindeutigen Spots. In weiteren Versuchen wurde die Färbung daher mit BCIP/NBT durchgeführt (blaue Spots), welche eine stärkere Anfärbung der Spots ermöglichen sollte. Es ließ sich so neben der IFN- γ Sekretion auch eine Produktion von Typ 2 Zytokinen nachweisen, die Spots waren jedoch weiterhin kontrastarm, insbesondere bei IL-4 und IL-13 (Abb. 6B). Nach Wechsel von ELISpot-Platten mit Nitrozellulose-Membran zu ELISpot-Platten mit PVDF-Membran (IP-Platten; Millipore, MAIPS 4510) zeigte sich eine deutliche Zunahme der erkennbaren Spots, die sich nun gut definiert und kontrastreich darstellten (Abb. 6C).

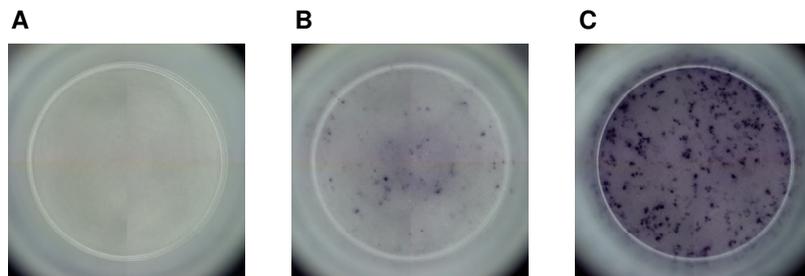


Abbildung 6 A-C Nickel-spezifische IL-13 Spots bei Patientin MR unter Verwendung verschiedener Färbungen und ELISpot-Platten. Während bei Verwendung von HA-Platten und AEC-Färbung keine Spots erkennbar waren (A), zeigten sich bei Verwendung von HA-Platten und BCIP/NBT-Färbung vorwiegend kontrastarme, verwaschene erscheinende Spots (B). Bei Einsatz von IP-Platten in Kombination mit der BCIP/NBT-Färbung erschienen die Spots kontrastreich und gut definiert (C).

Ein direkter Vergleich der beiden Plattentypen wurde bei drei Patienten und drei Kontrollpersonen durchgeführt. Während im IFN- γ ELISpot-Assay die Anzahl der nachweisbaren allergenspezifischen Zellen je 10^6 PBMC von Patienten bei beiden Plattentypen vergleichbar groß war, zeigte sich im IL-4, IL-5 oder IL-13 ELISpot-Assay eine größere Quantität bei Nutzung von IP-Platten (Abb. 7A). Die Unterschiede waren nicht signifikant. Innerhalb der Kontrollgruppe waren keine starken Unterschiede zwischen den beiden Plattentypen vorhanden (Abb. 7B). IP-Platten wiesen demnach für den

Nachweis von IL-4, IL-5 bzw. IL-13 sezernierenden Zellen eine höhere Sensitivität auf. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen und um zu entscheiden, welche Platten besser zur Detektion von IFN- γ geeignet sind, sind jedoch größere Fallzahlen erforderlich.

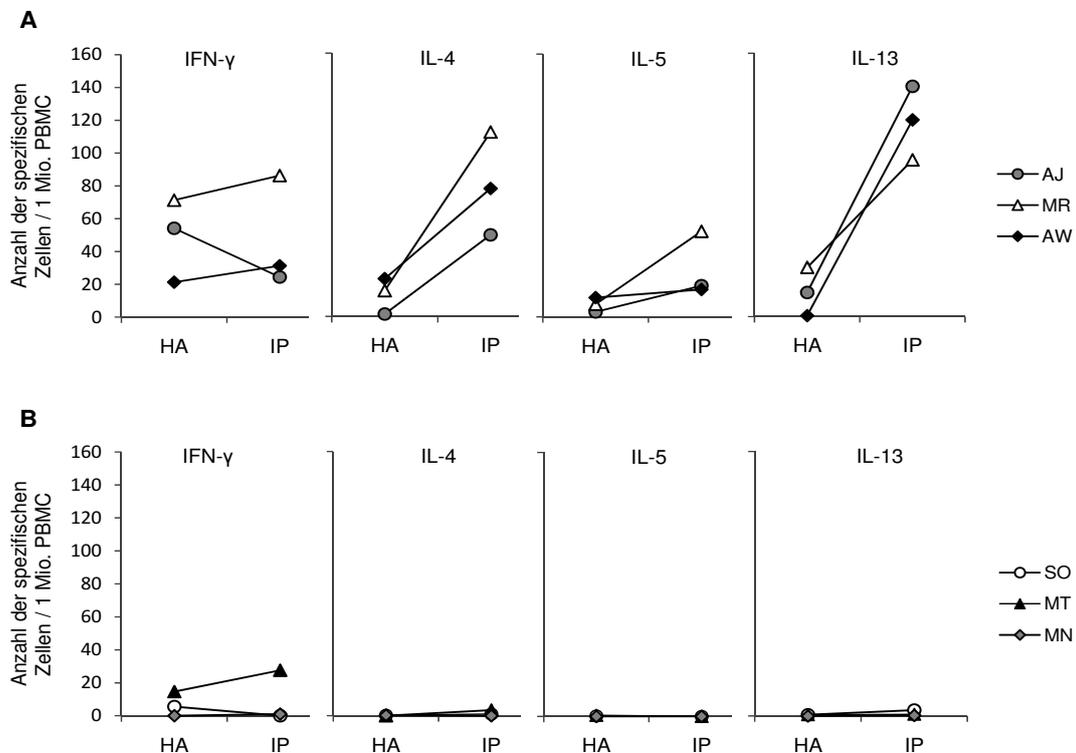


Abbildung 7 A+B Vergleich der Nickel-spezifischen Zytokinproduktion unter Verwendung verschiedener ELISpot-Platten. Dargestellt ist die Anzahl der nachweisbaren Nickel-spezifischen Zellen bei Nutzung von ELISpot-Platten mit Nitrozellulose-Membran (HA) bzw. PVDF-Membran (IP) bei Patienten (A) (n=3) und Kontrollpersonen (B) (n=3). Die Färbung erfolgte mit BCIP/NBT. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Bei allen folgenden Versuchen wurden ELISpot-Platten mit PVDF-Membran (Typ MAIPS 4510) verwendet und die Färbung mit BCIP/NBT durchgeführt.

Die nachfolgenden Kapitel beziehen sich auf die Hauptversuche zur Penicillinallergie.

4.2 Patientencharakteristika

Das Kollektiv setzte sich aus 20 Patienten mit einem vorausgegangenem Arzneimittellexanthem nach der Einnahme eines Betalaktam-Antibiotikums und aus 21 Kontrollpersonen, bei denen sich anamnestisch kein Anhalt für eine Betalaktam-Allergie ergab, zusammen. Die klinischen und demographischen Angaben sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Das Alter der Patienten lag zwischen 21 und 85 Jahren (Mittelwert 61, Median 66), es waren 14 Frauen und 6 Männer. Das Betalaktam-Antibiotikum, welches verdächtigt wurde, die allergische Reaktion ausgelöst zu haben, war in 6 Fällen (30%) Ampicillin (eingenommen: Sultamicillin), bei 9

Patienten (45%) Amoxicillin, bei drei Patienten (15%) Benzylpenicillin und bei einem Patienten (5%) Phenoxymethylpenicillin. Bei einer Patientin (5%) konnte das auslösende Medikament aus der Anamnese nicht ermittelt werden. Für die weitere Versuchsauswertung wurde in diesem Fall Ampicillin als verdächtiges Medikament festgelegt, da dieses in den Hauttestungen zu den stärksten Reaktionen geführt hatte. Klinisch hatte sich die Arzneimittelallergie bei 12 Patienten (60%) als makulopapulöses Exanthem manifestiert, bei 5 Patienten (25%) als Erythema exsudativum multiforme minor und bei einer Patientin (5%) als Stevens-Johnson Syndrom. Zwei Patienten (10%) beschrieben ihre Hautveränderungen als Erythem. Das Vorliegen einer Atopie (Atopie-Score ≥ 10) war bei 4 Patienten (20%) wahrscheinlich, das Gesamt-IgE war bei zwei Patienten (10%) erhöht.

Tabelle 2 Klinische und demographische Daten der Patienten.

Initialen	Alter/ Geschlecht	Verdächtigtes Medikament	Typ der Reaktion	Jahr der Reaktion	Atopie- Score	Gesamt-IgE (kU/l)
BH	46 / w	Ampicillin	EEM	2008	3	22,2
MW	61 / w	Ampicillin	EEM	2008	12	14,5
HP	70 / w	Ampicillin	EEM	2008	9	55,1
TK	44 / m	Ampicillin	MPE	2004	5	8
JS	66 / w	Ampicillin	MPE	2005	2	n.d.
EZ	85 / w	Ampicillin	MPE	2009	8	67,6
GS	78 / w	??*	MPE	2006	1	38,7
CA	21 / w	Amoxicillin	EEM	2007	10	66,9
LP	73 / w	Amoxicillin	EEM	2001	10	20,7
GH	74 / w	Amoxicillin	SJS	2005	12	289
WP	73 / w	Amoxicillin	MPE	2007	1	2
RJ	64 / w	Amoxicillin	MPE	2005	5	40
MB	21 / w	Amoxicillin	MPE	2008	0	4,5
BA	57 / w	Amoxicillin	MPE	2007	9	15,7
UB	65 / m	Amoxicillin	MPE	2009	4	290
BS	49 / w	Amoxicillin	MPE	2006	7	7,29
GB	71 / m	Benzylpenicillin	MPE	2006	5	17,9
ES	70 / m	Benzylpenicillin	MPE	1989	1	29,3
HS	78 / m	Benzylpenicillin	Erythem	1960er	8	84,9
BH2	54 / m	Phenoxymethyl- penicillin	Erythem	1995	3	60,3

w, weiblich; m, männlich; EEM, Erythema exsudativum multiforme; MPE, Makulopapulöses Exanthem; SJS, Stevens-Johnson Syndrom; n.d., nicht durchgeführt. *, das auslösende Medikament war nicht bekannt, für die weitere Datenauswertung wurde Ampicillin als verdächtiges Medikament festgelegt.

Die Kontrollpersonen waren zwischen 25 und 76 Jahren alt (Mittelwert 54, Median 58), 13 waren weiblich und 8 männlich. Eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Atopie bestand bei 4 Kontrollpersonen (19,1%). Bei Kontrollperson HB wurde der ELISpot-Assay nur nach Depletierung von CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse gehen daher nur in die Auswertungen für Kapitel 4.5 ein.

Tabelle 3 Klinische und demographische Daten der Kontrollpersonen.

Initialen	Alter/ Geschlecht	Verdächtigtes Medikament	Typ der Reaktion	Jahr der Reaktion	Atopie- Score	Gesamt-IgE (kU/l)
FB	25 / w	-	-	-	3	n.d.
SN	25 / w	-	-	-	6	n.d.
JT	44 / m	-	-	-	8	n.d.
HE	67 / w	-	-	-	8	n.d.
JF	74 / m	-	-	-	2	n.d.
JA	59 / w	-	-	-	11	n.d.
MN	25 / w	-	-	-	10	n.d.
YE	26 / w	-	-	-	3	n.d.
RN	55 / w	-	-	-	2	n.d.
LM	27 / w	-	-	-	10	n.d.
MT	58 / w	-	-	-	11	n.d.
JW	63 / m	-	-	-	2	n.d.
FZ	52 / m	-	-	-	1	n.d.
LG	76 / w	-	-	-	1	n.d.
KS	59 / m	-	-	-	9	n.d.
RW	71 / w	-	-	-	7	n.d.
BK	54 / w	-	-	-	6	n.d.
ER	73 / m	-	-	-	7	n.d.
GG	74 / m	-	-	-	5	n.d.
IW	51 / w	-	-	-	4	n.d.
HB*	73 / m	-	-	-	6	n.d.

w, weiblich; m, männlich; EEM, Erythema exsudativum multiforme; MPE, Makulopapulöses Exanthem; SJS, Stevens-Johnson Syndrom; n.d., nicht durchgeführt. *, der ELISpot-Assay wurde nur nach Depletierung von CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} Zellen durchgeführt, die Ergebnisse gehen daher nur in die Auswertungen für Kapitel 4.5 ein.

4.3 Ergebnisse der allergologische Testungen

Die Ergebnisse der allergologischen Hauttestungen und der oralen Provokationstestungen sind in Tabelle 4 dargestellt. Spezifische IgE-Antikörper gegen Betalaktam-Antibiotika oder positive Reaktionen im Sinne von Soforttypreaktionen bei der Ablesung nach 20 min im Pricktest bzw. Intrakutantest waren bei keinem der Patienten nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Spätablesungen der Hauttests ergaben bei 11 Patienten (55%) positive Ergebnisse bei Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin und Aminopenicillinen. 9 Patienten (45%) zeigten positive Reaktionen ausschließlich auf Aminopenicilline. Bei 5 dieser Patienten wurde eine orale Provokationstestung mit Phenoxymethylpenicillin durchgeführt und gut vertragen. Die Hauttestungen mit Cefpodoxim führten bei keinem der Patienten zu positiven Reaktionen. Bei 14 der 20 Patienten wurde eine OPT mit Cefpodoxim durchgeführt und toleriert.

Table 4 Ergebnisse der allergologischen Hauttestungen und der oralen Provokationstestung.

Pat.	Amoxicillin		Ampicillin			Benzylpenicillin			Phenoxy-methylpenicillin			Cefpodoxim			Sens.-Muster
	ECT	Prick	ECT	Prick	ICT	ECT	Prick	ICT	ECT	Prick	OPT	ECT	Prick	OPT	
BH	++	+	+++	+	+++	++	+	+	++	-	n.d.	-	-	-	A / P
MW	+	+	++	+	+++	+	+	+	+	-	n.d.	-	-	-	A / P
HP	+++	+	++	-	n.d.	+++	+	n.d.	+++	+	n.d.	-	-	-	A / P
TK	++	n.d.	++	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	A / -
JS	+	+	+	+	n.d.	-	-	n.d.	-	-	n.d.	-	-	n.d.	A / -
EZ	+	+	+	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A / -
GS	++	++	++	++	+++	-	-	++	+	+	n.d.	-	-	-	A / P
CA	++	+	-	(+)	n.d.	+	-	+	-	-	n.d.	-	-	-	A / P
LP	-	+	?	+	+++	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	A / -
GH	+++	n.d.	+++	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	A / P
WP	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	A / -
RJ	+	+	+	+	+++	++	-	+	-	-	n.d.	-	-	-	A / P
MB	+	+	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A / -
BA	+	n.d.	++	n.d.	+	-	n.d.	-	-	n.d.	-	-	n.d.	-	A / -
UB	+	n.d.	+	n.d.	+	-	n.d.	-	-	n.d.	-	-	n.d.	-	A / -
BS	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A / -
GB	-	n.d.	-	n.d.	++	+	n.d.	++	++	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	A / P
ES	+	n.d.	+	n.d.	+	+	n.d.	++	+	n.d.	n.d.	-		n.d.	A / P
HS	+	++	+	+	+	+	?	++	+	+	n.d.	-	-	-	A / P
BH2	+	n.d.	++	n.d.	+	++	n.d.	+	++	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	A / P

Die Hauttestungen stellen die Ergebnisse der Spätablesung dar. In der rechten Spalte ist das Sensibilisierungsmuster angegeben, das sich aus den Ergebnissen der Hauttests ergibt: A/P, Sensibilisierung gegen Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin und Aminopenicilline; A/-, Sensibilisierung nur gegen Aminopenicilline. Pat., Patient; ECT, Epikutantest; ICT, Intrakutantest; OPT, orale Provokationstestung; Prick, Pricktest; n.d., nicht durchgeführt.

4.4 Ergebnisse des ELISpot-Assays

4.4.1 Bestimmung der optimalen Betalaktamkonzentration

Es sollte erfasst werden, bei welcher Betalaktamkonzentration im ELISpot-Assay optimal zwischen sensibilisierten Patienten und gesunden Kontrollpersonen unterschieden werden konnte. Um dies zu erreichen, wurden Versuchsergebnisse von Patienten und Kontrollpersonen herangezogen, bei denen Aminopenicilline (Ampicillin und Amoxicillin) in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5 und 1 mg/ml) und Benzylpenicillin in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,5 und 1 mg/ml) im ELISpot-Assay eingesetzt worden waren (Ampicillin: 11 Patienten, 11 Kontrollpersonen; Amoxicillin: 10 Patienten, 10 Kontrollpersonen; Benzylpenicillin: 10 Patienten, 15 Kontrollpersonen). Bei den Patienten wurde dabei nicht unterschieden, ob eine Allergie vorlag, die sich klinisch manifestiert hatte, oder eine Sensibilisierung, die in den Hauttests bestätigt worden war. Für jedes Betalaktam sollte eine Konzentration ermittelt werden, die für alle 4 untersuchten Zytokine bestmögliche Ergebnisse erbrachte.

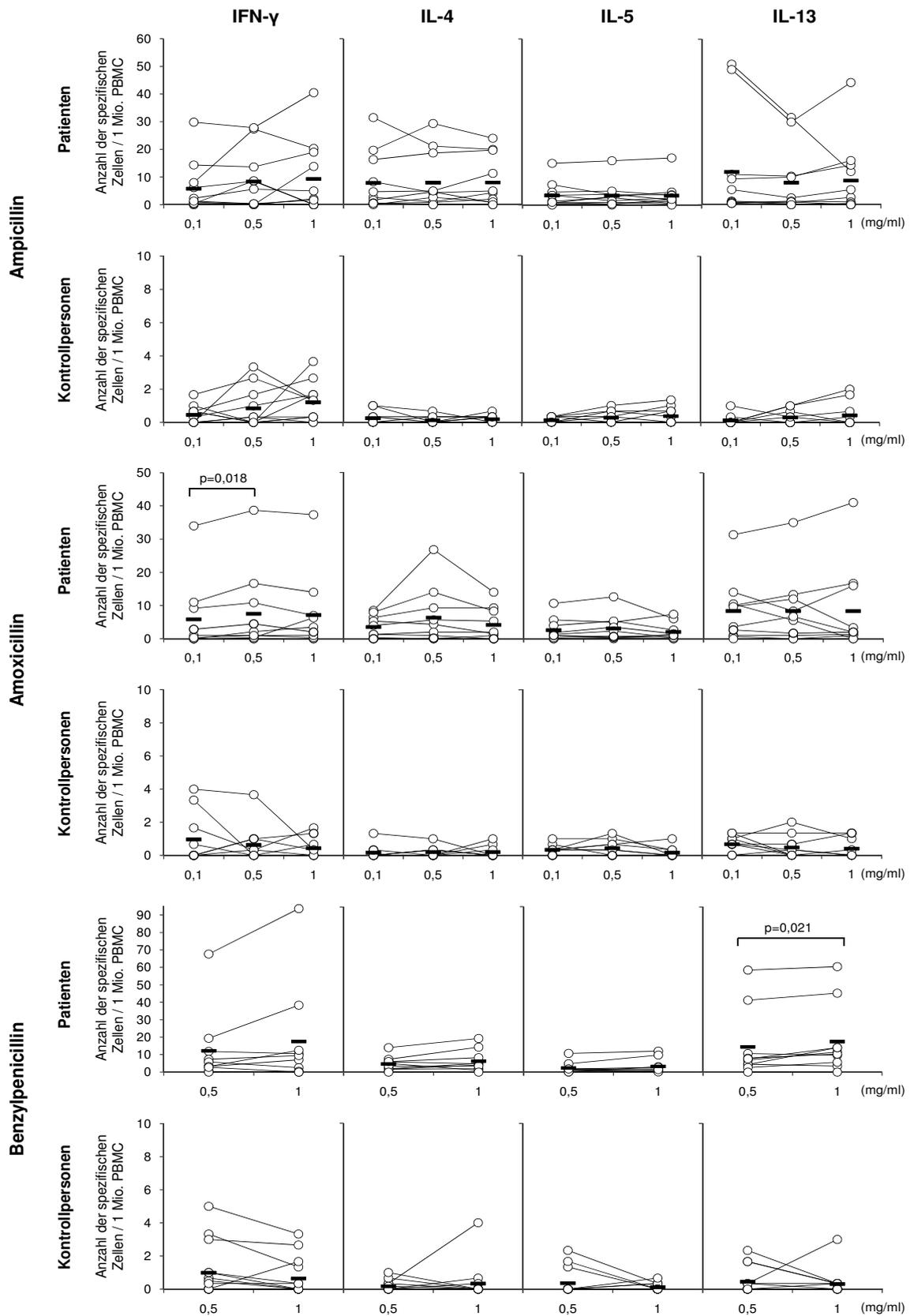


Abbildung 8 Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen bei Einsatz von verschiedenen Betalaktam-konzentrationen im ELISpot-Assay. Dargestellt sind die Ergebnisse von Patienten (Ampicillin: $n=11$; Amoxicillin: $n=10$; Benzylpenicillin: $n=10$) und Kontrollpersonen (Ampicillin: $n=11$; Amoxicillin: $n=10$; Benzylpenicillin: $n=15$) nach 48 h Inkubation der PBMC im ELISpot-Assay. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede sind mit den entsprechenden p -Werten gekennzeichnet.

Die verschiedenen Konzentrationen der Betalaktame ergaben keine deutlichen Unterschiede in der mittleren Anzahl der messbaren Spots (Abb. 8). Die Kurven der einzelnen Patienten zeigten dabei keine einheitlichen Verläufe und die maximale Anzahl Zytokin-produzierender Zellen war jeweils bei unterschiedlichen Betalaktamkonzentrationen zu beobachten.

Um festzustellen, bei welcher der getesteten Konzentrationen am besten zwischen Patienten und Kontrollpersonen unterschieden werden kann, wurde eine ROC-Kurven Analyse durchgeführt. Hierbei wurden die Flächen unter den Kurven (AUC), die ein Maß für die Gesamtgenauigkeit eines diagnostischen Tests darstellen, für die jeweiligen Konzentrationen eines Betalaktams miteinander verglichen und der Verlauf der Kurven im Bereich hoher Sensitivitäten betrachtet (Abb. 9). Es traten keine deutlichen Unterschiede auf. Die AUC für eine Ampicillin-Konzentration von 0,1 mg/ml war jedoch für alle Zytokine am größten und ermöglichte somit eine bessere Trennung zwischen Patienten und Kontrollpersonen als bei Konzentrationen von 0,5 mg/ml bzw. 1 mg/ml. Weniger einheitlich waren die Ergebnisse bei Einsatz von Amoxicillin und Benzylpenicillin. Bei Amoxicillin war die AUC für IFN- γ und IL-5 bei 1 mg/ml am größten, für IL-4 und IL-13 bei 0,1 mg/ml. Es wurde daher für weitere Versuche die mittlere Konzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt. Bei Benzylpenicillin ergaben sich die größten Werte für die AUC für IFN- γ und IL-4 bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml und für IL-5 bei 1 mg/ml. Für IL-13 war die AUC für beide Konzentrationen gleich. Die Kurvenverläufe im Bereich hoher Sensitivität waren jedoch für IFN- γ , IL-4 und IL-13 bei beiden getesteten Konzentrationen ähnlich, so dass 1 mg/ml als optimale Konzentration festgelegt wurde.

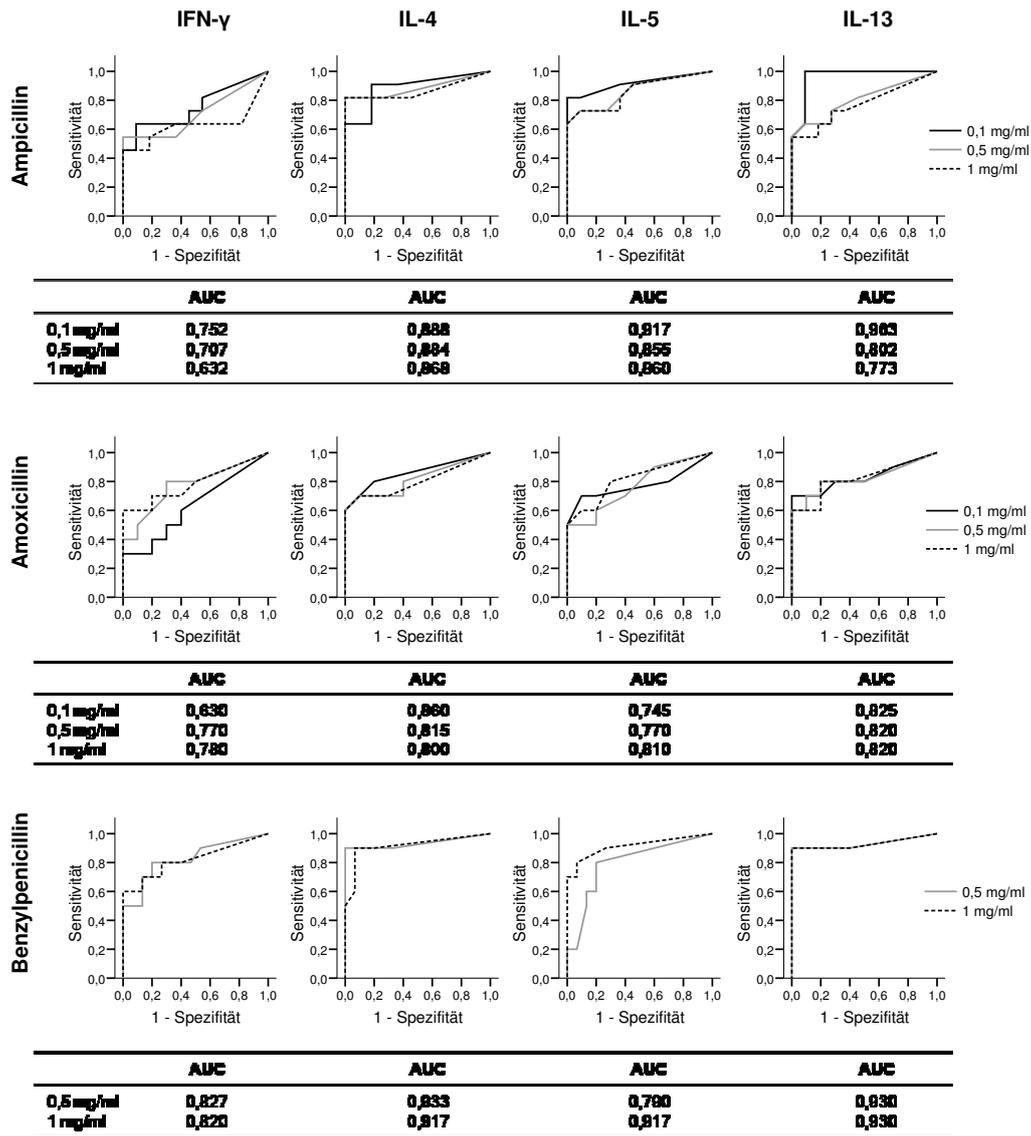


Abbildung 9 ROC-Kurven bei Einsatz von verschiedenen Betalaktam-Konzentrationen im ELISpot-Assay. In die Analyse ging die Anzahl der Betalaktam-spezifischen Zellen von Patienten (Ampicillin: n=11; Amoxicillin: n=10; Benzylpenicillin: n=10) und Kontrollpersonen (Ampicillin: n=11; Amoxicillin: n=10; Benzylpenicillin: n=15) je 10⁶ PBMC im ELISpot-Assay ein. In den Tabellen sind die zugehörigen Werte für die Flächen unter den Kurven (AUC) dargestellt.

Für die weitere Versuchsauswertung wurden die Ergebnisse bei Einsatz von 0,1 mg/ml Ampicillin, 0,5 mg/ml Amoxicillin und 1 mg/ml Benzylpenicillin betrachtet. Da bei keinem der Patienten eine Allergie gegen Ceftriaxon vorlag, wurde eine Konzentration von 0,1 mg/ml für die weiteren Untersuchungen festgelegt.

4.4.2 Festlegung der Cut-off Werte

In der vorliegenden Untersuchung sollte gezeigt werden, ob der ELISpot-Assay eine geeignete Methode für den *in vitro* Nachweis von Arzneimittelallergien darstellt. Hierzu mussten zunächst Cut-off Werte festgelegt werden. Es wurden die Betalaktam-spezifischen Zellen je 10^6 PBMC von 20 gesunden Kontrollpersonen quantifiziert und als Cut-off Wert der Mittelwert nach Addition der zweifachen Standardabweichung definiert. Dabei wurde für die verschiedenen Zytokine und Betalaktame jeweils ein eigener Cut-off Wert ermittelt.

Tabelle 5 Cut-off Werte für die einzelnen Zytokine und Betalaktam-Antibiotika.

	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13
Ampicillin	≥ 3	≥ 2	≥ 3	≥ 3
Amoxicillin	≥ 5	≥ 3	≥ 2	≥ 3
Benzylpenicillin	≥ 4	≥ 3	≥ 2	≥ 3
Ceftriaxon	≥ 6	≥ 2	≥ 2	≥ 3

Die Werte wurden aus dem Mittelwert und der zweifachen Standardabweichung der spezifischen Zellen in der Kontrollgruppe (Ampicillin, Amoxicillin, Ceftriaxon: $n=20$; Benzylpenicillin: $n=19$) berechnet.

Da gelegentlich, insbesondere im IFN- γ ELISpot-Assay, eine hohe Anzahl von Spots in Wells der ELISpot-Platte, in denen die PBMC in reinem Kulturmedium inkubiert wurden (Leerwert), auftrat, wurde als zusätzliches Kriterium für ein positives Testergebnis festgelegt, dass der Quotient (Stimulationsindex, SI) aus Spotzahlen in Wells, in denen die PBMC mit Betalaktam-Antibiotika stimuliert wurden, und dem Leerwert mindestens den Wert zwei betragen muss.

4.4.3 Spontane Zytokinfreisetzung aus PBMC (Leerwerte)

Die mittleren Frequenzen Zytokin-freisetzender Zellen in Wells der ELISpot-Platten, in denen die PBMC in reinem Kulturmedium inkubiert wurden (Spontane Zytokinfreisetzung, Leerwert), lagen in der Patientengruppe im IFN- γ ELISpot-Assay bei $3 \pm 4,29$ (Median: 2; Spannweite: 0-20) je 10^6 PBMC, im IL-4 ELISpot-Assay bei $0 \pm 0,59$ (0; 0-2), im IL-5 ELISpot-Assay bei $0 \pm 0,45$ (0; 0-1) und im IL-13 ELISpot-Assay bei $1 \pm 1,01$ (0; 0-3). In der Kontrollgruppe lagen die mittleren Leerwerte für IFN- γ bei $2 \pm 2,35$ (2; 0-9), für IL-4 bei $0 \pm 0,71$ (0; 0-3), für IL-5 bei $1 \pm 0,63$ (1; 0-2) und für IL-13 bei $1 \pm 0,88$ (1; 0-3). Die Werte für die einzelnen Patienten und Kontrollpersonen sind im Anhang (XXV) aufgeführt. Die Unterschiede zwischen der spontanen Zytokinfreisetzung in der Patientengruppe und der Kontrollgruppe waren nicht signifikant (IFN- γ : $p=0,914$; IL-4: $p=0,887$; IL-5: $p=0,075$; IL-13: $p=0,440$; Mann-Whitney U-Test).

4.4.4 Zytokinfreisetzung aus PBMC nach Stimulation mit dem verdächtigten Penicillin

Im Folgenden soll zunächst die Arzneimittel-spezifische Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay vergleichend für Patienten und Kontrollpersonen dargestellt werden (Abb. 10 A-D). Die Stimulation im ELISpot-Assay erfolgte bei jedem Patienten mit dem Betalaktam, das die allergische Hautreaktion

hervorgerufen hatte. Bei den einzelnen Kontrollpersonen sind die Ergebnisse jeweils für das gleiche Betalaktam wie bei dem parallel untersuchten Patienten dargestellt. In der Patientengruppe (n=20) lagen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (Median; Spannweite) Betalaktam-spezifischer Zellen bei $6 \pm 8,13$ (3; 0-32) je 10^6 PBMC für IFN- γ , $9 \pm 12,11$ (5; 0-43) für IL-4, $3 \pm 3,49$ (3; 0-15) für IL-5 und $12 \pm 15,95$ (7; 0-56) für IL-13. In der Kontrollgruppe ergaben sich Werte von $1 \pm 1,03$ (0; 0-4) für IFN- γ , $0 \pm 0,33$ (0; 0-1) für IL-4, $0 \pm 0,30$ (0; 0-1) für IL-5 und $0 \pm 0,83$ (0; 0-3) für IL-13. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren für IL-4, IL-5 und IL-13 hochsignifikant ($p < 0,001$; Mann-Whitney U-Test), für IFN- γ geringer, jedoch signifikant ($p = 0,015$; Mann-Whitney U-Test).

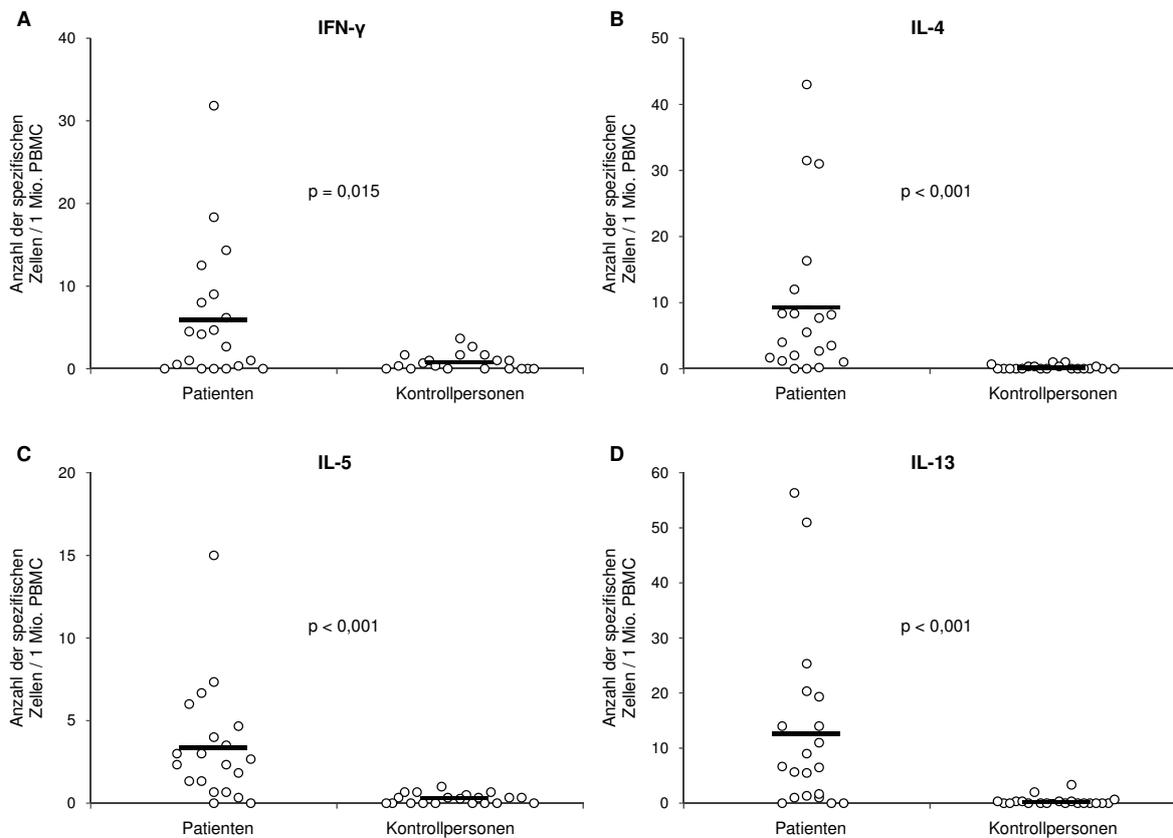


Abbildung 10 A-D Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay. Die Stimulation der PBMC von Patienten (n=20) und Kontrollpersonen (n=20) erfolgte für 48 h mit dem Medikament, welches bei dem jeweiligen Patienten die Allergie ausgelöst hatte. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind mit den zugehörigen p-Werten gekennzeichnet.

Die Anzahl allergenspezifischer Zellen und die Zytokinprofile für die einzelnen Patienten sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Daten der Kontrollpersonen sind im Anhang (XXV) aufgeführt.

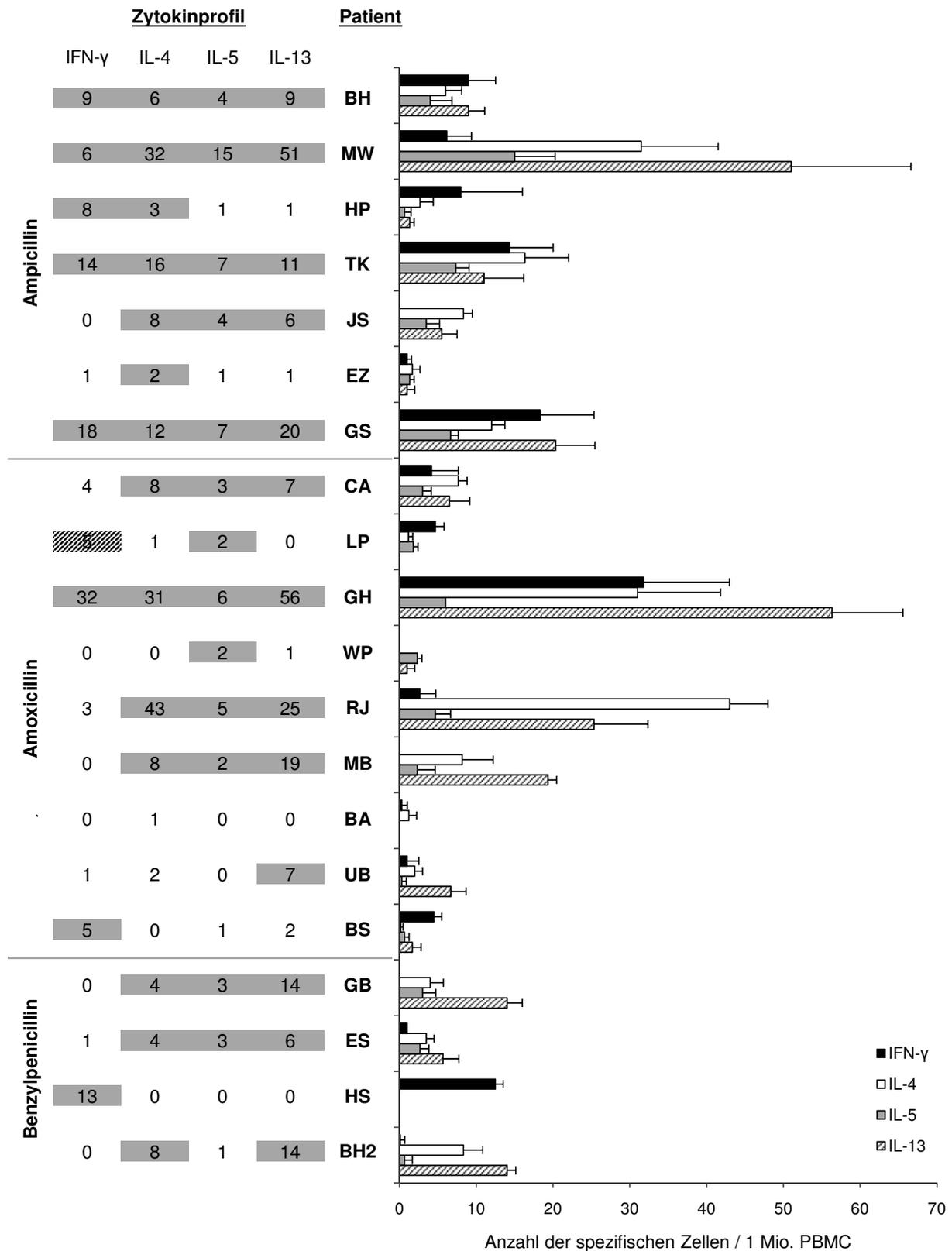


Abbildung 11 Allergenspezifische Zytokinprofile der 20 Patienten. Im linken Teil der Abbildung sind die Frequenzen allergenspezifischer Zellen nach 48 h Stimulation im ELISpot-Assay mit dem Betalaktam, das die allergische Hautreaktion ausgelöst hatte, dargestellt. Werte oberhalb des Cut-off Wertes sind grau unterlegt. Bei den schraffierten Zellen war der Leerwert so hoch, dass der Stimulationsindex <2 war. Im rechten Teil der Abbildung sind die Zytokinprofile graphisch dargestellt. Gezeigt wird der Mittelwert aus Dreifachbestimmungen mit der einfachen Standardabweichung.

Die Anzahl allergenspezifischer, IFN- γ freisetzender Zellen lag bei 8 von 20 Patienten (40%) oberhalb des Cut-off Wertes. Ein positives Testergebnis für IL-4 lag bei 14 von 20 Patienten (70%) vor, für IL-5 und IL-13 bei jeweils 13 von 20 Patienten (65%). Die Sensitivität konnte durch eine kombinierte Betrachtung von mehreren Zytokinen erhöht werden. Die Ergebnisse für zwei Zytokine sind in Tabelle 6 dargestellt. Die höchste Sensitivität ergab sich bei einer Kombination von IFN- γ mit IL-4, IL-5 oder IL-13 bzw. von IL-4 mit IL-5. Es konnten so 16 der 20 Patienten (80%) erkannt werden.

Tabelle 6 Sensitivität des ELISpot-Assays.

	IFN-γ	IL-4	IL-5	IL-13
IFN-γ	40%	80%	80%	80%
IL-4	80%	70%	80%	75%
IL-5	80%	80%	65%	75%
IL-13	80%	75%	75%	65%

Dargestellt ist die Sensitivität des ELISpot-Assays für die einzelnen Zytokine und bei kombinierter Betrachtung von jeweils zwei Zytokinen. Die Berechnung erfolgte aus den Ergebnissen der 20 Patienten nach Stimulation der PBMC mit dem Penicillin, das das Arzneimittlexanthem ausgelöst hatte.

Eine Kombination von drei Zytokinen führte ohne Einschluss von IFN- γ oder IL-5 zu einer Sensitivität von 85% (17/20) und ohne IL-4 oder IL-13 zu einer Sensitivität von 90% (18/20). Insgesamt war bei 19 der 20 Patienten (95%) der ELISpot-Assay bei mindestens einem Zytokin positiv. Die Spezifität wird im Kapitel 4.4.6 jeweils unter Berücksichtigung der Ergebnisse aller Kontrollpersonen je Betalaktam aufgeführt.

Die Zytokinprofile der Patienten waren sehr heterogen (s. rechter Teil der Abb. 11). 6 der 20 Patienten (30%) zeigten ein gemischtes Typ 1 und Typ 2 Zytokinprofil, während bei 11 Patienten (55%) ausschließlich Typ 2 Zytokine und bei zwei Patienten (10%) mit IFN- γ ein Typ 1 Zytokin produziert wurde. Bei einer Patientin (5%) konnte keine allergenspezifische Zytokinproduktion detektiert werden.

Die Freisetzung der Typ 2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in der Patientengruppe ergab für alle Kombinationen eine deutliche positive Korrelation nach Spearman-Rho, die mit $p < 0,01$ signifikant war. Die Frequenz IFN- γ freisetzender Zellen zeigte keine signifikante Korrelation mit den untersuchten Typ 2 Zytokinen (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.4.5 Abhängigkeit der Zytokinproduktion im ELISpot-Assay von klinischen Parametern

Um abzuschätzen, ob die Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen sowie das Zytokinprofil auffällige Unterschiede zwischen Patienten mit unterschiedlichen Sensibilisierungsmustern, verschiedenen klinischen Manifestationen des Arzneimittel-exanthems oder verschiedenen Atopie-Wahrscheinlichkeiten zeigten, wurden die Mittelwerte und Mediane der spezifischen Zellen sowie die Zahl der Patienten mit positivem Ergebnis im ELISpot-Assay miteinander verglichen. Zudem wurden statistische Vergleiche mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt, die jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahlen in den einzelnen Untergruppen nur eine eingeschränkte Aussagekraft haben.

4.4.5.1 Sensibilisierungsmuster

Es sollte untersucht werden, ob die Breite der Sensibilisierung einen Einfluss auf die Frequenz Betalaktam-spezifischer Zellen und das Zytokinprofil hatte. Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen aufgeteilt und diese miteinander verglichen. Die Patienten der einen Gruppe (A/P ; n=11) wiesen Sensibilisierungen gegen Aminopenicilline und Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin auf, die der anderen (A/- ; n=9) nur gegen Aminopenicilline (s. Tabelle 4). Die Mittelwerte und die Mediane der Frequenzen allergenspezifischer Zellen waren für alle Zytokine in der Gruppe A/P größer (Abb. 12), signifikant waren die Unterschiede für IL-13 ($p=0,046$; Mann-Whitney U-Test).

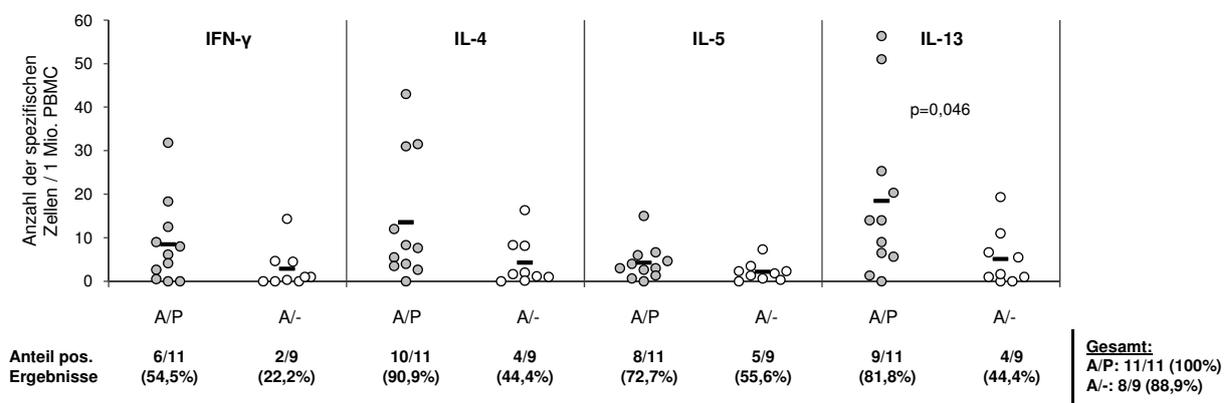


Abbildung 12 Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem Sensibilisierungsmuster. Dargestellt sind die Frequenzen allergenspezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten mit Sensibilisierung gegen Aminopenicilline und Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin (A/P; n=11) und bei Patienten mit alleiniger Aminopenicillinallergie (A/-; n=9). Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit den entsprechenden p-Werten gekennzeichnet.

Um auszuschließen, dass die Beobachtungen durch die in Gruppe A/P zahlreicher vorhandenen Patienten mit schweren klinischen Verlaufsformen (EEM und SJS) zustande kamen, wurden die Gruppenvergleiche zusätzlich unter alleiniger Berücksichtigung von Patienten, die zuvor ein MPE entwickelten (n=12), durchgeführt (Abb. 13). Es ergaben sich weiterhin signifikante Unterschiede im IL-13 ELISpot-Assay ($p=0,048$; Mann-Whitney U-Test), die Mittelwerte und Mediane waren für alle Zytokine in Gruppe A/P(MPE) (n=8) größer als in Gruppe A/-(MPE) (n=4).

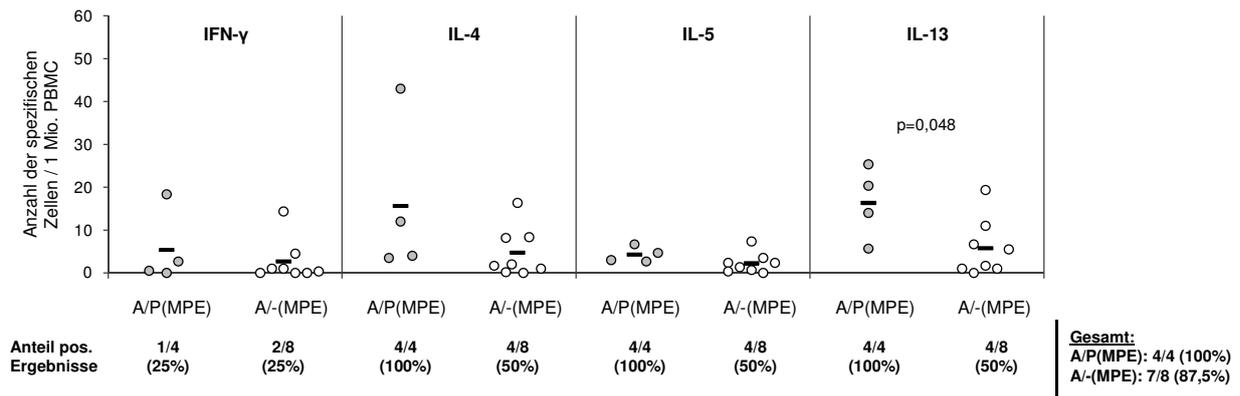


Abbildung 13 Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem Sensibilisierungsmuster bei Patienten, die zuvor ein makulopapulöses Exanthem entwickelten. Dargestellt sind die Frequenzen allergenspezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten, bei denen entweder eine Sensibilisierung gegen Aminopenicilline und Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin [A/P(MPE); n=4] oder eine alleinige Aminopenicillinallergie [A/-(MPE); n=8] vorlag. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit den entsprechenden p-Werten gekennzeichnet.

Die Zytokinprofile nach Allergenstimulation waren in Gruppe A/P breiter als in Gruppe A/- (Tabelle 4, Abb. 11). In Gruppe A/P waren bei 4 Patienten (36,4%) alle 4 Zytokine nachweisbar, bei weiteren 4 Patienten (36,4%) drei Zytokine, bei zwei Patienten (18,2%) zwei Zytokine und bei einem Patienten (9%) ein Zytokin, entsprechend einem Median von drei Zytokinen. In Gruppe A/- waren bei einem Patienten (11,1%) alle 4 Zytokine messbar, bei zwei Patienten (22,2%) drei Zytokine und bei 5 Patienten (55,6%) ein Zytokin. Bei einem Patienten (11,1%) war keine Zytokinproduktion nachweisbar. Der Median lag bei einem Zytokin.

4.4.5.2 Klinische Manifestation des Arzneimittelexanthems

Ein Vergleich der Frequenzen allergenspezifischer Zellen bei verschiedenen klinischen Manifestationen des Arzneimittelexanthems (Abb. 14) ergab signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl IFN-γ freisetzender Zellen in der Gruppe EEM (n=5) und in der Gruppe MPE (n=12), wobei die Frequenz in der Gruppe EEM größer war (p=0,048; Mann-Whitney U-Test). Auch bei den Typ 2 Zytokinen waren die Mittelwerte und Mediane der Frequenzen allergenspezifischer Zellen in der Gruppe EEM größer als in der Gruppe MPE, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test). Die Frequenz allergenspezifischer Zellen bei der Patientin mit SJS war bei allen Zytokinen hoch, besonders auffällig war die sehr hohe Anzahl IFN-γ freisetzender Zellen.

Bei Betrachtung der Zytokinprofile war auffällig, dass in der Gruppe EEM häufiger IFN-γ produziert wurde (3/5; 60%) als in der Gruppe MPE (3/12; 25%) (Tabelle 2, Abb. 11).

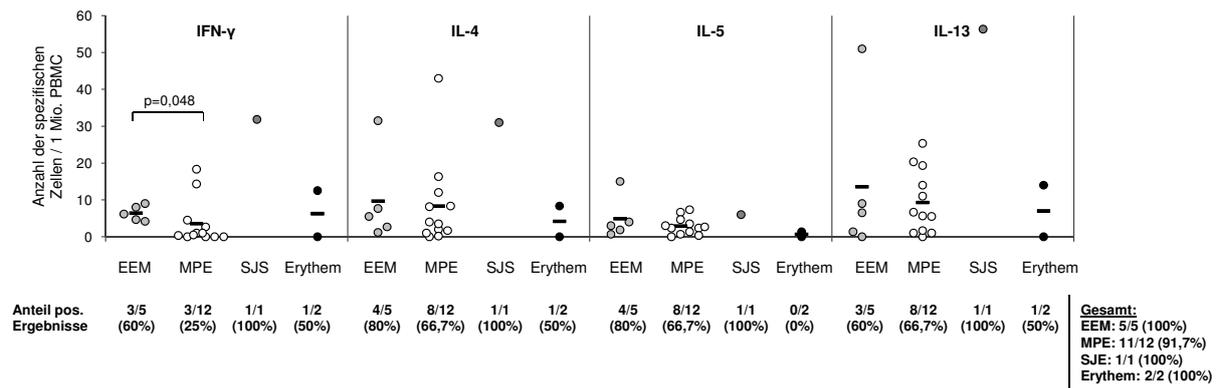


Abbildung 14 Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und der klinischen Manifestation. Dargestellt sind die Frequenzen allergenspezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten mit verschiedenen klinischen Manifestationen des Arzneimittel-exanthems. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit den entsprechenden p-Werten gekennzeichnet. EEM, Erythema exsudativum multiforme (n=5); MPE, makulopapulöses Exanthem (n=12); SJS, Stevens-Johnson Syndrom (n=1); Erythem (n=2).

4.4.5.3 Allergieauslösendes Betalaktam-Antibiotikum

Ein Vergleich der Frequenzen allergenspezifischer Zellen von Patienten, bei denen unterschiedliche Betalaktame das Arzneimittel-exanthem ausgelöst hatten, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Dennoch waren die mittleren Frequenzen spezifischer Zellen in der Patientengruppe, die Aminopenicilline eingenommen hatte, größer als in der Gruppe, die Benzyl-/Phenoxy-methylpenicillin eingenommen hatte (Abb. 15).

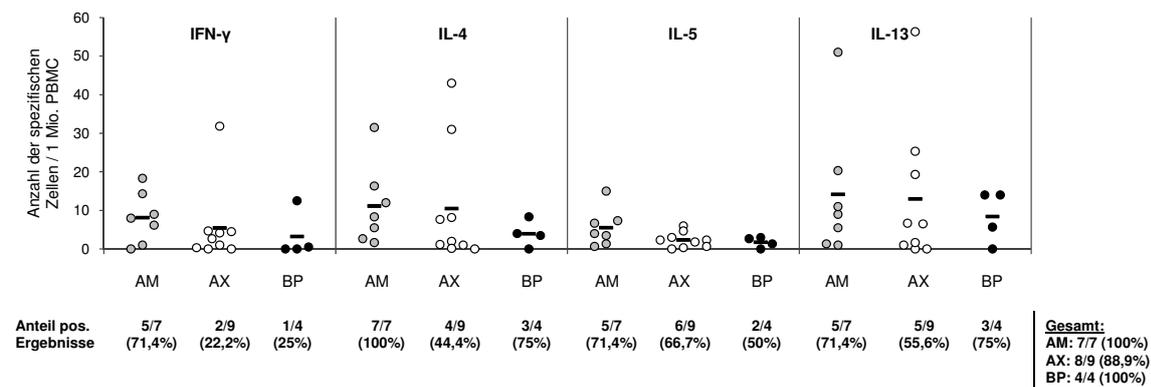


Abbildung 15 Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem allergieauslösenden Betalaktam. Dargestellt sind die Frequenzen allergenspezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten, bei denen unterschiedliche Betalaktame die allergische Reaktion ausgelöst hatten. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen lagen nicht vor. AM, Ampicillin (n=7); AX, Amoxicillin (n=9); BP, Benzylpenicillin (n=4).

4.4.5.4 Atopie-Status

Es wurde ein Vergleich der Anzahl Betalaktam-spezifischer Zytokin-produzierender Zellen bei Patienten mit Atopie (n=4) und bei Patienten, die an Hand der Ergebnisse des Erlanger Atopie-Scores

keine sicheren Hinweise auf eine Atopie boten (n=16), durchgeführt (Abb. 16). Die Mittelwerte und Mediane der Frequenzen allergenspezifischer Zellen waren für alle 4 Zytokine in der Gruppe von Patienten mit Atopie größer als in der Gruppe ohne Atopie. Besonders deutlich waren die Unterschiede im IL-4 und IL-13 ELISpot-Assay. Die Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test).

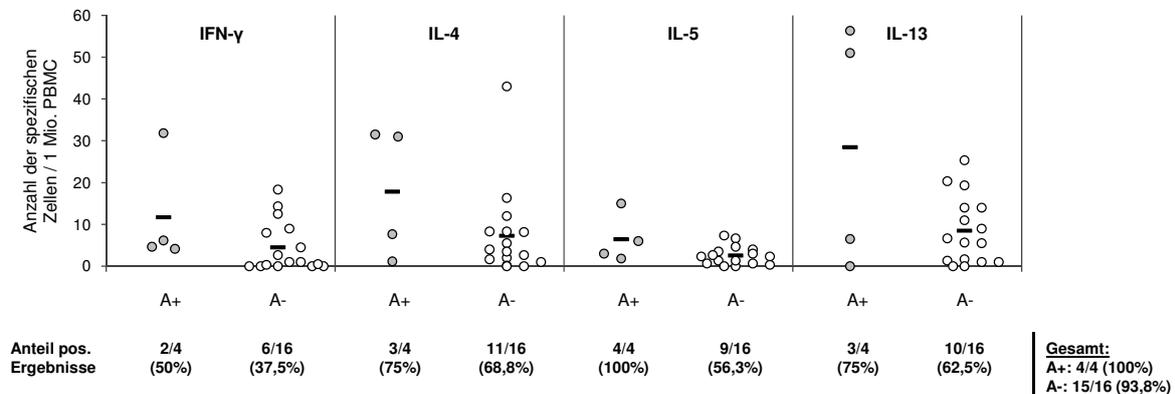


Abbildung 16 Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem Atopie-Status. Dargestellt sind die Frequenzen allergenspezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Atopie (A+, Atopie-Score ≥ 10 ; n=4) und bei Patienten mit geringer Wahrscheinlichkeit einer Atopie (A-, Atopie-Score ≤ 9 ; n=16). Die horizontalen Balken stellen die Mittelwerte dar. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Werte des Erlanger Atopie-Scores der Patienten waren signifikant positiv mit der Anzahl allergenspezifischer, IFN- γ freisetzender Zellen korreliert ($r=0,458$; $p=0,042$; Spearman-Rho). Mit der Anzahl Typ 2 Zytokin-freisetzender Zellen zeigte sich eine sehr geringe negative Korrelation, die das Signifikanz-Niveau nicht erreichte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei Kontrollpersonen lagen die Mittelwerte und Mediane sowohl in der Gruppe mit Atopie-Score ≥ 10 als auch in der Gruppe mit Atopie-Score ≤ 9 bei allen Zytokinen zwischen 0 und 1. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor (Mann-Whitney U-Test; Ergebnisse nicht dargestellt). Die Werte des Erlanger Atopie-Scores der Kontrollpersonen waren nicht signifikant mit den Ergebnissen des ELISpot-Assays korreliert (Spearman-Rho; Ergebnisse nicht dargestellt).

4.4.6 Zytokinfreisetzung aus PBMC nach Stimulation mit verschiedenen Betalaktamen

Es soll in diesem Teil der Arbeit auf die Betalaktam-induzierte Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay nach Stimulation mit verschiedenen Betalaktamen eingegangen werden, die entweder in Hauttests zu positiven Reaktionen geführt hatten oder in Hauttestungen - und in einigen Fällen auch in der oralen Provokationstestung - vertragen worden waren.

Die Hauttests mit den Aminopenicillinen Ampicillin und Amoxicillin ergaben bei allen 20 Patienten positive Reaktionen (Tabelle 4). Bei 16 von ihnen hatte ein Aminopenicillin das Arzneimittellexanthem ausgelöst und bei 15 dieser Patienten ergaben sich im ELISpot-Assay positive Ergebnisse nach

Stimulation der PBMC mit Aminopenicillinen. Die anderen 4 Patienten hatten Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin im zeitlichen Zusammenhang mit der allergischen Reaktion eingenommen und eine Kreuzsensibilisierung gegen Aminopenicilline konnte in Hauttests nachgewiesen werden. Bei zwei dieser 4 Patienten war der ELISpot-Assay mit Aminopenicillinen positiv. Innerhalb der Kontrollgruppe ergaben sich bei drei von 20 Probanden positive Ergebnisse auf Aminopenicilline im ELISpot-Assay. Die Anzahl Zytokin-produzierender Zellen war für alle Zytokine in der Patientengruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Bei Ampicillin ergaben sich im Mann-Whitney U-Test p-Werte von 0,006 für IFN- γ und <0,001 für IL-4, IL-5 und IL-13. Bei Amoxicillin waren die p-Werte für IFN- γ 0,03, für IL-4, IL-5 und IL-13 jeweils <0,001 (Abb.17).

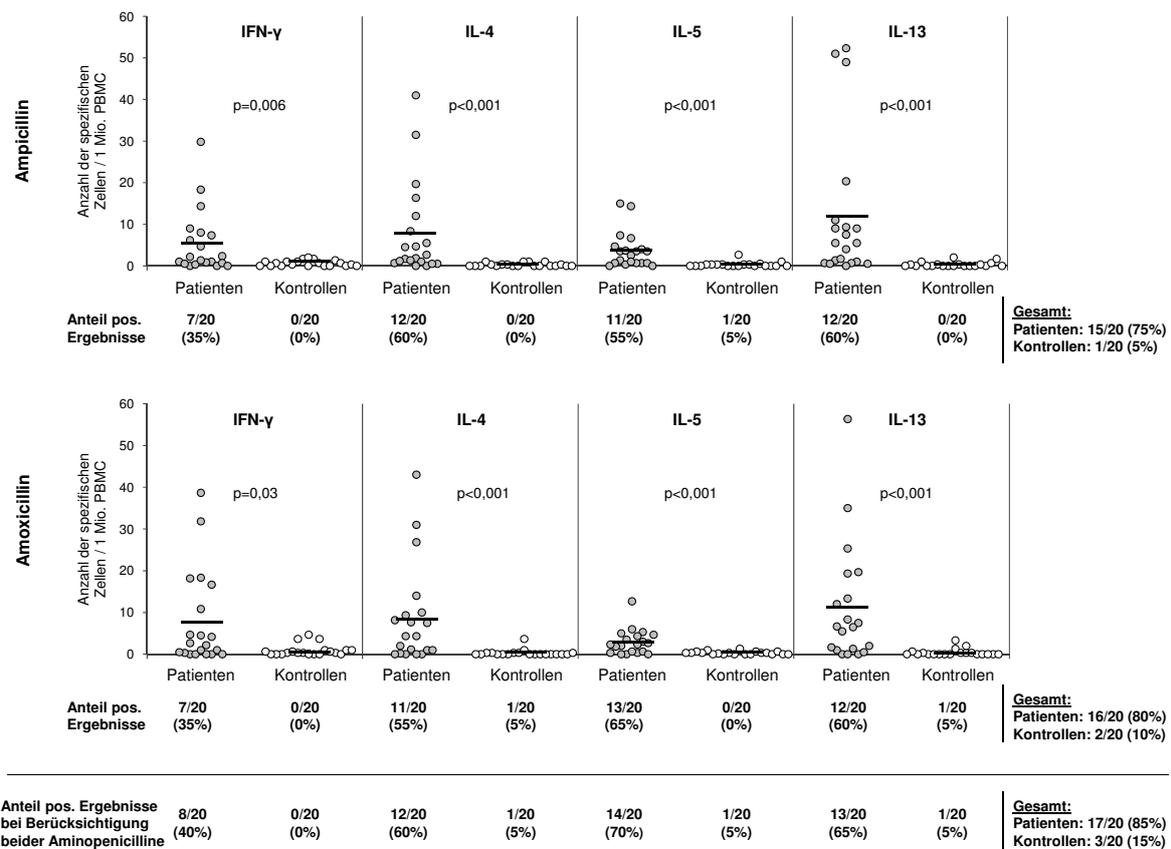


Abbildung 17 Aminopenicillin-spezifische Zytokinfreisetzung. Dargestellt sind die Frequenzen Ampicillin- bzw. Amoxicillin-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten mit Aminopenicillinallergie (n=20) und gesunden Kontrollpersonen (n=20). Der Anteil positiver Ergebnisse ist zudem unter Berücksichtigung beider Aminopenicilline dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung finden sich die positiven Ergebnisse bei Betrachtung aller 4 Zytokine. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit den zugehörigen p-Werten gekennzeichnet.

Bei insgesamt 11 der 20 untersuchten Patienten, von denen 7 ein Aminopenicillin eingenommen hatten und 4 Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin, lag zusätzlich zu der Sensibilisierung gegen Aminopenicilline eine Sensibilisierung gegen Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin vor, die zu positiven Reaktionen in Hauttests geführt hatte (Tabelle 4). Bei 10 dieser Patienten wurde Benzylpenicillin im ELISpot-Assay eingesetzt und es konnten in allen Fällen positive Ergebnisse erzielt werden (Abb. 18). Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren für alle untersuchten Zytokine signifikant (IFN- γ : p=0,004; IL-4, IL-5, IL-13: p<0,001; Mann-Whitney U-Test). Bei den verbleibenden 9 Patienten mit

Aminopenicillinallergie zeigten sich in den Hauttestungen keine Reaktionen auf Benzylpenicillin oder Phenoxymethylpenicillin. Von 5 dieser Patienten wurde Phenoxymethylpenicillin zudem in der oralen Provokationstestung vertragen. Dennoch ergaben sich bei drei der 9 Patienten mit negativem Hauttest, von denen zwei zudem Phenoxymethylpenicillin in der OPT vertragen hatten, positive Reaktionen im ELISpot-Assay nach Stimulation der PBMC mit Benzylpenicillin. Innerhalb der Kontrollgruppe waren in zwei von 19 Fällen positive Ergebnisse auf Benzylpenicillin im ELISpot-Assay nachweisbar (Abb. 18). Im Vergleich zur Anzahl Benzylpenicillin-spezifischer Zellen in der Kontrollgruppe ergaben sich signifikant größere Werte bei den Patienten mit negativem Hauttest für IL-5 und IL-13 ($p=0,025$ bzw. $p=0,014$; Mann-Whitney U-Test). Zwischen der Gruppe von Patienten mit positiven Reaktionen im Hauttest auf Benzylpenicillin und der Gruppe mit negativem Hauttest (Allergie nur gegen Aminopenicilline) ergaben sich signifikante Unterschiede bei IL-4 und IL-13. Die Anzahl spezifischer Zellen war jeweils in der Gruppe mit positivem Hauttest höher (IL-4: $p=0,01$; IL-13: $p=0,002$; Mann-Whitney U-Test).

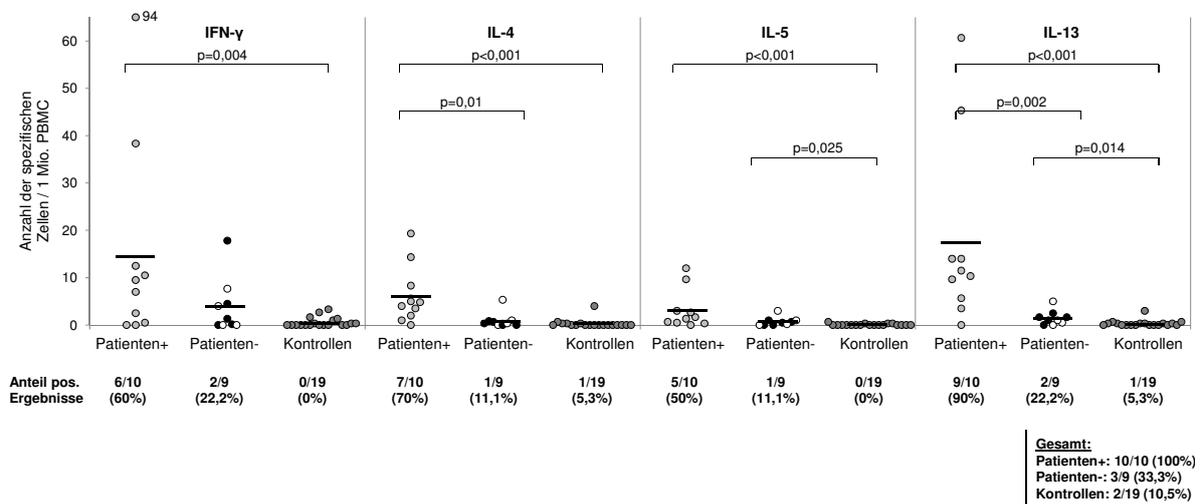


Abbildung 18 Benzylpenicillin-spezifische Zytokinfreisetzung. Dargestellt sind die Frequenzen Benzylpenicillin-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten mit Allergie gegen Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin (Patienten+ ; $n=10$), Patienten mit Aminopenicillinallergie, die in allergologischen Hauttestungen (weiße Punkte) bzw. in Hauttestungen und der oralen Provokationstestung (schwarze Punkte) Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin vertragen hatten (Patienten- ; $n=9$), und gesunden Kontrollpersonen ($n=19$). Im rechten, unteren Teil der Abbildung sind die positiven Ergebnisse bei Betrachtung aller 4 Zytokine dargestellt. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit den zugehörigen p -Werten gekennzeichnet.

Bei allen 20 Patienten waren Hauttestungen mit Cefpodoxim negativ. Von 14 Patienten wurde Cefpodoxim zudem in der oralen Provokationstestung vertragen (Tabelle 4). Bei insgesamt 7 der 20 Patienten, 5 davon mit negativer OPT, lag die Frequenz Zytokin-freisetzender Zellen oberhalb der Cut-off Wertes. Die Zytokinfreisetzung war jedoch gering und umfasste jeweils nur ein Zytokin. Bei zwei der 20 Kontrollpersonen lag die Anzahl allergenspezifischer Zellen bei jeweils einem Zytokin oberhalb des Cut-off Wertes. Die Anzahl Ceftriaxon-spezifischer Zellen war für IL-5 in der Patientengruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe ($p=0,024$; Mann-Whitney U-Test). Bei den anderen Zytokinen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse in der Patienten- und Kontrollgruppe sind in Abbildung 19 dargestellt.

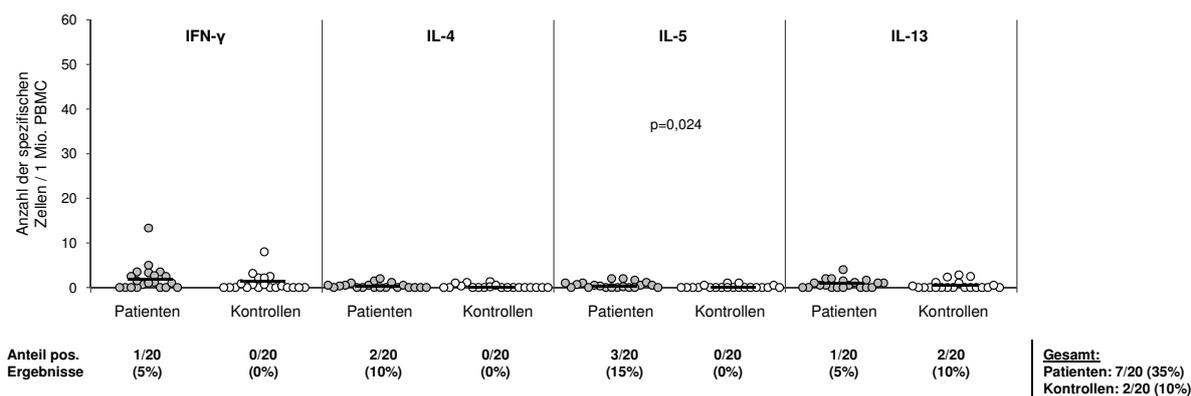


Abbildung 19 Ceftriaxon-spezifische Zytokinfreisetzung. Dargestellt sind die Frequenzen Ceftriaxon-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Patienten, die in allergologischen Testungen Cefpodoxim vertragen hatten (n=20), und gesunden Kontrollpersonen (n=20). Im rechten, unteren Teil der Abbildung sind die positiven Ergebnisse bei Betrachtung aller 4 Zytokine dargestellt. Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit den zugehörigen p-Werten gekennzeichnet.

Zusammengefasst ergab sich an Hand der Daten innerhalb der Kontrollgruppe die in Tabelle 7 jeweils aufgeführte Spezifität für die verschiedenen Betalaktame und Zytokine im ELISpot-Assay. Die jeweilige Sensitivität wurde in Kapitel 4.4.4 aufgeführt, da für die Berechnung nur Ergebnisse bei dem Betalaktam berücksichtigt wurden, das bei den einzelnen Patienten zu einer allergischen Reaktion geführt hatte.

Tabelle 7 Spezifität des ELISpot-Assays für die einzelnen Zytokine und Betalaktam-Antibiotika.

	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13
Ampicillin	100%	100%	95%	100%
Amoxicillin	100%	95%	100%	95%
Benzylpenicillin	100%	94,7%	100%	94,7%
Ceftriaxon	100%	100%	100%	90%

Die Spezifität wurde aus den Ergebnissen der Kontrollpersonen (Ampicillin, Amoxicillin, Ceftriaxon: n=20 ; Benzylpenicillin: n=19) berechnet.

Bei Betrachtung der Zytokinprofile nach Inkubation der PBMC im ELISpot-Assay mit unterschiedlichen Betalaktam-Antibiotika blieben die Zytokinprofile bei den einzelnen Patienten meist annähernd gleich. Oft war die Frequenz spezifischer Zellen bei Stimulation mit kreuzreaktiven Substanzen kleiner als bei Stimulation mit dem verdächtigsten Betalaktam (Abb. 20), gelegentlich auch größer (Abb. 21). Bei anderen Patienten induzierten verschiedene Betalaktame abweichende Zytokinantworten. So war bei CA und RJ die Zytokinproduktion bei Aminopenicillinen annähernd gleichbleibend, während sich bei Benzylpenicillin eine abweichende Verteilung der Zytokine zeigte (Abb. 22). Bei LP, BS, GB und HS war eine geringe Zytokinfreisetzung jeweils nur bei einzelnen der eingesetzten Betalaktame messbar und bei BA, WP und EZ insgesamt gering oder nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

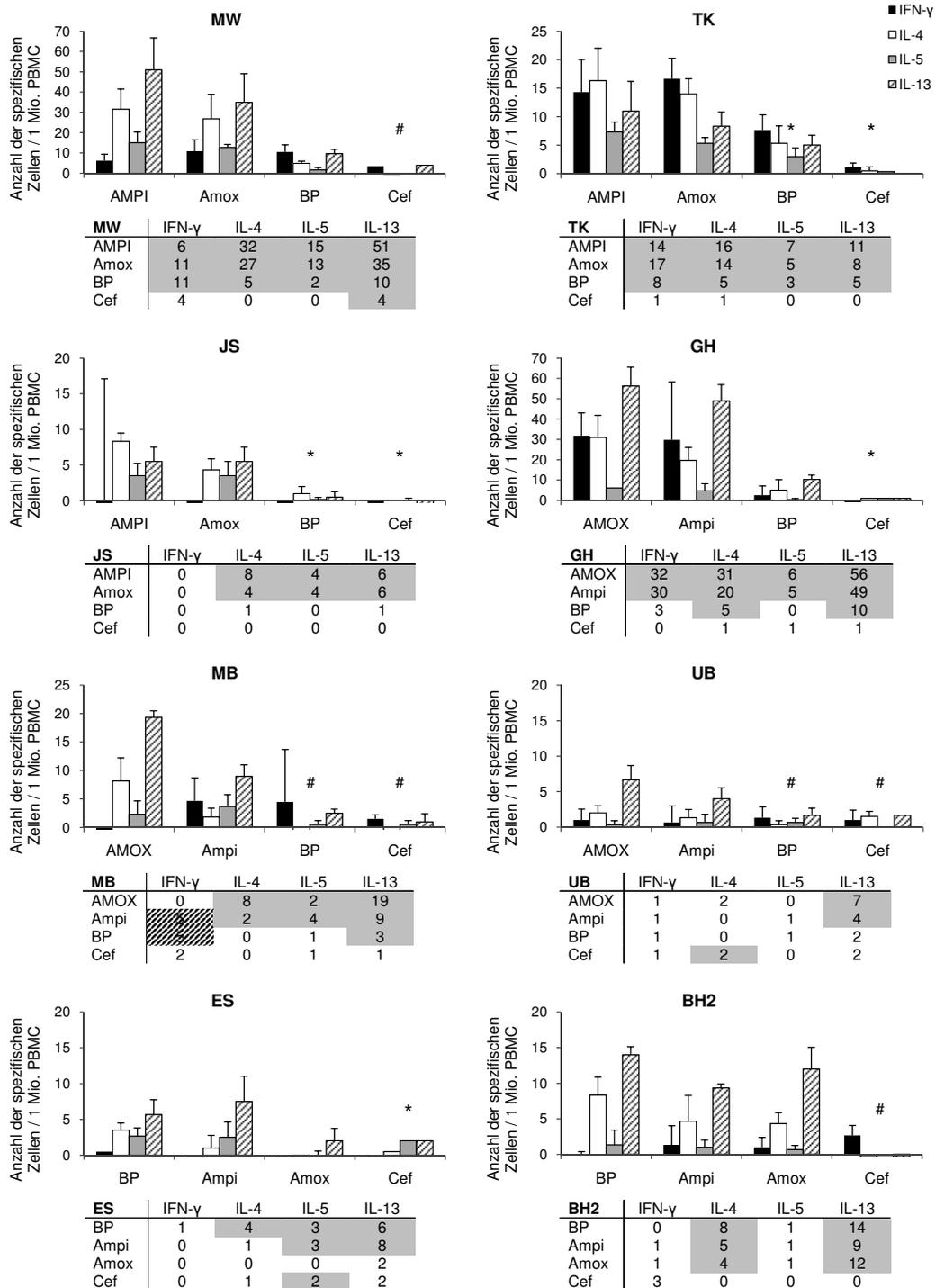


Abbildung 20 Spezifische Zytokinfreisetzung bei Patienten (n=8), bei denen kreuzreaktive Betalaktam-Antibiotika ähnliche Zytokinprofile hervorriefen. Die maximale Anzahl spezifischer Zellen je 10^6 PBMC war mittels ELISpot-Assay bei dem Medikament nachweisbar, das bei den einzelnen Patienten zu dem Arzneimittel-exanthem geführt hatte. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus Dreifachbestimmungen der Frequenz Betalaktam-spezifischer Zellen mit der einfachen Standardabweichung dar. Das Medikament, welches bei dem Patienten die allergische Reaktion ausgelöst hatte, ist groß geschrieben und steht jeweils ganz links in den Diagrammen. Die Sterne (*) markieren Betalaktame, die im Hauttest vertragen wurden. Die Rauten (#) markieren Betalaktame, die sowohl im Hauttest als auch in der oralen Provokationstestung vertragen wurden. In den Tabellen wird die Anzahl spezifischer Zellen aufgeführt, die grau hinterlegte Werte lagen oberhalb des Cut-off Wertes. Bei den schraffierten Zellen war der Stimulationsindex <2 .

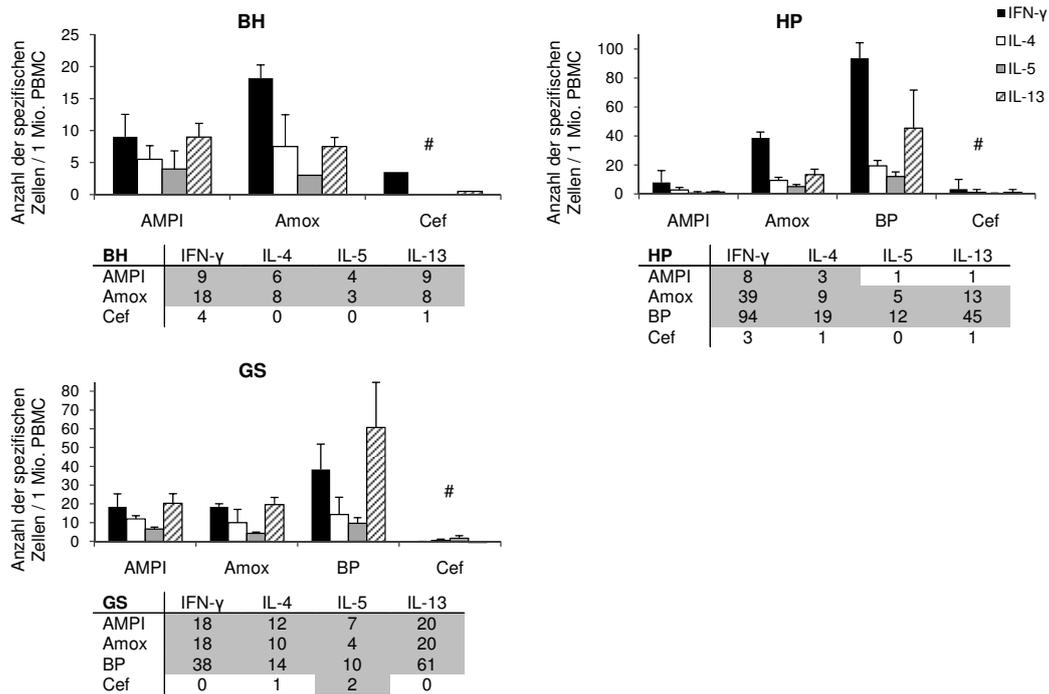


Abbildung 21 Spezifische Zytokinfreisetzung bei Patienten (n=3), bei denen kreuzreaktive Betalaktam-Antibiotika ähnliche Zytokinprofile hervorriefen. Die maximale Anzahl spezifischer Zellen je 10⁶ PBMC war mittels ELISpot-Assay bei kreuzreaktiven Betalaktamen nachweisbar, gegen die im Hauttest eine Sensibilisierung gezeigt werden konnte. Für weitere Erklärungen siehe Abbildung 20.

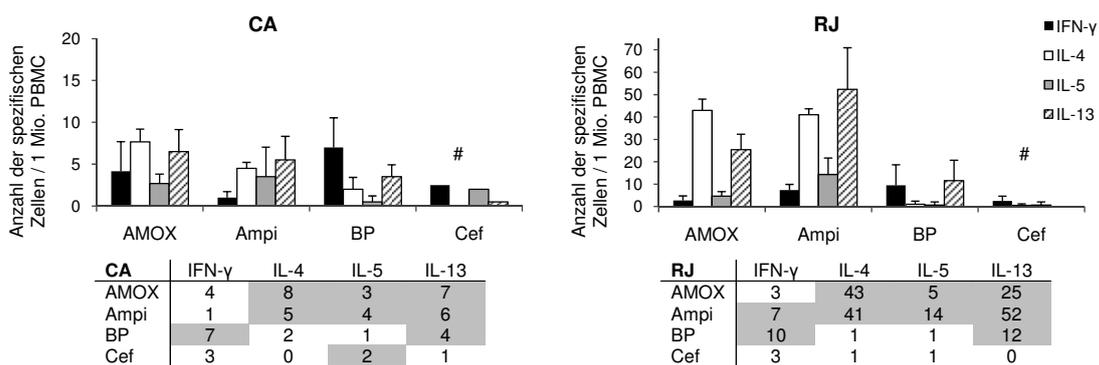


Abbildung 22 Spezifische Zytokinfreisetzung bei Patienten (n=2), bei denen kreuzreaktive Betalaktam-Antibiotika abweichende Zytokinprofile hervorriefen. In beiden Fällen führte eine Inkubation der PBMC mit den Aminopenicillinen Ampicillin und Amoxicillin im ELISpot-Assay zu einer überwiegenden Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13, während Benzylpenicillin eine Produktion von IFN-γ und IL-13 induzierte. Für weitere Erklärungen siehe Abbildung 20.

4.5 Ergebnisse des ELISpot-Assays nach Depletierung CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} Zellen

Um näher zu charakterisieren, welcher Zelltyp im peripheren Blut für die allergenspezifische Zytokinproduktion im ELISpot-Assay verantwortlich ist, wurde Patienten (n=8), bei denen unter Verwendung von PBMC eine hohe Zahl Betalaktam-spezifischer Zellen detektiert werden konnte, und entsprechenden Kontrollpersonen (n=8) nochmals Blut abgenommen und der ELISpot-Assay wiederholt. Zum einen wurden erneut PBMC eingesetzt, da die Zusammensetzung der PBMC und somit auch die Frequenz allergenspezifischer Zellen über die Zeit variieren können. Zum anderen wurden PBMC nach Depletion von CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} Zellen mittels MACS verwendet. Sie werden im Folgenden als CD4^{neg} bzw. CD8^{neg} Zellen bezeichnet. Der IL-5 ELISpot-Assay wurde nur bei drei Patienten durchgeführt, da häufig die Menge der gewonnenen Zellen nicht für die Messung aller Zytokine ausreichend war. Von den 8 Patienten hatten drei ein EEM gehabt, drei ein MPE, eine Patientin ein SJS und ein Patient ein Erythem.

Eine Depletion CD4^{pos} Lymphozyten führte in der Patientengruppe zu einer Verminderung der Anzahl allergenspezifischer Zellen, die im IL-4 ELISpot-Assay (Abb. 23B) mit einer Abnahme der durchschnittlichen Quantität von $13 \pm 11,07$ (Median: 10; Spannweite: 3-29) je 10^6 PBMC auf $1 \pm 1,65$ (1; 0-5) je 10^6 CD4^{neg} Zellen und im IL-13 ELISpot-Assay (Abb. 23D) mit einer Abnahme von $22 \pm 18,85$ (18; 8-66) auf $2 \pm 3,25$ (2; 0-10) signifikant war ($p=0,012$ bzw. $p=0,017$; Wilcoxon Test). Für IFN- γ (Abb. 23A) zeigte sich eine deutliche Reduktion der Frequenz allergenspezifischer Zellen von $11 \pm 14,7$ (6; 0-43) je 10^6 PBMC auf $2 \pm 1,85$ (2; 0-5) je 10^6 CD4^{neg} Zellen und für IL-5 (Abb. 23C) von $6 \pm 5,51$ (6; 1-12) auf $3 \pm 3,69$ (2; 0-7), die in beiden Fällen das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte ($p=0,176$ bzw. $p=0,264$; Wilcoxon Test). Eine Depletion CD8^{pos} Zellen führte zu einer Zunahme oder Konstanz der Anzahl allergenspezifischer Zellen für alle untersuchten Zytokine. Für IL-4 bzw. IL-13 waren die Unterschiede mit einer Zunahme von $13 \pm 11,07$ (10; 3-29) auf $16 \pm 13,24$ (13; 2-42) ($p=0,05$; Wilcoxon Test; Abb. 23B) bzw. von $22 \pm 18,85$ (18; 8-66) auf $32 \pm 26,06$ (26; 8-77) ($p=0,042$; Wilcoxon Test; Abb. 23D) signifikant. Bei den Kontrollpersonen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Quantitäten Betalaktam-spezifischer Zellen bei Einsatz von PBMC, CD4^{neg} bzw. CD8^{neg} Zellen (Friedman-Test und Wilcoxon-Test; Abb. 23 A-D).

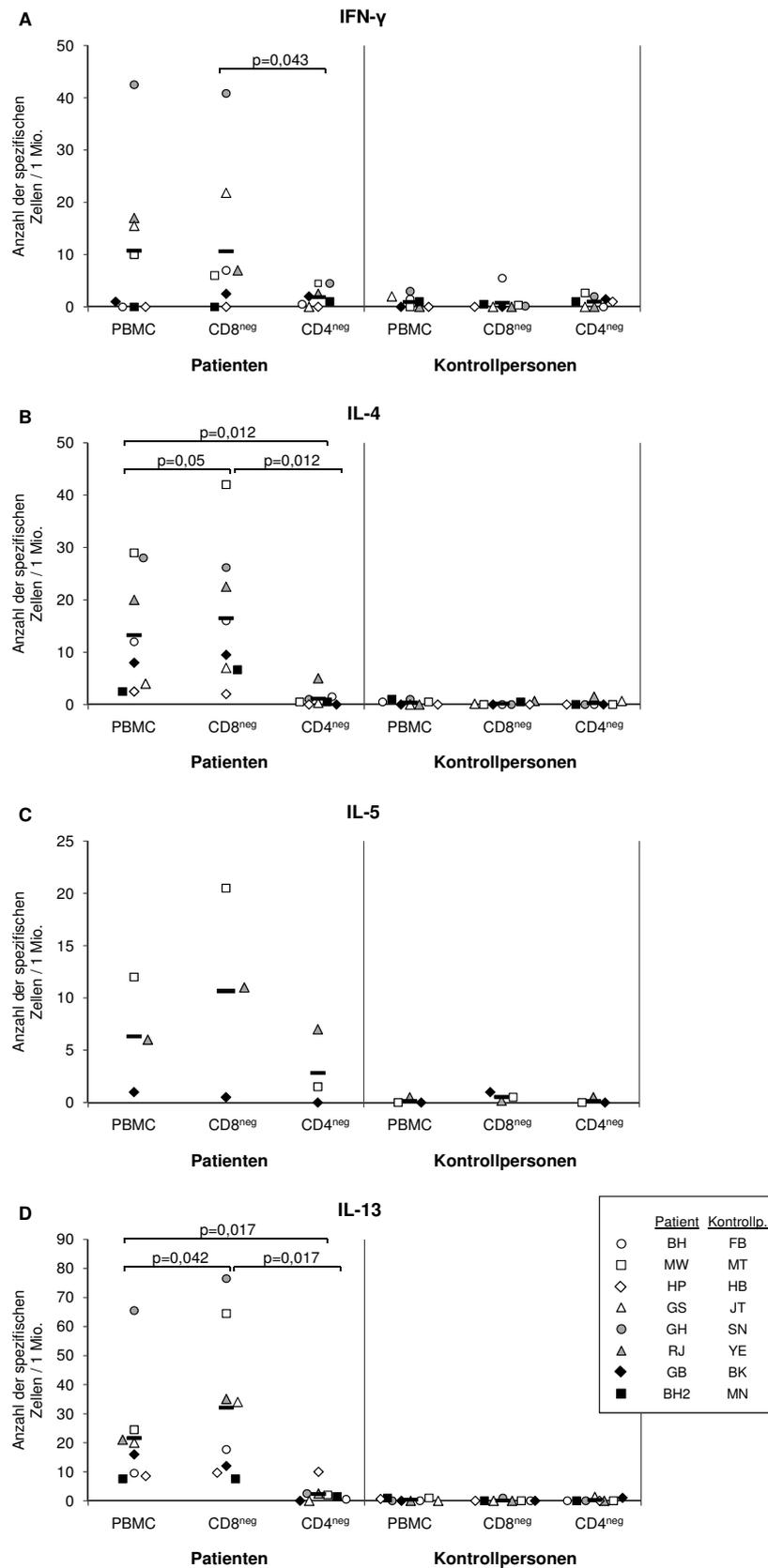


Abbildung 23 A-D Frequenzen allergenspezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Einsatz von PBMC, CD8^{neg} oder CD4^{neg} Zellen. Die Stimulation der Zellen von Patienten und Kontrollpersonen erfolgte über 48 h mit dem Betalaktam, das bei den einzelnen Patienten die allergische Hautreaktion ausgelöst hatte (IFN- γ , IL-4 und IL-13: n = 8; IL-5: n = 3). Die horizontalen Balken entsprechen den Mittelwerten. Signifikante Unterschiede zwischen den Zellfraktionen sind mit den entsprechenden p-Werten gekennzeichnet.

Die Zytokinprofile der 8 untersuchten Patienten sind in Abbildung 24 dargestellt. Es war in allen Fällen, in denen allergenspezifische Zellen im ELISpot-Assay bei Einsatz von PBMC quantifiziert werden konnten, auch eine allergenspezifische Zytokinproduktion aus CD8^{neg} Zellen detektierbar. Die Frequenz allergenspezifischer Zellen lag in der CD4^{neg} Fraktion in den meisten Fällen deutlich unter der Frequenz bei PBMC und CD8^{neg} Zellen und überschritt in keinem Fall 10 je 10⁶ eingesetzten Zellen. Auch bei Stimulation mit kreuzreaktiven Betalaktam-Antibiotika, die zu positiven Reaktionen in den Hauttestungen geführt hatten, waren die Auswirkungen einer Depletierung von CD8^{pos} bzw. CD4^{pos} Zellen auf die nachweisbare Frequenz Zytokin-produzierender Zellen im ELISpot-Assay vergleichbar mit denen bei Einsatz des verdächtigten Betalaktam-Antibiotikums (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine Verminderung CD8^{pos} Zellen führte auch hier zu einer gleichbleibenden oder größeren Frequenz Betalaktam-spezifischer Zellen, während eine Depletion CD4^{pos} Zellen zu einer starken Verminderung Zytokin-freisetzender Zellen führte. Allein bei Patientin HP ergaben sich sowohl bei Einsatz des eingenommenen Penicillins (Ampicillin) als auch kreuzreaktiver Substanzen (Amoxicillin und Benzylpenicillin) eine Anzahl IL-13 freisetzender Zellen, die bei PBMC, CD8^{neg} Zellen und auch CD4^{neg} Zellen vergleichbar war.

Bei den Kontrollpersonen lag die Quantität spezifischer Zellen bei allen getesteten Betalaktamen unterhalb des Cut-off Wertes. Eine Ausnahme bildete Kontrollperson FB, bei der die Anzahl IFN- γ freisetzender Zellen je 10⁶ Zellen mit 6 (Amoxicillin), 7 (Benzylpenicillin) bzw. 6 (Ceftriaxon) bei CD8^{neg} und 3 (Ampicillin) bzw. 4 (Benzylpenicillin) bei PBMC den Cut-off Wert geringfügig überschritt und Kontrollperson MT, bei der die Anzahl spezifischer Zellen im IL-4 ELISpot-Assay bei Stimulation mit Ceftriaxon bei 2 je 10⁶ PBMC lag. Die Ergebnisse der Kontrollpersonen sind im Anhang (XXVI) dargestellt.

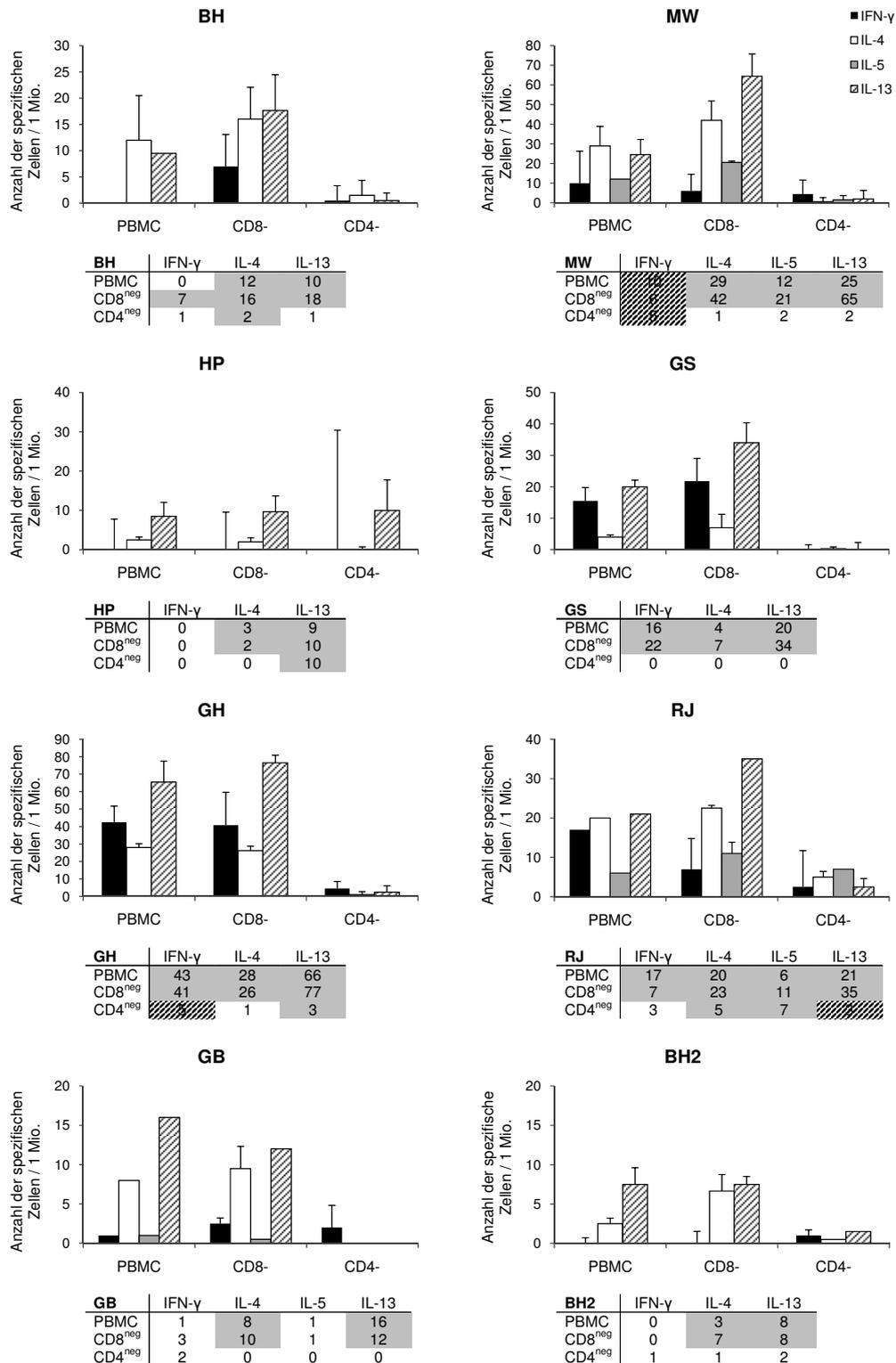


Abbildung 24 Allergenspezifische Zytokinprofile der Patienten (n=8) im ELISpot-Assay bei Einsatz von PBMC, CD8^{neg} oder CD4^{neg} Zellen. Die Stimulation erfolgte über 48 h mit dem Betalaktam, welches bei den einzelnen Patienten die allergische Hautreaktion ausgelöst hatte. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert aus Dreifachbestimmungen der Frequenz allergenspezifischer Zellen mit der einfachen Standardabweichung dar. In den Tabellen ist die Anzahl spezifischer Zellen aufgeführt, die grau hinterlegten Werte lagen oberhalb des Cut-offs. Bei den schraffierten Zellen war der Leerwert zu groß, so dass der Stimulationsindex < 2 war.

4.6 Reproduzierbarkeit

Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung des ELISpot-Assays wurde überprüft, ob die Versuchsergebnisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten reproduziert werden konnten. Es wurden dazu die Daten von 8 Patienten und 7 Kontrollpersonen herangezogen, bei denen ein zweiter ELISpot-Assay mit Einsatz verschiedener Zellfraktionen (PBMC, CD4^{neg} und CD8^{neg}) durchgeführt wurde. Verglichen wurde die Anzahl Betalaktam-spezifischer Zellen je 10⁶ PBMC aus beiden Versuchen. Der zeitliche Abstand zwischen den Versuchen, bei denen jeweils frisch isolierte PBMC verwendet wurden, betrug zwischen einem Monat und 7 Monaten (Mittelwert: drei Monate). Es wurden die qualitativen Ergebnisse, d.h. die an Hand der Cut-off Kriterien als positiv oder negativ gewerteten Ergebnisse, der beiden Versuche auf Übereinstimmung geprüft und die Variationskoeffizienten (=Standardabweichung/Mittelwert) aus der Anzahl Betalaktam-spezifischer Zellen je 10⁶ PBMC beider Versuche berechnet.

Die Frequenz spezifischer Zellen in den beiden ELISpot-Assays nach Stimulation der PBMC der 8 Patienten mit dem verdächtigten Penicillin ist in Abbildung 25 dargestellt. Übereinstimmende positive oder negative Ergebnisse in beiden Versuchen ergaben sich für IFN- γ bei 4 von 8 Patienten, für IL-4 bei allen 8 Patienten, für IL-5 bei 2 von 3 Patienten und für IL-13 bei 7 von 8 Patienten.

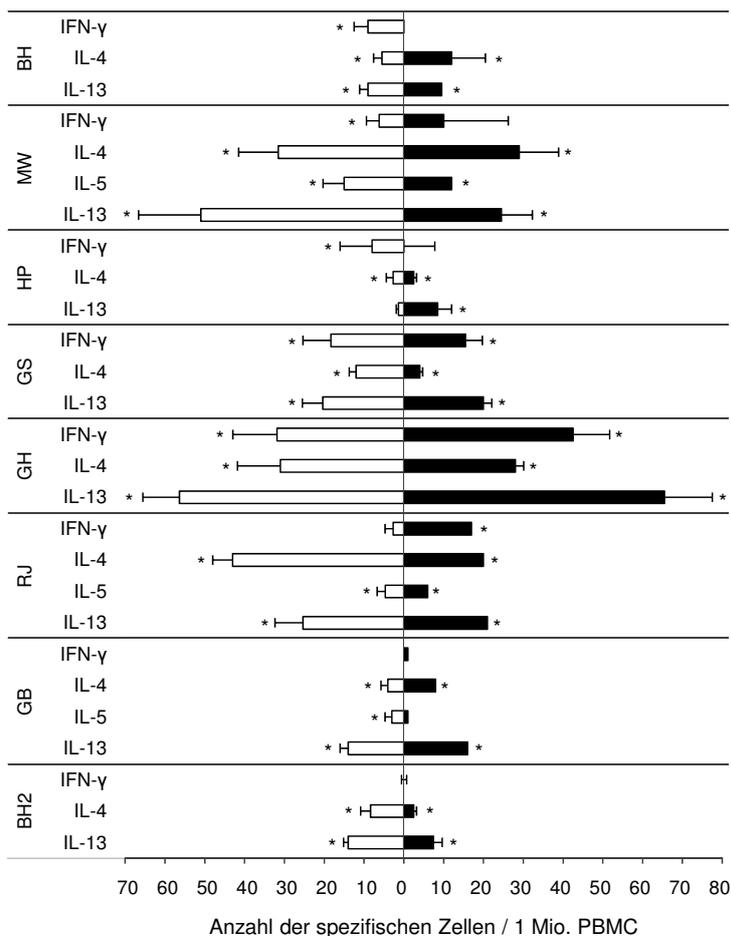


Abbildung 25 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISpot-Assays. Dargestellt sind die Frequenzen allergenspezifischer Zellen nach Stimulation der PBMC von Patienten (n=8) über 48 h mit dem Betalaktam, welches die allergische Hautreaktion ausgelöst hatte, zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Die weißen Balken stellen die Ergebnisse des ersten Versuches dar, die schwarzen Balken die Ergebnisse des zweiten Versuches. Der Abstand zwischen den Versuchen betrug 1 bis 7 Monate. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit der einfachen Standardabweichung. Die Sterne (*) markieren positive Ergebnisse.

Die Reproduzierbarkeit positiver bzw. negativer Ergebnisse in den beiden ELISpot-Assays wurde auch bei Einsatz verschiedener Betalaktam-Antibiotika geprüft (Tabelle 8). Es zeigte sich, dass der Anteil übereinstimmender Ergebnisse innerhalb der Patientengruppe mit 78 Übereinstimmungen bei 97 Einzeltestungen (80,4%) geringer war als innerhalb der Kontrollgruppe, in der bei 77 von 82 Einzeltestungen (93,9%) konkordant negative Ergebnisse und nie konkordant positive Ergebnisse vorlagen. Am schlechtesten war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des IFN-γ ELISpot-Assays in der Patientengruppe mit nur 69% gleichartigen Ergebnissen (Tabelle 8). Insgesamt stimmten die qualitativen Ergebnisse unter den in der vorliegenden Studie definierten Cut-off Kriterien in 155 von 179 durchgeführten Einzeltestungen (86,6%) überein.

Tabelle 8 Übereinstimmungsraten der qualitativen Ergebnisse im ELISpot-Assay.

	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	
Patienten (n=8)					
Ampicillin	5/8	8/8	3/3	6/8	
Amoxicillin	3/7	6/7	2/2	6/7	
Benzylpenicillin	4/6	5/6	1/2	5/6	
Ceftriaxon	8/8	7/8	2/3	7/8	Gesamt
	20/29 (69%)	26/29 (89,7%)	8/10 (80%)	24/29 (82,8%)	78/97 (80,4%)
Kontrollpersonen (n=7)					
Ampicillin	6/7	7/7	3/3	7/7	
Amoxicillin	6/6	6/6	2/2	5/6	
Benzylpenicillin	4/4	3/4	2/2	4/4	
Ceftriaxon	7/7	6/7	3/3	6/7	Gesamt
	23/24 (95,8%)	22/24 (91,7%)	10/10 (100%)	22/24 (91,7%)	77/82 (93,9%)
Gesamt	43/53 (81,1%)	48/53 (90,6%)	18/20 (90%)	46/53 (86,8%)	155/179 (86,6%)

Die Werte entsprechen der Anzahl konkordanter Ergebnisse in den beiden ELISpot-Assays je durchgeführter Einzeltestungen. Der zeitliche Abstand zwischen den beiden Versuchen lag zwischen einem und 7 Monaten.

Die Variationskoeffizienten wurden aus den Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay zu den beiden Versuchszeitpunkten berechnet. Innerhalb der Patientengruppe ergaben sich mittlere Variationskoeffizienten für IFN- γ von 0,78 (Spannweite: 0-1,41; Einzeltestungen: n=29), für IL-4 von 0,61 (0-1,41; n=29), für IL-5 von 0,72 (0-1,41; n=10) und für IL-13 von 0,5 (0-1,41; n=29). In der Kontrollgruppe lag der mittlere Variationskoeffizient für IFN- γ bei 0,93 (0-1,41; n=24), für IL-4 bei 0,79 (0-1,41; n=24), für IL-5 bei 0,74 (0-1,41; n=10) und für IL-13 bei 0,92 (0-1,41; n=24). Dabei schwankten die Variationskoeffizienten je nach Stärke der Zytokinantwort und waren bei starken Zytokinantworten kleiner. Bei Antworten bis durchschnittlich 10 Betalaktam-spezifischen Zellen je 10^6 PBMC lagen die Mittelwerte der Variationskoeffizienten für IFN- γ bei 0,93 (0-1,41; n=45), für IL-4 bei 0,76 (0-1,41; n=45), für IL-5 bei 0,82 (0-1,41; n=17) und für IL-13 bei 0,83 (0-1,41; n=39). Bei Antworten über durchschnittlich 10 Betalaktam-spezifischen Zellen je 10^6 PBMC ergaben sich mittlere Variationskoeffizienten für IFN- γ von 0,38 (0,04-1,06; n=8), für IL-4 von 0,3 (0,04-0,88; n=8), für IL-5 von 0,22 (0,1-0,4; n=3) und für IL-13 von 0,3 (0,01-0,75; n=14).

4.7 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Hautbiopsaten

Bei 4 Patienten (BH, MW, HP, JS) wurde eine Probeexzision aus einer Effloreszenz des Arzneimittellexanths entnommen und mit Hämatoxylin-Eosin bzw. immunhistochemisch gefärbt. Bei BH, MW und HP hatte sich das Arzneimittellexanthem in Form eines EEM manifestiert, bei JS in Form eines MPE. Die histologischen Befunde in den HE-gefärbten Schnitten waren bei allen Patienten vereinbar mit der klinisch gestellten Diagnose, bei Patientin MW bereits im postinflammatorischen Zustand. Die Entzündungsinfiltrate bestanden vor allem aus Lymphozyten, die überwiegend

perivaskulär in der oberen Dermis gelegen waren. Die Stärke des Entzündungsinfiltrates bei den einzelnen Patienten ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9 Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen.

Patient	Infiltrat	CD3	CD4	CD8	CD20	CD56	CD79a
BH	+++	90%	80%	10-15%	0%	0%	0%
MW	+	80%	60-70%	10%	0%	0%	0%
HP	++	85-90%	50-60%	5%	0%	0%	0%
JS	++	90%	90%	<5%	0%	0%	0%

Die Prozentzahlen geben den Anteil positiver Zellen am Gesamtinfiltrat an. -, negativ ; +, schwach positiv ; ++, positiv ; +++, stark positiv.

In den immunhistochemischen Färbungen waren bei BH, MW und HP vor allem CD3^{pos} und CD4^{pos} Zellen erkennbar, die quantitativ deutlich gegenüber CD8^{pos} Zellen überwogen. Auch bei JS fanden sich reichlich CD3^{pos} und CD4^{pos} Zellen, jedoch fast keine CD8^{pos} Zellen. CD20^{pos}, CD56^{pos} oder CD79a^{pos} Zellen waren bei keinem der Patienten nachweisbar (Tabelle 9). Repräsentative Fotos der HE-Färbung sowie der immunhistochemischen Färbungen von CD3^{pos}, CD4^{pos} und CD8^{pos} Zellen sind in Abbildung 26 dargestellt.

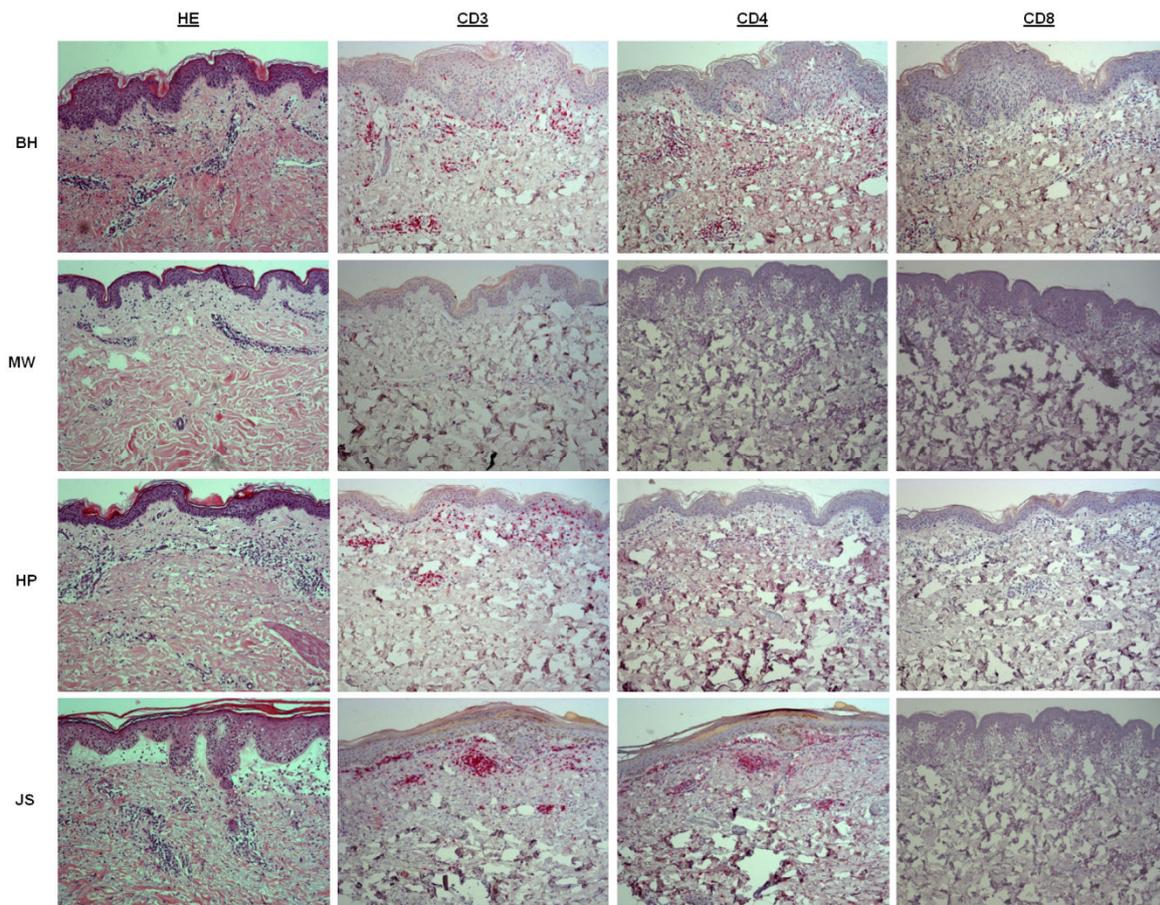


Abbildung 26 Histologische Schnittpräparate von 4 Patienten. Die Hautbiopsate wurden zum Zeitpunkt des Arzneimittellexanths entnommen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) bzw. Farbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD4 oder CD8 gefärbt.

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Patienten und Kontrollpersonen

In der vorliegenden Studie wurde die Frequenz Betalaktam-spezifischer Zellen im Blut von Patienten mit Penicillinallergie während klinischer Remission gemessen und mit der von Kontrollpersonen verglichen. Die Auswahl der 20 Patienten erfolgte unter Berücksichtigung der Anamnese sowie der Ergebnisse der bereits abgeschlossenen allergologischen Diagnostik. Alle hatten im zeitlichen Zusammenhang mit der Einnahme eines Betalaktam-Antibiotikums eine Arzneimittelreaktion an der Haut entwickelt, die klinisch gut zu einer Spättypallergie passte. Die Allergie war durch positive Hauttests mit dem verdächtigten Penicillin bestätigt worden. Obwohl über geringe Sensitivität der Hauttests berichtet wurde (Terrados et al., 1995; Padial et al., 2008; Blanca-Lopez et al., 2009), stellen sie doch eine bewährte Methode in der Diagnostik von Spättypallergien gegen Betalaktame dar (Romano et al., 2004; Przybilla et al., 2008). Der positive prädiktive Wert wird mit über 80% angegeben (Romano et al., 1995; Lammintausta und Kortekangas-Savolainen, 2005), so dass das Vorliegen einer klinisch relevanten Sensibilisierung bei den ausgewählten Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann. Der „Goldstandard“ in der Diagnostik von Arzneimittelallergien, nämlich die Provokation mit dem verdächtigten Arzneimittel, wurde aus ethischen Gründen nicht durchgeführt (Aberer et al., 2003; Przybilla et al., 2008). Da in die vorliegende Studie nur Patienten eingeschlossen wurden, die in zuvor durchgeführten Hauttests auf das verdächtige Penicillin reagiert hatten, ist kein Vergleich der diagnostischen Wertigkeit von ELISpot-Assay und Hauttestungen möglich. Insbesondere dieser Vergleich wäre jedoch wichtig, da Hauttests derzeit das Standardverfahren zur Diagnostik einer Spättypallergie darstellen. Zur Untersuchung dieser Frage ist ein anderes Studiendesign mit Auswahl der Patienten ausschließlich an Hand anamnestischer und klinischer Kriterien oder im besten Fall an Hand einer positiven Provokationstestung erforderlich. Für erste Einblicke im Rahmen dieser Studie wäre es jedoch interessant gewesen, auch Patienten einzubeziehen, die trotz negativer Hauttests in der anschließend durchgeführten Provokationstestung auf das verdächtige Arzneimittel reagiert haben, um in diesen Fällen die Aussagekraft des ELISpot-Assays zu prüfen.

Als Kontrollgruppe wurden 21 Probanden ausgewählt, die angaben, Penicilline zuvor eingenommen und gut vertragen zu haben. Hauttestungen mit Betalaktam-Antibiotika wurden angesichts des Risikos einer iatrogenen Sensibilisierung nicht durchgeführt (Nugent et al., 2003). Alternativ wäre es möglich gewesen, Kontrollpersonen einzubeziehen, die nie zuvor Betalaktam-Antibiotika eingenommen hatten und entsprechend weniger wahrscheinlich eine klinisch nicht relevante Sensibilisierung aufweisen. Da der ELISpot-Assay jedoch möglichst realitätsnah getestet werden sollte und sich Probanden ohnehin

nur schlecht an in der Kindheit eingenommene Präparate erinnern können (Wyatt, 1996), wurde erstere Variante gewählt.

Patientengruppe und Kontrollgruppe unterschieden sich nicht signifikant bezüglich Alter und Atopie-Score. Das Geschlechterverhältnis innerhalb der Patientengruppe (14 weiblich und 6 männlich) wich nur wenig von dem Geschlechterverhältnis innerhalb der Kontrollgruppe (13 weiblich und 8 männlich) ab. Die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen war somit gegeben.

5.1.2 ELISpot-Assay

Für einen *in vitro* Nachweis spezifischer T-Lymphozyten bei Patienten mit Spättypallergien gegen Arzneimittel stehen diverse Testverfahren zur Verfügung. Unter anderem kann die Zytokinfreisetzung nach Inkubation von PBMC mit dem Allergen gemessen werden. Diese tritt bereits sehr früh nach der Allergenstimulation auf und ist bei zahlreichen klinischen Manifestationen einer Spättypallergie gegen Arzneimittel beteiligt (Rodilla et al., 2010). Gemessen werden kann sie unter anderem mittels Durchflusszytometrie, RT-PCR, ELISA oder ELISpot-Assay (Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011). Für die vorliegende Arbeit wurde der ELISpot-Assay ausgewählt, da er zumindest aus theoretischer Sicht Vorteile gegenüber den anderen Methoden aufweist. So werden Zytokine im ELISpot-Assay direkt nach ihrer Freisetzung durch Bindung an membranfixierte Antikörper immobilisiert und es kommt nicht, wie beispielsweise im ELISA, zu einer Verdünnung im Kulturmedium oder einem Verbrauch durch Bindung an Rezeptoren anderer Immunzellen, wie insbesondere für IL-4 beschrieben (Bullens et al., 1998; Ewen und Baca-Estrada, 2001). Gegenüber der Durchflusszytometrie und RT-PCR besteht der Vorteil, dass die im ELISpot-Assay nachgewiesenen Zytokine tatsächlich freigesetzt und über den gesamten Inkubationszeitraum hinweg gebunden werden. Der ELISpot-Assay weist von den genannten Zytokinassays zum Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten die höchste Sensitivität auf. Diese Beobachtung konnte bei Bestimmung von IFN- γ (Helms et al., 2000; Karlsson et al., 2003; Tassignon et al., 2005), aber auch bei Messung von IL-4 (Ekerfelt et al., 2002; Minang et al., 2008) oder IL-5 (Helms et al., 2000; Minang et al., 2008) bestätigt werden. Die minimale Frequenz, bis zu der ein präziser Nachweis reaktiver Zellen im ELISpot-Assay möglich ist, wird zwischen einer je 300.000 (Helms et al., 2000) und einer je 1.000.000 Zellen (Janetzki et al., 2004) angegeben.

In Vorversuchen unter Einsatz von PBMC nickelallergischer Patienten wurde der ELISpot-Assay für die Quantifizierung allergenspezifischer T-Zellen optimiert. Im Vordergrund stand die Untersuchung des Einflusses der verwendeten Antikörperkonzentration, der eingesetzten Zellzahl, der Inkubationszeit, der Art der Färbung und der Nutzung verschiedener ELISpot-Platten. Als eindrucksvollstes Resultat zeigte sich, dass die Nachweisbarkeit Zytokin-freisetzender Zellen im ELISpot-Assays stark von dem verwendeten Plattentyp abhing. Besonders auffällig waren die Ergebnisse bei den Typ 2 Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13, deren Sekretion bei Einsatz von Platten mit PVDF-Membran deutlich besser messbar war als bei Einsatz von Platten mit Nitrozellulosemembran. Es wurden keine Veröffentlichungen gefunden, in denen diese Beobachtung zuvor beschrieben worden ist. Eine Untersuchung weiterer methodischer Einflussfaktoren, wie dem verwendeten Serum

(autologes Serum vs. gepooltes AB-Plasma) oder einer Kryokonservierung der PBMC, sollte unternommen werden, um die Versuchsbedingungen weiter zu optimieren und zu standardisieren.

5.1.3 Cut-off Kriterien

Die Festlegung eines Cut-off Wertes ist für einen *in vitro* Test von großer Bedeutung, da nur so zwischen positiven und negativen Testergebnissen unterschieden werden kann. Bislang existiert kein allgemein anerkanntes Verfahren für die Berechnung von Cut-off Werten für den ELISpot-Assay.

Es wurden zwei Cut-off Kriterien definiert. Zum einen musste die Anzahl der Betalaktam-spezifischen Zellen je 10^6 PBMC einen Grenzwert überschreiten, der aus dem Mittelwert nach Addition der zweifachen Standardabweichung der Anzahl Betalaktam-spezifischer Zellen je 10^6 PBMC von 20 Kontrollpersonen berechnet wurde. Es ergaben sich Werte zwischen ≥ 2 und ≥ 6 spezifischen Zellen je 10^6 PBMC für die einzelnen Zytokine und Betalaktame. Zum anderen galt, dass der Stimulationsindex (SI) ≥ 2 betragen musste. Es sollte so verhindert werden, dass bei Probanden, deren PBMC eine hohe spontane Zytokinfreisetzung aufwiesen, geringe Unterschiede in der Anzahl reaktiver Zellen als positiv gewertet wurden, da sie am ehesten durch eine natürliche Streuung der Messwerte verursacht sind.

Es stehen verschiedene andere Verfahren für die Festlegung von Cut-off Werten zur Verfügung. Einige Methoden sollen kurz mit Bezug auf die vorliegende Arbeit diskutiert werden, um die Entscheidungsfindung für das genutzte Verfahren zu verdeutlichen. Bei einer ROC-Kurven Analyse wird der Cut-off Wert durch Optimierung von Sensitivität und Spezifität festgesetzt (Zweig und Campbell, 1993; Perkins und Schisterman, 2006; Akobeng, 2007). Sie wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Definition des Cut-off Wertes in der *in vitro* Allergiediagnostik zur Abklärung von Arzneimittel-exanthenen verwendet (Khalil et al., 2008; Martin et al., 2010). Für die vorliegende Studie wurde die ROC-Kurven Analyse als problematisch angesehen, da PBMC von vielen Patienten nur einzelne der 4 untersuchten Zytokine sezernierten, so dass bei Betrachtung von jedem Zytokin Patienten vorhanden waren, bei denen gar keine allergenspezifischen Zellen detektiert werden konnten. Beispielsweise waren bei 6 von 20 Patienten im IFN- γ ELISpot-Assay keine Betalaktam-spezifischen Zellen nachweisbar. Die maximal mögliche Sensitivität lag somit bei einem Cut-off Wert > 0 spezifischen Zellen je 10^6 PBMC bei 70%. Gleichzeitig lag die Frequenz Betalaktam-spezifischer Zellen bei der Mehrzahl der Kontrollpersonen bei 0 oder 1 je 10^6 PBMC, so dass bereits sehr niedrige Cut-off Werte zu einer hohen Spezifität führten. Da bei der ROC-Kurven Analyse Sensitivität und Spezifität in der Regel gleich stark gewichtet werden, hätten sich zum Teil Cut-off Werte von weniger als einer spezifischen Zelle je 10^6 PBMC ergeben. Im Hinblick auf das Detektionslimit des ELISpot-Assays sind so niedrige Cut-off Werte jedoch nicht möglich. Insgesamt scheint die ROC-Kurven Analyse für etablierte Testverfahren gut geeignet zu sein. Für neuere *in vitro* Tests, die methodisch sehr aufwändig sind, so dass meist nur kleine Patientengruppen untersucht werden, und über deren Sensitivität zunächst wenig bekannt ist, scheinen andere Methoden besser geeignet zu sein. Diese Verfahren basieren auf der Berechnung des Cut-off Wertes aus Daten innerhalb der Kontrollgruppe oder Patientengruppe. Die Berechnung kann aus den absoluten Differenzen zwischen den Frequenzen spezifischer Zellen zu zwei definierten Zeitpunkten vorgenommen werden, wobei der Cut-

off Wert dem Mittelwert der Messwerte nach Addition der zweifachen Standardabweichung entspricht (Lewis et al., 2000; Tassignon et al., 2005). Desweiteren kann er - wie in der vorliegenden Studie - aus dem Mittelwert nach Addition der zweifachen oder dreifachen Standardabweichung der Ergebnisse von Kontrollpersonen berechnet werden. Dieses Verfahren wurde häufig für den ELISpot-Assay bei Patienten mit Spättypallergien gegen Arzneimittel (Rozieres et al., 2009; Zawodniak et al., 2010) oder Kontaktallergene (Minang et al., 2005; Minang et al., 2008) eingesetzt. Für zelluläre *in vitro* Tests scheinen diese Methoden besser geeignet zu sein als die ROC-Kurven Analyse, da der Cut-off Wert nicht von der resultierenden Sensitivität, sondern vielmehr von den methodischen Eigenschaften des eingesetzten *in vitro* Testverfahrens beeinflusst wird. So wird beispielsweise bei einem Test, bei dem die Ergebnisse zwischen Kontrollpersonen oder zwischen Testwiederholungen stark schwanken, der Cut-off Wert höher ausfallen, als bei einem Test, der zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Der Stimulationsindex (SI) stellt eine weitere Möglichkeit dar und wird beispielweise zur Definition positiver Ergebnisse im LTT eingesetzt. Ein SI zwischen 2 und 3 gilt dabei in der Regel als Cut-off (Nyfeler und Pichler, 1997; Schnyder und Pichler, 2000; Hari et al., 2001; Luque et al., 2001; Sachs et al., 2002; Rozieres et al., 2009). Auch für die Erkennung positiver Ergebnisse im ELISpot-Assay kann der SI eingesetzt werden, entweder als einziges Kriterium (Bordignon et al., 2008; Minang et al., 2008) oder in Kombination mit einer Mindestanzahl antigenspezifischer Zellen (Minang et al., 2005; Minang et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich Cut-off Werte für die einzelnen Zytokine und Betalaktam-Antibiotika, die mit Werten zwischen ≥ 2 und ≥ 6 spezifischen Zellen je 10^6 PBMC sehr niedrig waren. In zwei Studien anderer Arbeitsgruppen (Rozieres et al., 2009; Zawodniak et al., 2010), in denen der ELISpot-Assay bei Patienten mit Spättypallergien gegen Arzneimittel eingesetzt wurde, erfolgte die Berechnung des Cut-off Wertes wie in der vorliegenden Arbeit. Bei Zawodniak et al. (2010) lag der Cut-off Wert für den Granzym B ELISpot-Assay mit >6 Arzneimittel-spezifischen Zellen je 8×10^5 PBMC etwas höher. Von Rozieres et al. (2009) wurde er für den IFN- γ ELISpot-Assay mit >30 Amoxicillin-spezifischen Zellen je 10^6 PBMC deutlich höher angesetzt. Die höhere Frequenz reaktiver Zellen war am ehesten durch Unterschiede in der Durchführung des Assays bedingt. So könnte bei Zawodniak et al. (2010) die längere Inkubationszeit von 72 h im ELISpot-Assay ein wichtiger Einflussfaktor gewesen sein. Bei Rozieres et al. (2009) spielte möglicherweise die Verwendung unsteriler ELISpot-Platten und die Durchführung der Hauttests einige Tage vor der Blutentnahme eine Rolle (siehe auch Kapitel 5.2.1). Insgesamt ist es bei Testverfahren für den Nachweis von Arzneimittelallergien sinnvoll, niedrige Cut-off Werte festzusetzen, die gleichzeitig mit hoher Sensitivität einhergehen, da die Wiedereinnahme eines Arzneimittels aufgrund eines falsch negativen Testergebnisses potentiell lebensbedrohliche allergische Reaktionen auslösen kann.

5.1.4 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISpot-Assays

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISpot-Assays zu prüfen, wurde bei 8 Patienten mit Penicillinallergie und 7 Kontrollpersonen durchschnittlich drei Monate nach dem ersten Versuch ein zweiter ELISpot-Assay mit frisch isolierten PBMC durchgeführt. Die nachgewiesenen Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen zu beiden Zeitpunkten wurden verglichen und die

Variationskoeffizienten berechnet. Diese bewegten sich zwischen 0% und 141% und waren mit Mittelwerten zwischen 50% und 78% für die einzelnen Zytokine in der Patientengruppe und zwischen 74% und 93% in der Kontrollgruppe sehr groß. Die niedrigeren Werte in der Patientengruppe kamen vermutlich dadurch zustande, dass die Variationskoeffizienten in Abhängigkeit von der Stärke der allergenspezifischen Zytokinantwort schwankten. Sie waren bei Antworten bis durchschnittlich 10 Betalaktam-spezifischen Zellen größer als bei Antworten über 10 spezifischen Zellen je 10^6 PBMC. Es wurde auch evaluiert, wie gut sich positive bzw. negative Ergebnisse aus dem ersten Versuch im zweiten reproduzieren ließen. Bei Patienten war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Messung von IFN- γ mit 69% konkordanten Ergebnissen schlechter als bei Bestimmung von IL-4, IL-5 oder IL-13 mit Übereinstimmungsraten zwischen 80% und 90%. Als mögliche Ursachen kommen die höheren und stärker schwankenden Leerwerte im IFN- γ ELISpot-Assay in Betracht, die durch *in vivo* ablaufende Immunreaktionen bedingt sein könnten und dazu führten, dass schwache Zytokinantworten nicht sicher detektiert werden konnten. Zudem ergaben sich bei der Auswertung von IFN- γ ELISpot-Platten am Lesesystem möglicherweise stärkere Abweichungen bei der Definition „echter Spots“, da IFN- γ Spots im Vergleich zu Typ 2 Zytokin Spots sehr inhomogen waren. In der Kontrollgruppe waren die Übereinstimmungsraten mit Werten zwischen 92% und 100% für IFN- γ , IL-4, IL-5 und IL-13 vergleichbar und für alle Zytokine größer als in der Patientengruppe. Eine mögliche Ursache ist, dass negative Ergebnisse durch hohe Leerwerte weniger verfälscht werden. Obwohl die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im ELISpot-Assay mit einer Konkordanzrate von 87% bei 179 Einzeltestungen insgesamt unbefriedigend war, führte eine Stimulation der PBMC mit dem verdächtigsten Penicillin dennoch bei allen Patienten zu positiven Ergebnissen in beiden IL-4 ELISpot-Assays, bei vielen auch in beiden IL-5 und IL-13 ELISpot-Assays. In der Kontrollgruppe waren 94% aller Testergebnisse in beiden Assays negativ. Der diagnostische Wert für den Nachweis einer Sensibilisierung gegen das Betalaktam-Antibiotikum, welches das Arzneimittellexanthem ausgelöst hatte, und für den Ausschluss einer klinisch relevanten Sensibilisierung bei exponierten Kontrollpersonen schien demnach gut zu sein. Abweichende Ergebnisse in den beiden Versuchen lagen einerseits bei Testung von Betalaktamen, gegen die möglicherweise Kreuzsensibilisierungen vorlagen, und andererseits im IFN- γ ELISpot-Assay vor. Die Reproduzierbarkeit wurde bei Patienten untersucht, bei denen bereits eine relativ hohe Anzahl Betalaktam-spezifischer Zellen im ersten Versuch detektiert werden konnte. Interessant wäre es jedoch auch, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Patienten zu untersuchen, bei denen die Frequenz spezifischer Zellen gerade noch die Cut-off Kriterien erfüllte. Ein weiterer unberücksichtigter Einflussfaktor war die Tatsache, dass der Versuchsablauf nicht einheitlich war, da beim zweiten Versuch die Gesamtdauer durch die parallel durchgeführte Zelldepletierung mittels MACS länger war.

An Hand der vorliegenden Daten konnte nicht beantwortet werden, wodurch die unterschiedlichen Frequenzen spezifischer Zellen zu den beiden Zeitpunkten bedingt waren. Zur Klärung könnte es hilfreich sein, die verwendeten PBMC durchflusszytometrisch zu analysieren, Infektionsparameter, wie CRP oder Leukozytenzahl, bei den Probanden zu bestimmen und methodische Einflussfaktoren, z.B. unterschiedliche Lagerungszeiten und Umgebungstemperaturen der Blutproben oder die Qualität des zugesetzten Serums, gezielt zu untersuchen. Interessant wäre es auch, die Reproduzierbarkeit zu testen, wenn PBMC aus einer Blutentnahme mehrfach analysiert werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen

Die Frequenzen Betalaktam-spezifische Zellen im ELISpot-Assay waren in der Patientengruppe mit mittlerer Anzahl von 6 je 10^6 PBMC für IFN- γ , 9 für IL-4, 3 für IL-5 und 12 für IL-13 signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Vergleichbare Frequenzen spezifischer Zellen ergaben sich in einer Studie von Beeler et al. (2006), in der PBMC von 5 Patienten mit Spättypallergien gegen verschiedene Arzneimittel im IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-13 ELISpot-Assay untersucht wurden. Da in der zitierten Studie die Zusammensetzung der PBMC durchflusszytometrisch analysiert wurde, konnte die Frequenz der Arzneimittel-spezifischen T-Lymphozyten an der gesamten T-Zell-Population berechnet werden. Sie lag mit etwa einer je 2500 bis 10000 T-Lymphozyten sogar über der Frequenz Tetanus Toxoid-spezifischer T-Lymphozyten bei immunisierten Individuen. In zwei weiteren Studien (Khalil et al., 2008; Rozieres et al., 2009) wurde die Anzahl Amoxicillin-spezifischer Zellen im IFN- γ ELISpot-Assay bestimmt. Rozieres et al. (2009) untersuchten PBMC von 22 Patienten, die ein MPE gehabt hatten, und 20 Kontrollpersonen. Die Frequenzen waren sowohl in der Patientengruppe mit einem Mittelwert von 59 Amoxicillin-spezifischen Zellen je 10^6 PBMC als auch in der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von etwa 20 Amoxicillin-spezifischen Zellen deutlich höher als in der vorliegenden Studie. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Blutentnahme zur Gewinnung der PBMC direkt nach Ablesung der Hauttests erfolgte. Theoretisch kann so eine Vorstimulation und Proliferation der allergenspezifischen T-Lymphozyten bereits *in vivo* stattgefunden haben. Weiterhin kann der Allergenkontakt zu einer vermehrten Zirkulation allergenspezifischer T-Lymphozyten im peripheren Blut geführt haben. Auch methodische Unterschiede können verantwortlich sein. So wurden - vorausgesetzt, die angegebene Katalognummer ist korrekt - unsterile ELISpot-Platten verwendet, die eine bessere Kostimulation ermöglichen könnten. Außerdem wurde dem Kulturmedium an Stelle des in der vorliegenden Arbeit genutzten hitzeinaktivierten humanem AB-Plasmas (Sigma) hitzeinaktiviertes autologes Serum zugesetzt, welches unter Umständen für die PBMC der einzelnen Patienten optimalere Stimulationsbedingungen schaffte (Nyfeler und Pichler, 1997). Von Khalil et al. (2008) konnten nur sehr vereinzelte Betalaktam-spezifische T-Zellen im IFN- γ ELISpot-Assays bei Einsatz der PBMC von 12 Patienten mit Spättypallergie gegen Amoxicillin nachgewiesen werden. Die Verwendung von fetalem Kälberserum als Zusatz zum Kulturmedium könnte zu den schlechteren Ergebnissen geführt haben. Und obwohl ELISpot-Platten mit PVDF-Membran verwendet wurden, wurde nicht erwähnt, dass die Membranen der Wells vor Beschichtung mit dem ersten Antikörper mit Ethanol vorbehandelt wurden. Fehlende Vorbehandlung zur Überwindung der Hydrophobizität führt jedoch zu einer schlechteren Anfärbung der Spots (Weiss, 2005). Auch beim Einlesen der ELISpot-Platten kann es in den verschiedenen Studien trotz Nutzung automatisierter Lesegeräte zu durch den Untersucher bedingten Unterschieden kommen (Janetzki et al., 2004).

Betalaktam-spezifische Zellen im Blut der Patienten konnten in der vorliegenden Studie auch Jahrzehnte nach Auftreten des Arzneimittelexanthems nachgewiesen werden, obgleich die Patienten in der Zwischenzeit keine Penicilline eingenommen hatten. Kontakt mit Betalaktamen hatte dennoch während der Hauttestungen stattgefunden, die zwischen 2005 und 2009 durchgeführt wurden. Auch

von anderen Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass Arzneimittel-spezifische T-Lymphozyten viele Jahre nach dem letzten Kontakt im Blut von Patienten mit Spättypallergie detektiert werden können (Beeler et al., 2006; Rozieres et al., 2009). Es wird angenommen, dass die Persistenz über viele Jahre durch eine Kreuzreaktivität der Arzneimittel-spezifischen T-Lymphozyten mit anderen Antigenen oder körpereigenen Peptiden erreicht wird (Beeler et al., 2008; Lochmatter et al., 2009b). So zeigen etwa 30% der Arzneimittel-spezifischen T-Zell Klone eine Kreuzreaktivität mit allogenen MHC-Peptid-Komplexen (von Greyerz et al., 2001). Die physiologische Funktion der T-Gedächtniszellen ist die Vermittlung einer lang anhaltenden Immunität zum Schutz des Organismus vor Infektionen und anderen schädigenden Substanzen. So ermöglichen die persistierenden T-Gedächtniszellen in der Immunabwehr gegen Pathogene eine raschere und effektivere Immunantwort bei wiederholtem Kontakt (Lanzavecchia und Sallusto, 2005; Murphy et al., 2009). Übertragen auf die Spättypallergie gegen Arzneimittel führt die Persistenz allergenspezifischer T-Gedächtniszellen bei erneutem Kontakt zu dem Arzneimittel auch Jahre nach der ersten Reaktion zu einem (unerwünschten) Wiederauftreten des Arzneimittlexanthems (Schnyder und Pichler, 2009; Bircher und Scherer, 2010).

5.2.2 Sensitivität und Spezifität des ELISpot-Assays

Unter Berücksichtigung der definierten Cut-off Kriterien ergaben sich bei Patienten nach Stimulation der PBMC mit dem verdächtigsten Penicillin im ELISpot-Assay bei 40% der Patienten positive Ergebnisse für IFN- γ , bei 70% für IL-4 und bei 65% für IL-5 bzw. IL-13. Die Spezifität lag für die einzelnen Zytokine und Betalaktame zwischen 90% und 100%. Durch kombinierte Auswertung aller 4 Zytokine konnte die Sensitivität auf 95% erhöht werden, jedoch zu Lasten der Spezifität, die bei Berücksichtigung aller Zytokine und Betalaktame 75% betrug. Optimal war eine Kombination von IL-4 oder IL-5 mit IFN- γ , die zu einer Sensitivität von 80% bei einer Spezifität von 95% führte (Ergebnisse nicht dargestellt). Auffällig war die höhere Sensitivität bei Detektion von Typ 2 Zytokinen. Vergleichbare Veröffentlichungen, in denen die Sensitivität bei Messung unterschiedlicher Zytokine im ELISpot-Assay verglichen wurde, sind nicht bekannt. Bei Verwendung von ELISA, RT-PCR oder Durchflusszytometrie waren die Resultate unterschiedlich. Zum Teil war die Sensitivität bei Messung von IFN- γ größer als bei Bestimmung von Typ 2 Zytokinen (Khalil et al., 2008; Rozieres et al., 2009), zum Teil vergleichbar (Lochmatter et al., 2009a; Martin et al., 2010) oder kleiner (Sachs et al., 2002). Sensitivität und Spezifität des ELISpot-Assays bei Patienten mit Spättypallergie gegen Penicilline wurden bisher in zwei Studien bestimmt, ausschließlich für IFN- γ . Bei Rozieres et al. (2009) ergab sich eine deutlich höhere Sensitivität von 91% bei einer vergleichbaren Spezifität von 95%. Khalil et al. (2008) konnten hingegen im IFN- γ ELISpot-Assay keine verwertbaren Ergebnisse erzielen. Die Differenzen kamen am ehesten durch die in Kapitel 5.2.1 diskutierten methodischen Unterschiede zustande und verdeutlichen die Notwendigkeit einer Standardisierung des ELISpot-Assays.

Ein Vergleich mit anderen *in vitro* Verfahren ist schwierig, da die Fallzahlen in den meisten Studien sehr klein sind und große Unterschiede hinsichtlich der Patientenauswahl sowie der methodischen Durchführung bestehen. Studien, in denen Patienten mit gut definierten Reaktionen vom Spättyp nach Einnahme von Arzneimitteln einer bestimmten Medikamentenklasse untersucht wurden, sind nur spärlich vorhanden. Dennoch soll versucht werden, den Stellenwert des ELISpot-Assays im Vergleich

zum LTT sowie zu anderen *in vitro* Tests und allergologischen Hauttests zu diskutieren. Es werden nur Veröffentlichungen berücksichtigt, in denen zumindest ein Teil der untersuchten Patienten eine Spättypallergie gegen Betalaktam-Antibiotika hatte.

Der LTT wurde als einziger *in vitro* Test bereits in großen Studien evaluiert und in Leitlinien als hilfreich beurteilt (Romano et al., 2004; Przybilla et al., 2008). Die erzielte Sensitivität lag zwischen 58% und 83%, die Spezifität zwischen 85% und 100% (Nyfeler und Pichler, 1997; Schnyder und Pichler, 2000; Hari et al., 2001; Luque et al., 2001; Sachs et al., 2002; Rozieres et al., 2009). Die Sensitivität des ELISpot-Assays in der vorliegenden Studie war somit bei Messung von IFN- γ etwas geringer, bei Bestimmung einzelner Typ 2 Zytokine vergleichbar und bei Kombination mehrerer Zytokine größer als diejenige des LTT. Die Spezifität der beiden Testverfahren war vergleichbar. Von Rozieres et al. (2009) wurden IFN- γ ELISpot-Assay und LTT im direkten Vergleich bei Patienten mit Spättypallergie gegen Amoxicillin eingesetzt. Mit einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 95% war der IFN- γ ELISpot-Assay dem LTT, der eine Sensitivität von 68% bei einer Spezifität von 85% aufwies, deutlich überlegen.

Auch andere *in vitro* Tests wurden bereits bei Patienten mit Spättypallergien gegen Arzneimittel eingesetzt. Dies waren im einzelnen die FACS-Analyse der Arzneimittel-induzierten Expression von CD69 auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten (Beeler et al., 2008), die Messung zytotoxischer Mechanismen an Hand der Freisetzung von Granzym B im ELISpot-Assay und der Expression von CD107a in der Durchflusszytometrie (Zawodniak et al., 2010). Die Detektion einer Arzneimittel-spezifischen Zytokinproduktion erfolgte neben der Messung im ELISpot-Assay (s.o.) auch unter Einsatz von ELISA (Sachs et al., 2002; Halevy et al., 2005; Khalil et al., 2008; Martin et al., 2010), RT-PCR (Gaspard et al., 2000), Durchflusszytometrie (Martin et al., 2010) und einem Bead-based Immunoassay (Lochmutter et al., 2009a). Sensitivität und Spezifität für die einzelnen Studien sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Übersicht über Studien, in denen *in vitro* Testverfahren zur Diagnostik von Arzneimittelallergien eingesetzt wurden.

Marker	Methode	Studie	Gesamt		Spättyp BL		Spez.
			n	Sens.	n	Sens.	
IFN- γ	ELISpot-Assay	Khalil et al., 2008	15	0%	12	0%	-
		Rozieres et al., 2009	-	-	22	91%	95%
	ELISA	Sachs et al., 2002	10	40%	6	50%	60%
		Halevy et al., 2005	36	64%	6	50%	-
		Khalil et al., 2008	15	80%	12	-	-
		Martin et al., 2010	19	57%	4	0%	100%
	RT-PCR	Gaspard et al., 2000	-	-	8	75%	64%
	FACS	Martin et al., 2010	19	46%	4	25%	100%
Bead-based IA	Lochmatter et al., 2009a*	10	80%	5	80%	100%	
IL-4	RT-PCR	Gaspard et al., 2000	-	-	8	0%	100%
	Bead-based IA	Lochmatter et al., 2009a*	10	0%	5	0%	100%
IL-5	ELISA	Sachs et al., 2002	10	90%	6	83%	100%
		Khalil et al., 2008	15	73%	12	-	-
		Martin et al., 2010	19	43%	4	50%	100%
	FACS	Martin et al., 2010	19	50%	4	50%	100%
	Bead-based IA	Lochmatter et al., 2009a*	10	60%	5	60%	100%
IL-13	Bead-based IA	Lochmatter et al., 2009a*	10	80%	5	80%	100%
CD69	FACS	Beeler et al., 2008*	15	100%	7	100%	100%
GzB	ELISpot-Assay	Zawodniak et al., 2010*	12	83%	4	-	100%
CD107a	FACS	Zawodniak et al., 2010*	10	100%	4	-	100%

Unter „Gesamt“ ist die Anzahl der Patienten mit Soforttyp-/Spättypallergie sowie die zugehörige Sensitivität angegeben. Unter „Spättyp BL“ sind die entsprechenden Daten nur für Patienten mit Spättypallergie gegen Betalaktame aufgeführt. BL, Betalaktam; CD, Cluster of differentiation; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISpot-Assay, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; FACS, Fluorescence activated cell sorting; GzB, Granzym B; IA, Immunoassay; IFN, Interferon; IL, Interleukin; n, Anzahl; RT-PCR, Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Sens., Sensitivität; Spez., Spezifität; *, Patienten und Kontrollpersonen wurden unter anderem an Hand eines positiven bzw. negativen LTT ausgewählt.

Auffällig war die sehr gute Trennung zwischen Patienten und Kontrollpersonen bei Bestimmung der CD69 Expression (Beeler et al., 2008) und bei Messung zytotoxischer Mechanismen (Zawodniak et al., 2010). Die erzielte Sensitivität der unterschiedlichen Assays zur Bestimmung von IFN- γ war meist größer (Halevy et al., 2005; Khalil et al., 2008; Lochmatter et al., 2009a) als die des IFN- γ ELISpot-Assays in der vorliegenden Studie. Eine Freisetzung von IL-4 war weder in der RT-PCR (Gaspard et al., 2000) noch im Bead-based Immunoassay (Lochmatter et al., 2009a) bei Patienten mit Spättypallergie gegen Arzneimittel nachweisbar und bildete einen Kontrast zu der hohen Sensitivität in der vorliegenden Arbeit. Als Ursache könnte beim Bead-based Immunoassay (Lochmatter et al., 2009a) ein Verbrauch des sezernierten IL-4 durch Bindung an Rezeptoren, die beispielsweise von Lymphozyten und Monozyten exprimiert werden, in Betracht kommen (Bullens et al., 1998; Ewen und Baca-Estrada, 2001). Neben methodischen Differenzen haben sicherlich auch die unterschiedlichen Einschlusskriterien bei der Auswahl der Patienten die Ergebnisse beeinflusst. So wurden in einigen

Studien nur Patienten eingeschlossen, deren PBMC bereits im LTT eine Arzneimittel-spezifische *in vitro* Reaktivität aufgewiesen hatten (Beeler et al., 2008; Lochmatter et al., 2009a; Zawodniak et al., 2010). Die erzielte Sensitivität war dann möglicherweise größer, als wenn die Patienten an Hand klinischer Kriterien (Sachs et al., 2002; Halevy et al., 2005; Martin et al., 2010), der Ergebnisse der allergologischen Hauttests (Gaspard et al., 2000; Rozieres et al., 2009) oder einer versehentlichen Reexposition (Khalil et al., 2008) ausgewählt worden wären.

In die vorliegende Studie wurden Patienten eingeschlossen, die in zuvor durchgeführten Hauttests auf das verdächtige Penicillin reagiert hatten. Ein Vergleich zwischen ELISpot-Assay und den Hauttests ist aus diesem Grund nicht möglich. Er wäre jedoch wichtig, da Hauttestungen das Standardverfahren zur Diagnostik von Arzneimittelallergien darstellen, obwohl bei Patienten mit in Provokationstestungen bestätigten Spättypallergien über eine niedrige Sensitivität zwischen 5% und 66% berichtet wurde (Terrados et al., 1995; Padial et al., 2008; Blanca-Lopez et al., 2009). In Studien anderer Arbeitsgruppen war die Sensitivität des LTT größer als die der parallel durchgeführten Hauttests (Nyfeler und Pichler, 1997; Schnyder und Pichler, 2000; Hari et al., 2001; Luque et al., 2001; Sachs et al., 2002). Der Verdacht, dass die Ergebnisse des LTT falsch positiv sein könnten, wurde von Luque et al. (2001) widerlegt, da bei allen Patienten mit negativem Intrakutantest und positivem LTT eine Spättypallergie gegen Betalaktam-Antibiotika in der oralen Provokationstestung bestätigt werden konnte. Auch weitere *in vitro* Testverfahren, wie die Zytokindetektion in ELISA oder Durchflusszytometrie (Sachs et al., 2002; Lochmatter et al., 2009a) und die Messung der CD69 Oberflächenexpression (Beeler et al., 2008), ergaben häufiger positive Ergebnisse als die entsprechenden Hauttestungen. Zum Teil wurden die Patienten allerdings, wie oben beschrieben, an Hand einer *in vitro* Reaktivität der PBMC im LTT ausgewählt (Beeler et al., 2008; Lochmatter et al., 2009a).

Insgesamt lassen die Daten annehmen, dass der ELISpot-Assay eine geeignete Testmethode für den *in vitro* Nachweis einer Penicillinallergie darstellt und hinsichtlich seiner Sensitivität und Spezifität mit anderen *in vitro* Testmethoden vergleichbar ist. Zur Bestätigung sollten die einzelnen Verfahren an größeren Patientenkollektiven und im direkten Vergleich getestet werden. Für eine Gegenüberstellung mit allergologischen Hauttests müssten die Patienten entweder ausschließlich an Hand anamnestischer und klinischer Kriterien oder im besten Fall an Hand einer positiven Provokationstestung ausgewählt werden.

5.2.3 Ergebnisse des ELISpot-Assays nach Stimulation mit weiteren Betalaktamen

Eine in Hauttestungen nachgewiesene Kreuzsensibilisierung gegen verschiedene Betalaktam-Antibiotika konnte in den meisten Fällen auch im ELISpot-Assay bestätigt werden, passend zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Mauri-Hellweg et al., 1996; Sachs et al., 2004; Rozieres et al., 2009). In der vorliegenden Studie waren bei allen 6 Patienten mit Allergie gegen Aminopenicilline und in Hauttests nachgewiesener Kreuzsensibilisierung gegen Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin positive Ergebnisse im ELISpot-Assay nach Stimulation der PBMC mit Benzylpenicillin nachweisbar. Bei zwei von 4 Patienten mit Benzyl-/Phenoxymethylpenicillinallergie, bei denen in Hauttestungen eine

Kreuzsensibilisierung gegen Aminopenicilline nachgewiesen werden konnte, war auch der ELISpot-Assay mit Aminopenicillinen positiv. Eine Stimulation der PBMC mit tolerierten Betalaktam-Antibiotika ergab in den meisten Fällen negative Ergebnisse. Dennoch zeigten PBMC von drei der 9 Patienten mit Aminopenicillinallergie, die Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin in Hauttests vertragen hatten, positive Reaktionen auf Benzylpenicillin im ELISpot-Assay. Zwei dieser Patienten hatten Phenoxymethylpenicillin auch in der OPT vertragen. Cefpodoxim wurde von allen 20 Patienten in Hauttests vertragen. Im ELISpot-Assay lag die Frequenz Ceftriaxon-spezifischer Zellen bei 7 dieser Patienten, 5 davon mit negativer OPT, gering über dem Cut-off Wert.

Mauri-Hellweg et al. (1996) beschrieben, dass verschiedene T-Zell Linien und T-Zell Klone, die aus PBMC von einzelnen Patienten mit Spättypallergie gegen Betalaktame generiert wurden, sehr heterogene T-Zell Rezeptoren besaßen und ein unterschiedliches Ausmaß an Kreuzreaktivität aufwiesen. Es wird daher angenommen, dass nur ein Teil der Gesamtpopulation von T-Lymphozyten, die während der allergischen Reaktion gegen ein Arzneimittel entsteht und spezifisch für dieses Arzneimittel ist, eine Kreuzreaktivität gegen strukturell verwandte Substanzen besitzt. Dieser Anteil kann bei einzelnen Patienten unterschiedlich groß sein (Depta und Pichler, 2003; Pichler et al., 2011). Eine Erklärung für die fehlende *in vitro* Reaktivität gegen Aminopenicilline bei zwei der 4 Patienten mit Allergie gegen Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin könnte daher sein, dass nur ein geringer Anteil der Benzylpenicillin-/Phenoxymethylpenicillin-spezifischen T-Lymphozyten eine Kreuzreaktivität gegen Aminopenicilline besaß. Da die Frequenz Betalaktam-spezifischer Zellen, die die untersuchten Zytokine freisetzen, bei den beiden Patienten insgesamt gering war, könnte die Frequenz der kreuzreaktiven Zellen unter dem Detektionslimit des ELISpot-Assays gelegen haben. Möglicherweise standen bei diesen Patienten auch andere Effektormechanismen im Vordergrund, so dass die Messung zytotoxischer Mechanismen oder anderer Zytokine zu positiven Ergebnissen geführt hätte. Für die Schwere eines Arzneimittellexanthems sollen eher die Effektormechanismen der reaktiven Zellen entscheidend sein als deren Frequenz im peripheren Blut (Porebski et al., 2011). Dennoch wird angenommen, dass die Frequenz reaktiver Zellen einen bestimmten Grenzwert überschritten haben muss, damit eine klinisch relevante Sensibilisierung vorliegt (Depta und Pichler, 2003; Pichler et al., 2011). Es ist daher vorstellbar, dass bei Patienten, deren PBMC im ELISpot-Assay positive Reaktionen auf tolerierte Betalaktame aufwiesen, kreuzreaktive Zellen in so geringer Frequenz vorlagen, dass die Sensibilisierung klinisch nicht relevant wurde, jedoch im ELISpot-Assay nachgewiesen werden konnte. Diese Überlegungen bleiben jedoch hypothetisch.

Kontrollpersonen wiesen im Vergleich zu Patienten mit negativen Hauttests seltener positive Ergebnisse im ELISpot-Assay auf. Nur jeweils zwei von 19 (Benzylpenicillin) bzw. 20 (Ceftriaxon) Kontrollpersonen hatten ein positives Ergebnis im ELISpot-Assay mit Benzylpenicillin bzw. Ceftriaxon. Auch die mittleren Frequenzen Benzylpenicillin- und Ceftriaxon-spezifischer Zellen waren in der Kontrollgruppe niedriger als in der Patientengruppe mit negativen Hauttests. Diese Resultate stützen die Annahme, dass in der Patientengruppe kreuzreaktive T-Lymphozyten in geringer Frequenz vorlagen, so dass keine klinisch relevante Kreuzallergie bestand und dennoch ein *in vitro* Nachweis dieser Zellen im ELISpot-Assay möglich war.

Es konnte an Hand der in dieser Studie erhobenen Daten nicht abschließend geklärt werden, wodurch die erhöhte Kreuzreaktivität gegen chemisch verwandte Betalaktame im ELISpot-Assay bei Patienten zustande kam. Die Ergebnisse der *in vitro* Stimulation mit Betalaktam-Antibiotika ähnlicher Struktur verdeutlichen jedoch, dass der ELISpot-Assay nicht uneingeschränkt für die Diagnostik einer möglichen Kreuzreaktivität geeignet ist. Eine *in vitro* nachgewiesene Sensibilisierung sollte daher kritisch hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz überprüft werden.

5.2.4 Betalaktam-spezifische Zytokinprofile

Die meisten Veröffentlichungen über Zytokinprofile bei Patienten mit Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp gegen Arzneimittel beschäftigen sich mit der Zytokinproduktion während des Arzneimittelexanthems, ohne dass eine *in vitro* Stimulation der untersuchten Zellen mit dem verdächtigten Medikament erfolgte. Bei Patienten mit MPE wurde meist eine gut definierte Typ 1 Immunantwort beschrieben (Posadas et al., 2000; Posadas et al., 2002b; Cornejo-Garcia et al., 2007; Fernandez et al., 2008), in anderen Studien wurde jedoch die große Bedeutung von Typ 2 Zytokinen hervorgehoben (Hari et al., 1999; Mikami et al., 1999; Yawalkar et al., 2000c; Yawalkar und Pichler, 2001). Das Arzneimittel-induzierte EEM wurde meist als relativ gut polarisierte Typ 1 Immunreaktion charakterisiert (Kokuba et al., 1999; Caproni et al., 2006a; Quaglino et al., 2008), in Einzelfällen konnte auch hier eine Beteiligung von Typ 2 Zytokinen nachgewiesen werden (Mikami et al., 1999; Sachs et al., 2001; Nishio et al., 2007). Bei SJS und TEN schienen sowohl Typ 1 als auch Typ 2 Zytokine beteiligt zu sein (Caproni et al., 2006a; Nishio et al., 2007; Quaglino et al., 2008). Eine Messung aktivierter Zellen im peripheren Blut ist jedoch unspezifisch, da die Aktivierung auch durch die Infektion, die mit dem Betalaktam-Antibiotikum behandelt werden soll, zustande kommen kann.

Im Gegensatz dazu wurden die PBMC für die Untersuchung im ELISpot-Assay während klinischer Remission gewonnen. Da die Zytokinfreisetzung innerhalb von 48 h nach Beginn der Antigenstimulation gemessen wurde, wurde sie am ehesten durch im peripheren Blut zirkulierende T-Gedächtniszellen vermittelt. T-Gedächtniszellen können in unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden, denen gemeinsam ist, dass sie oft nicht auf eine bestimmte Effektorzelllinie festgelegt sind (Messi et al., 2003; Murphy et al., 2009). CD4^{pos} T-Gedächtniszellen können beispielsweise das Muster der freigesetzten Zytokine den Umgebungsbedingungen entsprechend ändern und sind somit nicht endgültig auf die Differenzierung zu T_H1-, T_H2-Zellen oder anderen T-Helferzellen festgelegt (Messi et al., 2003). Aus diesem Grund bleibt unklar, ob die Subtypen der mittels ELISpot-Assay nachgewiesenen T-Lymphozyten denen entsprechen, die auch *in vivo* an der Entstehung des Arzneimittelexanthems beteiligt waren. Nach Allergenstimulation der PBMC im ELISpot-Assay wiesen 10% der 20 Patienten ein Typ 1 Profil auf, 55% ein Typ 2 Profil und 30% eine kombinierte Freisetzung von Typ 1 und Typ 2 Zytokinen. Bei einer Patientin war keine Zytokinfreisetzung nachweisbar. Ähnlich heterogene Befunde ergaben sich auch in anderen Studien, in denen PBMC von Patienten mit Spättypallergien gegen Betalaktame in klinischer Remission untersucht wurden (Gaspard et al., 2000; Sachs et al., 2002; Beeler et al., 2006; Khalil et al., 2008; Lochmatter et al., 2009a; Martin et al., 2010). Es waren dabei zunächst keine einheitlichen Tendenzen erkennbar, die auf einen Zusammenhang mit der klinischen Manifestation oder dem eingenommenen Betalaktam hingewiesen

hätten. Um dies näher zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit Gruppen von Patienten mit unterschiedlichem Sensibilisierungsmuster, unterschiedlicher klinischer Manifestation, unterschiedlichem Atopie-Status bzw. verdächtigtem Betalaktam miteinander verglichen. Aufgrund der sehr geringen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen sind die Ergebnisse allerdings nur begrenzt aussagekräftig.

Die Frequenz allergenspezifischer Zellen war bei Patienten mit Sensibilisierung gegen Aminopenicilline und Benzyl-/Phenoxymethylpenicillin höher als bei Patienten, die ausschließlich gegen Aminopenicilline sensibilisiert waren. Zudem waren die Zytokinprofile in der erstgenannten Gruppe breiter. Wie oben bereits beschrieben, ist die T-Zell Antwort bei einer Spättypallergie gegen Arzneimittel in den meisten Fällen polykonal und schließt neben Klonen, die sehr selektiv auf das auslösende Arzneimittel reagieren, auch Klone ein, die eine erhöhte Kreuzreaktivität gegen chemisch verwandte Arzneimittel aufweisen (Mauri-Hellweg et al., 1996). Bei einer höheren Gesamtzahl spezifischer T-Lymphozyten kann entsprechend auch die Zahl kreuzreaktiver Klone größer sein. Da eine klinisch relevante Sensibilisierung erst vorliegt, wenn eine gewisse Anzahl spezifischer T-Lymphozyten überschritten ist (Depta und Pichler, 2003; Pichler et al., 2011), ist eine breitere Sensibilisierung bei größerer Gesamtzahl spezifischer T-Zellen wahrscheinlicher. Auch die breiteren Zytokinprofile können mit dieser Theorie erklärt werden. Je höher die Frequenz spezifischer T-Lymphozyten ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Anzahl unterschiedlicher Klone mit abweichender Zytokinproduktion über dem Detektionslimit des ELISpot-Assays liegt. Ob diese theoretischen Überlegungen zutreffen, kann nur durch weiterführende Versuche überprüft werden, beispielsweise durch Generierung von Penicillin-spezifischen T-Zell-Klonen und anschließende Untersuchung der Kreuzreaktivität, der Zytokinproduktion und der T-Zell-Rezeptoren.

Von 12 Patienten, bei denen sich das Arzneimittelexanthem in Form eines MPE manifestiert hatte, lag bei 8 ein Typ 2 Zytokinprofil vor, bei einem ein Typ 1 Zytokinprofil und bei zwei Patienten wurden Typ 1 und Typ 2 Zytokine freigesetzt. Von 5 Patienten, die ein EEM gehabt hatten, zeigten zwei ein Typ 2 Zytokinprofil und drei eine kombinierte Typ 1 und Typ 2 Zytokinantwort. PBMC der Patientin mit SJS in der Anamnese produzierten Typ 1 und Typ 2 Zytokine. Von zwei Patienten mit Erythem wies einer ein Typ 1 Zytokinmuster und der andere ein Typ 2 Zytokinmuster auf. Auffällig war, dass bei Patienten mit EEM die Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen größer waren als bei Patienten, die ein MPE gehabt hatten. Für IFN- γ waren die Unterschiede signifikant. Zudem war der IFN- γ ELISpot-Assay in der Patientengruppe mit EEM häufiger positiv als in der Patientengruppe mit MPE. IFN- γ kann selbst zytotoxisch wirken und zudem die Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten fördern (Abbas et al., 1996; Schreiber und Schreiber, 2003). Daher passt die Prädominanz IFN- γ freisetzender Zellen gut zu der häufig auftretenden Blasenbildung (Mockenhaupt, 2009; Burns et al., 2010) und dem histopathologischen Korrelat zahlreicher apoptotischer Keratinozyten (Cote et al., 1995; Rzany et al., 1996). Gut vereinbar sind auch die Ergebnisse von Studien, in denen die Zytokinproduktion während des Arzneimittelexanthems analysiert wurde und in denen häufig eine starke Beteiligung von Typ 1 Zytokinen nachgewiesen werden konnte (Kokuba et al., 1999; Caproni et al., 2006a; Quaglino et al., 2008). Auch die hohe Frequenz IFN- γ produzierender Zellen bei der Patientin mit SJS kann so erklärt werden.

In der Patientengruppe mit Atopie war die Anzahl allergenspezifischer Zellen größer als bei Patienten, die keine sicheren Hinweise auf eine Atopie boten. Für IL-4 und IL-13 waren die Unterschiede besonders deutlich, jedoch nicht signifikant. Eine Prädominanz von T_H2-Zellen ist bei Atopikern typisch (Jutel und Akdis, 2011), warum jedoch auch die Frequenz IFN- γ freisetzender Zellen in der Gruppe mit Atopie größer war und zudem eine signifikant positive Korrelation mit den Werten des Erlanger Atopie-Scores bestand, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Bei der Mehrzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten blieb das Zytokinprofil nach Stimulation mit verschiedenen Betalaktam-Antibiotika, gegen die Sensibilisierungen vorlagen, nahezu gleich. Auch Lochmatter et al. (2009a) beobachteten, dass die Zytokinprofile nach Stimulation mit unterschiedlichen Betalaktamen bei den einzelnen Patienten ähnlich waren. Zudem führte Tetanus Toxoid zu Zytokinfreisetzungsmustern, die mit denen nach Allergenstimulation jeweils individuell übereinstimmten. Es erscheint daher möglich, dass das Zytokinprofil weniger von dem eingesetzten Medikament oder der klinischen Manifestation abhängt, als vielmehr eine „angeborene Reaktivität“ der PBMC der einzelnen Patienten widerspiegelt (Lochmatter et al., 2009a). Da in der vorliegenden Arbeit neben verschiedenen Betalaktamen kein weiteres Antigen eingesetzt wurde und das Mitogen PHA als Positivkontrolle diente, konnten die Beobachtungen von Lochmatter et al. (2009a) nicht vollständig bestätigt werden. Weiterhin könnten in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchte Faktoren das individuelle Zytokinprofil beeinflussen, wie zum Beispiel der zeitliche Abstand zu der allergischen Reaktion. Untersucht wurde auch nicht, ob die Zytokinprofile zu verschiedenen Zeitpunkten der Blutentnahme variieren. Dies erscheint möglich, da sich die Zusammensetzung der T-Zellen innerhalb der PBMC ändern kann. Die Frequenzen spezifischer Zellen waren bei den untersuchten Patienten in den meisten Fällen nach Stimulation mit dem Betalaktam-Antibiotikum, das die allergische Reaktion ausgelöst hatte, größer als nach Stimulation mit kreuzreaktiven Substanzen. Dies passt wiederum zu der oben beschriebenen Beobachtung anderer Forschungsgruppen, dass nur ein Teil der gesamten T-Lymphozyten, die während einer allergischen Reaktion entstanden sind, mit chemisch verwandten Arzneimitteln kreuzreagiert (Depta und Pichler, 2003; Pichler et al., 2011). Dennoch waren bei einigen Patienten die Frequenzen spezifischer Zellen für kreuzreaktive Betalaktame größer als für das verdächtige Penicillin. Dies war insbesondere bei den Patienten BH, GS und HP der Fall, wobei bei Patientin GS ohnehin nicht ermittelt werden konnte, welches Arzneimittel die allergische Reaktion ausgelöst hatte. Da anamnestische Angaben zu früheren Einnahmen von Antibiotika oft sehr ungenau sind (Wyatt, 1996), könnte die Sensibilisierung in einigen Fällen bereits zu einem früheren Zeitpunkt mit einem anderen Penicillin aufgetreten und subklinisch verlaufen sein. Es wäre dann möglich, dass der zweite Kontakt mit einem kreuzreaktiven Betalaktam zu einer erneuten Stimulation von einem Teil der T-Gedächtniszellen geführt hat, die während der ersten allergischen Reaktion entstanden sind. So würde das Überwiegen von T-Lymphozyten erklärt, die spezifisch gegen das zuerst eingenommene Betalaktam reagierten. Dabei könnte ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle spielen, wie für das Phänomen des „ersten Antigen-sündenfalls“ (original antigenic sin) beschrieben wurde. Dieser Begriff charakterisierte ursprünglich humorale Immunantworten gegen das Influenzavirus, bei denen eine Reinfektionen mit einer neuen Virusvariante ausschließlich zu einer Bildung von Antikörpern führte, die gegen Epitope gerichtet waren, die auch die Viren von der Erstinfektion trugen (Fazekas de St Groth und Webster, 1966; Murphy et al., 2009). Später konnte dieser Mechanismus auch bei der

Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten durch verschiedene Virusstämme nachgewiesen werden (Klenerman und Zinkernagel, 1998).

5.2.5 Beteiligung CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} T-Lymphozyten

Der ELISpot-Assay wurde bei 8 Patienten nach Depletion von CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} Zellen mittels MACS durchgeführt. Bei 7 Patienten führte die Depletion CD8^{pos} Zellen zu einer annähernd gleichbleibenden oder größeren Anzahl Betalaktam-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay im Vergleich zu PBMC, während nach Depletion CD4^{pos} Zellen fast keine Zytokinproduktion nachweisbar war. Die Daten lassen annehmen, dass die CD4^{pos} T-Lymphozyten für die allergenspezifische Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay verantwortlich waren. Eine Ausnahme stellte Patientin HP dar, bei der sich die Überempfindlichkeitsreaktion nach Einnahme von Ampicillin in Form eines EEM manifestiert hatte. Bei ihr war die Anzahl Zytokin-freisetzender Zellen bei Verwendung von PBMC, CD8^{neg} oder CD4^{neg} Zellen im ELISpot-Assay ungefähr gleich groß, auch bei Stimulation mit kreuzreaktiven Betalaktam-Antibiotika. Bisher wurde nicht untersucht, ob CD4^{pos} und/oder CD8^{pos} Zellen bei Patienten mit Arzneimittelallergien an der spezifischen Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay beteiligt waren. Bei Verwendung anderer *in vitro* Testverfahren waren die erzielten Ergebnisse nicht einheitlich. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine Arzneimittel-spezifische Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (Beeler et al., 2008) oder des zytotoxischen Markers CD107a (Zawodniak et al., 2010) auf der Oberfläche von CD4^{pos} Zellen und CD8^{pos} Zellen nachgewiesen werden. Eine Arzneimittel-spezifische Produktion von IFN- γ , IL-5 und IL-10 konnte durchflusszytometrisch entweder nur in CD8^{pos}, nur in CD4^{pos} oder sowohl in CD8^{pos} als auch in CD4^{pos} T-Lymphozyten detektiert werden. Dabei bestand kein erkennbarer Zusammenhang zwischen den beteiligten T-Zellen und der klinischen Manifestation oder der Arzneimittelklasse (Martin et al., 2010). Sachs et al. (2002) analysierten die Subtypen der *in vitro* reaktiven Zellen an Hand der Betalaktam-spezifischen IL-5 Produktion mittels ELISA und RT-PCR. Positive Ergebnisse wurden dabei entweder nur bei CD4^{pos} Zellen oder sowohl bei CD4^{pos} Zellen als auch bei CD8^{pos} T-Zellen erzielt. Die Unterschiede könnten dadurch bedingt sein, dass ein Teil der eingesetzten Testverfahren bestimmte Subtypen der T-Lymphozyten besser nachweisen kann als andere. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Zytokinfreisetzung scheint beispielsweise weniger gut für den Nachweis Arzneimittel-spezifischer CD8^{pos} T-Lymphozyten geeignet zu sein als die Messung zytotoxischer Marker (Zawodniak et al., 2010) oder allgemeiner Aktivierungsmarker (Beeler et al., 2008). Zu dieser Hypothese passt auch, dass bei Sachs et al. (2002) und Martin et al. (2010) die Subtypen der reaktiven T-Lymphozyten bei Verwendung unterschiedlicher *in vitro* Testverfahren in vielen Fällen nicht übereinstimmten. Auffällig war insbesondere, dass auch bei Patienten mit schweren bullösen Arzneimittelexanthemen, wie EEM oder insbesondere SJS, fast ausschließlich CD4^{pos} T-Lymphozyten an der Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay beteiligt waren, obwohl bei diesen klinischen Manifestationen zytotoxischen CD8^{pos} T-Lymphozyten eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Hertl et al., 1995; Hari et al., 2001; Nassif et al., 2004). Von einigen Autoren wurde jedoch auch eine bevorzugte Beteiligung CD4^{pos} T-Lymphozyten bei schweren bullösen Arzneimittelreaktionen, wie SJS oder TEN, beschrieben (Torres et al., 2006; Caproni et al., 2006b). Die Ergebnisse sollten durch zusätzliche Bestimmung

zytotoxischer Marker, wie Granzym B (Zawodniak et al., 2010) oder Perforin, im ELISpot-Assay überprüft werden.

Bei 4 Patienten sind während des Arzneimittelexanthems Hautbiopsate entnommen und immunhistochemisch gefärbt worden. In allen Fällen überwog der prozentuale Anteil der CD4^{pos} T-Lymphozyten deutlich gegenüber den CD8^{pos} T-Lymphozyten. Auch von anderen Autoren wurde eine Prädominanz CD4^{pos} T-Zellen gegenüber CD8^{pos} T-Zellen in der Haut bei MPE (Barbaud et al., 1997; Mikami et al., 1999; Yawalkar et al., 2000a; Hari et al., 2001; Yawalkar und Pichler, 2001; Fernandez et al., 2008) und EEM (Margolis et al., 1983; Rzany et al., 1996; Mikami et al., 1999; Caproni et al., 2006b) beschrieben. Untersuchungen zur Aktivierung von T-Lymphozyten während eines Arzneimittelexanthems kamen hingegen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Es wurde entweder eine Aktivierung überwiegend CD4^{pos} Zellen (Mikami 2005, Torres 2006, Fernandez 2008), oder CD4^{pos} und CD8^{pos} T-Lymphozyten (Cornejo-Garcia 2007, Hari 2001) nachgewiesen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Studien könnten dadurch bedingt sein, dass die Entnahme der Hautbiopsien oder des peripheren Blutes zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Überempfindlichkeitsreaktion erfolgte und bestimmte Subtypen aktivierter Zellen sehr schnell in die Haut bzw. andere Gewebe auswandern (Hari et al., 2001).

Bei den Patienten BH, MW und HP wurden die beteiligten Zellen sowohl in der Immunhistochemie als auch im ELISpot-Assay analysiert. Die Ergebnisse stimmten somit weitgehend überein. Wie in Kapitel 5.3.4 beschrieben, sind die Befunde während des Arzneimittelexanthems nicht unbedingt mit denen während klinischer Remission vergleichbar. Um den genauen Zusammenhang zwischen den aktivierten Zellen während des Arzneimittelexanthems in der Haut und im peripheren Blut sowie den im ELISpot-Assay während klinischer Remission detektierten Arzneimittel-spezifischen Zellen zu untersuchen, sollte parallel zu der Entnahme der Hautproben auch die Zusammensetzung aktivierter Zellen im peripheren Blut analysiert werden.

5.2.6 Ausblick

Prinzipiell kann festgestellt werden, dass bislang kein geeignetes *in vitro* Verfahren für den Nachweis einer Spättypallergie gegen Arzneimittel verfügbar ist. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie jedoch, dass der ELISpot-Assay hilfreich sein kann, insbesondere bei Patienten mit schweren Arzneimittelreaktionen, wenn der erneute Allergenkontakt während der allergologischen Testung wegen gesundheitlicher Risiken vermieden werden soll. Dennoch ist der ELISpot-Assay derzeit nicht für einen Einsatz in der klinischen Routine geeignet. Zunächst müsste sein Nutzen in größeren Studien evaluiert werden und eine Validierung und Standardisierung vorgenommen werden (Janetzki et al., 2005; Tuomela et al., 2005). Da Arbeitsaufwand und Kosten derzeit noch sehr groß sind, sollte auch versucht werden, den ELISpot-Assay methodisch zu vereinfachen, beispielsweise durch Verwendung von kryokonservierten PBMC oder von ELISpot-Platten, die mit Antikörpern vorbeschichtet sind (Minang et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde der ELISpot-Assay bei Patienten mit in Hauttests bestätigten Spättypallergien gegen Penicilline eingesetzt. In der Folge sollte analysiert werden, ob der ELISpot-Assay tatsächlich

für die Abklärung von Arzneimittelexanthemen geeignet ist, beispielsweise indem er bei Patienten mit dem Verdacht einer Penicillinallergie vor Beginn der allergologischen Hauttestungen durchgeführt wird. Auf jeden Fall sollten auch PBMC von Patienten untersucht werden, bei denen ein Arzneimittelexanthem im zeitlichen Zusammenhang mit der Einnahme eines Arzneimittels aufgetreten ist, eine Allergie jedoch in Hauttests und Provokationstests ausgeschlossen werden konnte. Weitere Patientengruppen, die berücksichtigt werden sollten, sind Patienten mit anderen kutanen Manifestationen einer Spättypallergie, wie AGEP oder DRESS, oder extrakutanen Manifestationen einer Spättypallergie.

Der ELISpot-Assay wurde in dieser Arbeit nach klinischer Remission der allergischen Reaktion durchgeführt. Es wäre interessant zu überprüfen, ob sich eine allergenspezifische Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay auch bei Einsatz von PBMC nachweisen lässt, die während des Arzneimittelexanthems gewonnen wurden. Oft haben Patienten im zeitlichen Zusammenhang mit der Entstehung eines Arzneimittelexanthems mehrere Medikamente eingenommen, so dass es schwierig ist, ein Präparat als Auslöser zu identifizieren. Es müssen dann zunächst alle in Frage kommenden Arzneimittel abgesetzt und die allergologischen Diagnostik abgewartet werden, die frühestens einige Wochen nach Abheilung der Hautveränderungen vorgenommen werden kann. Dieses Vorgehen ist im Alltag wenig praktikabel. Ein *in vitro* Test, der schon während des Exanthems durchgeführt werden kann, würde eine raschere Identifizierung des Auslösers ermöglichen. Zur Zeit wird angenommen, dass die T-Lymphozyten während der allergischen Reaktion so stark aktiviert sind, dass eine *in vitro* Stimulation mit dem Allergen zu keinen messbaren Reaktionen führen würde (Lochmatter et al., 2009b; Porebski et al., 2011). Dennoch beschrieben Kano et al. (2007), dass positive Ergebnisse im LTT bei Patienten mit MPE oder SJS/TEN häufiger erzielt werden können, wenn die Gewinnung der PBMC während des Arzneimittelexanthems erfolgt, als wenn die Blutentnahme Wochen bis Monate nach Abheilung der Hautveränderungen vorgenommen wird. Um die Frage zu beantworten, ob der ELISpot-Assay bereits während der allergischen Reaktion zur Identifizierung des Auslösers wirksam ist, sollten weitere Studien mit größerer Patientenzahl durchgeführt werden.

In der vorliegenden Studie wurde die allergenspezifische Zytokinfreisetzung im ELISpot-Assay überwiegend durch T_H1 - und/oder T_H2 -Zellen vermittelt. An Hand der ausgewählten Zytokine konnte jedoch nicht erschlossen werden, ob auch andere T-Helferzell-Subtypen, wie beispielsweise T_H17 -Zellen, beteiligt waren. Da neben Berichten über die bedeutende Rolle von T_H17 -Zellen bei der Entstehung von allergischen Kontaktekzemen (Zhao et al., 2009; Martin et al., 2011) auch erste Hinweise auf eine Beteiligung bei Spättypallergien gegen Arzneimittel vorliegen (Lochmatter et al., 2009a; Tokura et al., 2010), wäre eine Messung entsprechender Zytokine im ELISpot-Assay sehr interessant. Eine mögliche Beteiligung $CD8^{pos}$ T-Lymphozyten könnte zusätzlich durch die Bestimmung zytotoxischer Substanzen, wie Granzym B oder Perforin, detektiert werden. Möglicherweise könnten so auch bei Patienten positive *in vitro* Ergebnisse erzielt werden, die nur sehr geringe Zahlen spezifischer T_H1 - bzw. T_H2 -Zellen aufwiesen und bei denen unter Umständen andere Effektormechanismen im Vordergrund stehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Betalaktam-Antibiotika verursachen häufig allergische Reaktionen vom Spättyp. Eine Reexposition kann erneut zu schweren Arzneimittelreaktionen führen. Daher sollte eine allergologische Diagnostik erfolgen, um den Auslöser und mögliche Kreuzallergene zu identifizieren. In der allergologischen Diagnostik werden Hauttests und orale Provokationstests eingesetzt, bei denen der erneute Kontakt zu dem verdächtigten Arzneimittel insbesondere in der Abklärung von lebensbedrohlichen Arzneimittelreaktionen eine Gefahr für den Patienten darstellt. Daher ist ein zusätzlicher *in vitro* Test wünschenswert. Eine sensitive und standardisierte *in vitro* Methode zum Nachweis einer Spättypallergie ist derzeit jedoch nicht verfügbar.

In der vorliegenden Arbeit wird der ELISpot-Assay als potentiell *in vitro* Testverfahren für den Nachweis von Spättypallergien gegen Betalaktam-Antibiotika evaluiert. Ausgewählt wurden 20 Patienten, die nach Einnahme eines Betalaktam-Antibiotikums ein Arzneimittellexanthem entwickelten (12 MPE, 5 EEM, 2 Erythem, 1 SJS) und bei denen eine Spättypallergie gegen Betalaktame in allergologischen Hauttestungen bestätigt wurde. Als Kontrollgruppe dienten 21 Probanden, die Betalaktam-Antibiotika anamnestisch vertrugen. PBMC wurden während klinischer Remission isoliert, im ELISpot-Assay mit verschiedenen Betalaktam-Antibiotika inkubiert und die spezifischen T-Lymphozyten an Hand der Freisetzung der Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-5 bzw. IL-13 quantifiziert. Um zu erfassen, welcher T-Zell Subtyp an der Zytokinfreisetzung beteiligt war, wurde bei 8 Patienten und 8 Kontrollpersonen vor Einsatz der PBMC im ELISpot-Assay eine Depletion der CD4^{pos} bzw. CD8^{pos} T-Zellen mittels MACS vorgenommen.

Die Frequenz Betalaktam-spezifischer T-Zellen war für alle Zytokine in der Patientengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Bei insgesamt 19 der 20 Patienten lag die Anzahl der allergenspezifischen T-Zellen je 10⁶ PBMC für mindestens ein Zytokin oberhalb des definierten Cut-off Wertes. Die Sensitivität betrug 40% für IFN- γ , 70% für IL-4 und 65% für IL-5 bzw. IL-13. Die Spezifität lag für die einzelnen Zytokine und Betalaktame zwischen 90 und 100%. In vielen Fällen konnten auch Kreuzsensibilisierungen im ELISpot-Assay nachgewiesen werden. Die Zytokinprofile waren bei den einzelnen Patienten sehr heterogen. Das individuelle Zytokinmuster blieb jedoch nach Stimulation der PBMC mit unterschiedlichen Betalaktamen erhalten. Es konnte keine eindeutige Abhängigkeit des Zytokinprofils von der klinischen Manifestation, dem Sensibilisierungsmuster, dem eingenommenen Betalaktam oder dem Atopie-Status erkannt werden. Die Ergebnisse der Zelldepletion sowie die immunhistochemischen Färbungen von Hautbiopsaten zeigten, dass den CD4^{pos} T-Lymphozyten eine besondere Rolle bei der Zytokinfreisetzung zukommt.

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass der ELISpot-Assay ein nützliches Testverfahren für den *in vitro* Nachweis von Spättypallergien gegen Betalaktame ist. Die Detektion der Typ 2 Zytokine IL-4, IL-5 bzw. IL-13 war in der vorliegenden Studie zuverlässiger als die des Typ 1 Zytokins IFN- γ , insbesondere im Hinblick auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Testergebnisse. Um alle Patienten mit einer Spättypallergie zu identifizieren, war die kombinierte Messung mehrerer Zytokine erforderlich. Vor einem Einsatz in der klinischen Routine sollten methodische Vereinfachungen vorgenommen und Studien mit größeren Patientenzahlen zur Überprüfung der diagnostischen Wertigkeit sowie zur weiteren Validierung und Standardisierung des Assays durchgeführt werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603): 787-793.

Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, Brockow K, Pichler WJ, Demoly P. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy* 2003; 58(9): 854-863.

Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA. Further observations on penicillin. *Lancet* 1941; 238(6155): 177-189.

Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr* 2007; 96(5): 644-647.

Alonso GA, Barranco SP, Cabanas R, Lopez-Serrano MC. Erythema multiforme from betalactams with positive cutaneous tests. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1999; 9(6): 401-402.

Audicana M, Bernaola G, Urrutia I, Echechipia S, Gastaminza G, Munoz D, Fernandez E, Fernandez de Corres L. Allergic reactions to betalactams: studies in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin. *Allergy* 1994; 49(2): 108-113.

Auquier-Dunant A, Mockenhaupt M, Naldi L, Correia O, Schroder W, Roujeau JC. Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: results of an international prospective study. *Arch Dermatol* 2002; 138(8): 1019-1024.

Baldo BA. Penicillins and cephalosporins as allergens--structural aspects of recognition and cross-reactions. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(6): 744-749.

Barbaud A, Reichert-Penetrat S, Trechot P, Jacquin-Petit MA, Ehlinger A, Noirez V, Faure GC, Schmutz JL, Bene MC. The use of skin testing in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. *Br J Dermatol* 1998; 139(1): 49-58.

Barbaud AM, Bene MC, Schmutz JL, Ehlinger A, Weber M, Faure GC. Role of delayed cellular hypersensitivity and adhesion molecules in amoxicillin-induced morbilliform rashes. *Arch Dermatol* 1997; 133(4): 481-486.

Barker AN. Allergic Reactions to Penicillin. *Lancet* 1945; 245(6337): 177-178.

Beeler A, Engler O, Gerber BO, Pichler WJ. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2): 455-462.

Beeler A, Zaccaria L, Kawabata T, Gerber BO, Pichler WJ. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2008; 63(2): 181-188.

Betrosian AP, Douzinas EE. Ampicillin-sulbactam: an update on the use of parenteral and oral forms in bacterial infections. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5(9): 1099-1112.

Bigby M, Jick S, Jick H, Arndt K. Drug-induced cutaneous reactions. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15,438 consecutive inpatients, 1975 to 1982. *JAMA* 1986; 256(24): 3358-3363.

Bircher AJ. *Arzneimittelallergie und Haut*. Stuttgart: Thieme, 1996.

Bircher AJ, Scherer K. Delayed cutaneous manifestations of drug hypersensitivity. *Med Clin North Am* 2010; 94(4): 711-725.

Blanca-Lopez N, Zapatero L, Alonso E, Torres MJ, Fuentes V, Martinez-Molero MI, Blanca M. Skin testing and drug provocation in the diagnosis of nonimmediate reactions to aminopenicillins in children. *Allergy* 2009; 64(2): 229-233.

Bloom BR, Salgame P, Diamond B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 1992; 13(4): 131-136.

Borch JE, Andersen KE, Bindslev-Jensen C. The prevalence of suspected and challenge-verified penicillin allergy in a university hospital population. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98(4): 357-362.

Bordignon V, Palamara F, Cordiali-Fei P, Vento A, Aiello A, Picardo M, Ensoli F, Cristaudo A. Nickel, palladium and rhodium induced IFN-gamma and IL-10 production as assessed by in vitro ELISpot-analysis in contact dermatitis patients. *BMC Immunol* 2008; 9(19).

Bousquet PJ, Pipet A, Bousquet-Rouanet L, Demoly P. Oral challenges are needed in the diagnosis of beta-lactam hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(1): 185-190.

Bullens DM, Kasran A, Peng X, Lorre K, Ceuppens JL. Effects of anti-IL-4 receptor monoclonal antibody on in vitro T cell cytokine levels: IL-4 production by T cells from non-atopic donors. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(3): 320-326.

Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology*. Hoboken: Wiley Blackwell, 2010.

Caproni M, Torchia D, Schincaglia E, Volpi W, Frezzolini A, Schena D, Marzano A, Quagliano P, De Simone C, Parodi A, Barletta E, Fabbri P. Expression of cytokines and chemokine receptors in the cutaneous lesions of erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 2006a; 155(4): 722-728.

Caproni M, Torchia D, Schincaglia E, Volpi W, Frezzolini A, Schena D, Marzano A, Quagliano P, De Simone C, Parodi A, Barletta E, Fabbri P. The CD40/CD40 ligand system is expressed in the cutaneous lesions of erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis spectrum. *Br J Dermatol* 2006b; 154(2): 319-324.

Choy Kok C, Schwenger GT, Osmond RIW, Urwin DL, Sanderson CJ. Interleukin-5. In: Thomson AW, Lotze MT, Hrsg. *The Cytokine Handbook*. Amsterdam: Academic Press, 2003; 263-280.

Chung WH, Hung SI, Yang JY, Su SC, Huang SP, Wei CY, Chin SW, Chiou CC, Chu SC, Ho HC, Yang CH, Lu CF, Wu JY, Liao YD, Chen YT. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nat Med* 2008; 14(12): 1343-1350.

Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 1994; 15(12): 575-581.

Coombs RRA, Gell PGH. The classification of allergic reactions underlying disease. In: Gell PGH, Coombs RRA, Hrsg. *Clinical Aspects of Immunology*. Oxford: Blackwell, 1963; 317-337.

Cornejo-Garcia JA, Fernandez TD, Torres MJ, Carballo M, Hernan I, Antunez C, Blanca M, Mayorga C. Differential cytokine and transcription factor expression in patients with allergic reactions to drugs. *Allergy* 2007; 62(12): 1429-1438.

Cote B, Wechsler J, Bastuji-Garin S, Assier H, Revuz J, Roujeau JC. Clinicopathologic correlation in erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome. *Arch Dermatol* 1995; 131(11): 1268-1272.

Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods* 2006; 38(4): 274-282.

Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988; 110(1): 29-36.

Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 109-121.

de Haan P, Bruynzeel DP, van Ketel WG. Onset of penicillin rashes: relation between type of penicillin administered and type of immune reactivity. *Allergy* 1986; 41(1): 75-78.

Demoly P, Kropf R, Bircher A, Pichler WJ. Drug hypersensitivity: questionnaire. EAACI interest group on drug hypersensitivity. *Allergy* 1999; 54(9): 999-1003.

Demoly P, Romano A, Botelho C, Bousquet-Rouanet L, Gaeta F, Silva R, Rumi G, Rodrigues CJ, Bousquet PJ. Determining the negative predictive value of provocation tests with beta-lactams. *Allergy* 2010; 65(3): 327-332.

Depta JP, Pichler WJ. Cross-reactivity with drugs at the T cell level. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3(4): 261-267.

Dickel H, Kamphowe J, Geier J, Altmeyer P, Kuss O. Strip patch test vs. conventional patch test: investigation of dose-dependent test sensitivities in nickel- and chromium-sensitive subjects. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(9): 1018-1025.

Dickel H, Kreft B, Kuss O, Worm M, Soost S, Brasch J, Pflutzner W, Grabbe J, Angelova-Fischer I, Elsner P, Fluhr J, Altmeyer P, Geier J. Increased sensitivity of patch testing by standardized tape stripping beforehand: a multicentre diagnostic accuracy study. *Contact Dermatitis* 2010; 62(5): 294-302.

Diepgen TL, Fartasch M, Hornstein OP. Kriterien zur Beurteilung der atopischen Hautdiathese. *Dermatosen* 1991; 3: 79-83.

Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* 2000; 356(9237): 1255-1259.

Ekerfelt C, Ernerudh J, Jenmalm MC. Detection of spontaneous and antigen-induced human interleukin-4 responses in vitro: comparison of ELISPOT, a novel ELISA and real-time RT-PCR. *J Immunol Methods* 2002; 260(1-2): 55-67.

El Bassam S, Pinsonneault S, Kornfeld H, Ren F, Menezes J, Laberge S. Interleukin-16 inhibits interleukin-13 production by allergen-stimulated blood mononuclear cells. *Immunology* 2006; 117(1): 89-96.

Ewen C, Baca-Estrada ME. Evaluation of interleukin-4 concentration by ELISA is influenced by the consumption of IL-4 by cultured cells. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21(1): 39-43.

Fazekas de St Groth S, Webster RG. Disquisitions of Original Antigenic Sin. I. Evidence in man. *J Exp Med* 1966; 124(3): 331-345.

Fernandes MF, de Mello JF, Pires MC, Vizeu MC. Comparative study of patch test using traditional method vs. prior skin abrading. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21(10): 1351-1359.

Fernandez TD, Canto G, Blanca M. Molecular mechanisms of maculopapular exanthema. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22(3): 272-278.

Fernandez TD, Mayorga C, Torres MJ, Cornejo-Garcia JA, Lopez S, Chaves P, Rondon C, Blanca M. Cytokine and chemokine expression in the skin from patients with maculopapular exanthema to drugs. *Allergy* 2008; 63(6): 712-719.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Path* 1929; 10: 226-236.

Fregert S. *Manual of Contact Dermatitis*. Copenhagen: Munksgaard, 1981.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13(1): 114-119.

Gaspard I, Guinépain MT, Laurent J, Bachot N, Kerdine S, Bertoglio J, Pallardy M, Lebrech H. 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* 2000; 20(2): 107-116.

Gomes E, Cardoso MF, Praca F, Gomes L, Marino E, Demoly P. Self-reported drug allergy in a general adult Portuguese population. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(10): 1597-1601.

Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(4): 309-316.

Gonzalez-Delgado P, Blanes M, Soriano V, Montoro D, Loeda C, Niveiro E. Erythema multiforme to amoxicillin with concurrent infection by Epstein-Barr virus. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2006; 34(2): 76-78.

Gruchalla RS. 10. Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl): 548-559.

Halevy S, Cohen AD, Grossman N. Clinical implications of in vitro drug-induced interferon gamma release from peripheral blood lymphocytes in cutaneous adverse drug reactions. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52(2): 254-261.

Hari Y, Frutig-Schnyder K, Hurni M, Yawalkar N, Zanni MP, Schnyder B, Kappeler A, von Greyerz S, Braathen LR, Pichler WJ. T cell involvement in cutaneous drug eruptions. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(9): 1398-1408.

Hari Y, Urwyler A, Hurni M, Yawalkar N, Dahinden C, Wendland T, Braathen LR, Matter L, Pichler WJ. Distinct serum cytokine levels in drug- and measles-induced exanthema. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120(3): 225-229.

Harr T, French LE. Severe cutaneous adverse reactions: acute generalized exanthematous pustulosis, toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Med Clin North Am* 2010; 94(4): 727-742.

Hausmann O, Schnyder B, Pichler WJ. Drug hypersensitivity reactions involving skin. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 196: 29-55.

Helms T, Boehm BO, Asaad RJ, Trezza RP, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Direct visualization of cytokine-producing recall antigen-specific CD4 memory T cells in healthy individuals and HIV patients. *J Immunol* 2000; 164(7): 3723-3732.

Hertl M, Bohlen H, Jugert F, Boecker C, Knaup R, Merk HF. Predominance of epidermal CD8+ T lymphocytes in bullous cutaneous reactions caused by beta-lactam antibiotics. *J Invest Dermatol* 1993; 101(6): 794-799.

Hertl M, Jugert F, Merk HF. CD8+ dermal T cells from a sulphamethoxazole-induced bullous exanthem proliferate in response to drug-modified liver microsomes. *Br J Dermatol* 1995; 132(2): 215-220.

Hunziker T, Bruppacher R, Kuenzi UP, Maibach R, Braunschweig S, Halter F, Hoigne RV. Classification of ADRs: a proposal for harmonization and differentiation based on the experience of the Comprehensive Hospital Drug Monitoring Bern/St. Gallen, 1974-1993. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2002; 11(2): 159-163.

Jakobson E, Masjedi K, Ahlborg N, Lundeberg L, Karlberg AT, Scheynius A. Cytokine production in nickel-sensitized individuals analysed with enzyme-linked immunospot assay: possible implication for diagnosis. *Br J Dermatol* 2002; 147(3): 442-449.

Janetzki S, Cox JH, Oden N, Ferrari G. Standardization and validation issues of the ELISPOT assay. *Methods Mol Biol* 2005; 302: 51-86.

Janetzki S, Schaed S, Blachere NE, Ben Porat L, Houghton AN, Panageas KS. Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability of results. *J Immunol Methods* 2004; 291(1-2): 175-183.

Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5): 832-836.

Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011; 11(2): 139-145.

Kalyuzhny A, Stark S. A simple method to reduce the background and improve well-to-well reproducibility of staining in ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 2001; 257(1-2): 93-97.

Kammerer R, Chvatchko Y, Kettner A, Dufour N, Corradin G, Spertini F. Modulation of T-cell response to phospholipase A2 and phospholipase A2-derived peptides by conventional bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(1): 96-103.

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* 2007; 62(12): 1439-1444.

Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, Bredt BM, Epling L, Ronquillo R, Varma A, Deeks SG, McCune JM, Nixon DF, Sinclair E. Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* 2003; 283(1-2): 141-153.

Kerr JR. Penicillin allergy: a study of incidence as reported by patients. *Br J Clin Pract* 1994; 48(1): 5-7.

Khalil G, El Sabban M, Al Ghadban S, Azzi S, Shamra S, Khalife S, Maroun R. Cytokine expression profile of sensitized human T lymphocytes following in vitro stimulation with amoxicillin. *Eur Cytokine Netw* 2008; 19(3): 131-141.

Klenerman P, Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 1998; 394(6692): 482-485.

Kokuba H, Aurelian L, Burnett J. Herpes simplex virus associated erythema multiforme (HAEM) is mechanistically distinct from drug-induced erythema multiforme: interferon-gamma is expressed in HAEM lesions and tumor necrosis factor-alpha in drug-induced erythema multiforme lesions. *J Invest Dermatol* 1999; 113(5): 808-815.

Kuechler PC, Britschgi M, Schmid S, Hari Y, Grabscheid B, Pichler WJ. Cytotoxic mechanisms in different forms of T-cell-mediated drug allergies. *Allergy* 2004; 59(6): 613-622.

Lammintausta K, Kortekangas-Savolainen O. The usefulness of skin tests to prove drug hypersensitivity. *Br J Dermatol* 2005; 152(5): 968-974.

Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J Exp Med* 1935; 61(5): 643-656.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(3): 326-332.

- Levine BB. Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man. *N Engl J Med* 1966; 275(20): 1115-1125.
- Lewis JJ, Janetzki S, Schaed S, Panageas KS, Wang S, Williams L, Meyers M, Butterworth L, Livingston PO, Chapman PB, Houghton AN. Evaluation of CD8(+) T-cell frequencies by the Elispot assay in healthy individuals and in patients with metastatic melanoma immunized with tyrosinase peptide. *Int J Cancer* 2000; 87(3): 391-398.
- Lindemann M, Bohmer J, Zabel M, Grosse-Wilde H. ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(7): 992-998.
- Lindemann M, Rietschel F, Zabel M, Grosse-Wilde H. Detection of chromium allergy by cellular in vitro methods. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(9): 1468-1475.
- Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT, Gerber BO, Pichler WJ. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2009a; 64(9): 1269-1278.
- Lochmatter P, Zawodniak A, Pichler WJ. In vitro tests in drug hypersensitivity diagnosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009b; 29(3): 537-554.
- Lode H, Hampel B, Bruckner G, Koeppe P. The pharmacokinetics of sultamicillin. *APMIS Suppl* 1989; 5: 17-22.
- Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(4): 532-562.
- Luque I, Leyva L, Jose TM, Rosal M, Mayorga C, Segura JM, Blanca M, Juarez C. In vitro T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy* 2001; 56(7): 611-618.
- Lyons C. Penicillin Therapy of Surgical Infections in the U. S. Army: A Report. *JAMA* 1943; 123(16): 1007-1018.
- Ma LL, Spurrell JC, Wang JF, Neely GG, Epelman S, Krensky AM, Mody CH. CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol* 2002; 169(10): 5787-5795.
- MacLaughlin EJ, Saseen JJ, Malone DC. Costs of beta-lactam allergies: selection and costs of antibiotics for patients with a reported beta-lactam allergy. *Arch Fam Med* 2000; 9(8): 722-726.
- Macy E, Mangat R, Burchette RJ. Penicillin skin testing in advance of need: multiyear follow-up in 568 test result-negative subjects exposed to oral penicillins. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(5): 1111-1115.
- Macy E, Richter PK, Falkoff R, Zeiger R. Skin testing with penicilloate and penilloate prepared by an improved method: amoxicillin oral challenge in patients with negative skin test responses to penicillin reagents. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(5): 586-591.
- Malkusch W. High resolution as a key feature to perform accurate ELISPOT measurements using Zeiss KS ELISPOT readers. *Methods Mol Biol* 2005; 302: 133-150.
- Margolis RJ, Tonnesen MG, Harrist TJ, Bhan AK, Wintroub BU, Mihm MC, Jr., Soter NA. Lymphocyte subsets and Langerhans cells/indeterminate cells in erythema multiforme. *J Invest Dermatol* 1983; 81(5): 403-406.
- Martin M, Wurpts G, Ott H, Baron JM, Erdmann S, Merk HF, Sachs B. In vitro detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry. *Allergy* 2010; 65(1): 32-39.
- Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, Goebeler M. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2011; 66(9): 1152-1163.

- Masjedi K, Ahlborg N, Gruvberger B, Bruze M, Karlberg AT. Methylisothiazolinones elicit increased production of both T helper (Th)1- and Th2-like cytokines by peripheral blood mononuclear cells from contact allergic individuals. *Br J Dermatol* 2003; 149(6): 1172-1182.
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-1045.
- Mauri-Hellweg D, Zanni M, Frei E, Bettens F, Brander C, Mauri D, Padovan E, Weltzien HU, Pichler WJ. Cross-reactivity of T cell lines and clones to beta-lactam antibiotics. *J Immunol* 1996; 157(3): 1071-1079.
- Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol* 2003; 4(1): 78-86.
- Mikami C, Ochiai K, Umemiya K, Matsumura R, Kagami M, Tomioka H, Sato Y, Tanabe E. Eosinophil activation and in situ interleukin-5 production by mononuclear cells in skin lesions of patients with drug hypersensitivity. *J Dermatol* 1999; 26(10): 633-639.
- Minang JT, Ahlborg N, Troye-Blomberg M. A simplified ELISpot assay protocol used for detection of human Interleukin-4, Interleukin-13 and Interferon- γ production in response to the contact allergen nickel. *Exogen Dermatol* 2003; 2: 306-313.
- Minang JT, Arestrom I, Ahlborg N. ELISpot displays a better detection over ELISA of T helper (Th) 2-type cytokine-production by ex vivo-stimulated antigen-specific T cells from human peripheral blood. *Immunol Invest* 2008; 37(4): 279-291.
- Minang JT, Arestrom 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* 2006; 146(3): 417-426.
- Minang JT, 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* 2005; 62(3): 289-296.
- Miranda A, Blanca M, Vega JM, Moreno F, Carmona MJ, Garcia JJ, Segurado E, Justicia JL, Juarez C. Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(3): 671-677.
- Mockenhaupt M. Severe drug-induced skin reactions: clinical pattern, diagnostics and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7(2): 142-160.
- Moreno E, Macias E, Davila I, Laffond E, Ruiz A, Lorente F. Hypersensitivity reactions to cephalosporins. *Expert Opin Drug Saf* 2008; 7(3): 295-304.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7): 2348-2357.
- Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- Naisbitt DJ, Gordon SF, Pirmohamed M, Burkhart C, Cribb AE, Pichler WJ, Park BK. Antigenicity and immunogenicity of sulphamethoxazole: demonstration of metabolism-dependent haptentation and T-cell proliferation in vivo. *Br J Pharmacol* 2001; 133(2): 295-305.
- Nassif A, Bensussan A, Boumsell L, Deniaud A, Moslehi H, Wolkenstein P, Bagot M, Roujeau JC. Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drug-specific cytotoxic T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(5): 1209-1215.
- Neukomm CB, Yawalkar N, Helbling A, Pichler WJ. T-cell reactions to drugs in distinct clinical manifestations of drug allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001; 11(4): 275-284.

Nishio D, Izu K, Kabashima K, Tokura Y. T cell populations propagating in the peripheral blood of patients with drug eruptions. *J Dermatol Sci* 2007; 48(1): 25-33.

Novalbos A, Sastre J, Cuesta J, de las Heras M, Lluch-Bernal M, Bombin C, Quirce S. Lack of allergic cross-reactivity to cephalosporins among patients allergic to penicillins. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(3): 438-443.

Nugent JS, Quinn JM, McGrath CM, Hrcir DE, Boleman WT, Freeman TM. Determination of the incidence of sensitization after penicillin skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90(4): 398-403.

Nyfeler B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 1997; 27(2): 175-181.

O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010; 327(5969): 1098-1102.

Osawa J, Naito S, Aihara M, Kitamura K, Ikezawa Z, Nakajima H. Evaluation of skin test reactions in patients with non-immediate type drug eruptions. *J Dermatol* 1990; 17(4): 235-239.

Padial A, Antunez C, Blanca-Lopez N, Fernandez TD, Cornejo-Garcia JA, Mayorga C, Torres MJ, Blanca M. Non-immediate reactions to beta-lactams: diagnostic value of skin testing and drug provocation test. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(5): 822-828.

Padovan E, Bauer T, Tongio MM, Kalbacher H, Weltzien HU. Penicilloyl peptides are recognized as T cell antigenic determinants in penicillin allergy. *Eur J Immunol* 1997; 27(6): 1303-1307.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357(9270): 1777-1789.

Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(10): 4538-4542.

Perez A, Cabrerizo S, de Barrio M, Diaz MP, Herrero T, Tornero P, Baeza ML. Erythema-multiforme-like eruption from amoxicillin and allopurinol. *Contact Dermatitis* 2001; 44(2): 113-114.

Perez-Inestrosa E, Suau R, Montanez MI, Rodriguez R, Mayorga C, Torres MJ, Blanca M. Cephalosporin chemical reactivity and its immunological implications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(4): 323-330.

Perkins NJ, Schisterman EF. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *Am J Epidemiol* 2006; 163(7): 670-675.

Pichler WJ. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2(4): 301-305.

Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med* 2003; 139(8): 683-693.

Pichler WJ, Adam J, Daubner B, Gentinetta T, Keller M, Yerly D. Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. *Med Clin North Am* 2010; 94(4): 645-664.

Pichler WJ, Daubner B, Kawabata T. Drug hypersensitivity: flare-up reactions, cross-reactivity and multiple drug hypersensitivity. *J Dermatol* 2011; 38(3): 216-221.

Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004; 59(8): 809-820.

Porebski G, Gschwend-Zawodniak A, Pichler WJ. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(4): 461-470.

Posadas SJ, Leyva L, Torres MJ, Rodriguez JL, Bravo I, Rosal M, Fernandez J, Juarez C, Blanca M. Subjects with allergic reactions to drugs show in vivo polarized patterns of cytokine expression depending on the chronology of the clinical reaction. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(4): 769-776.

Posadas SJ, Padial A, Torres MJ, Mayorga C, Leyva L, Sanchez E, Alvarez J, Romano A, Juarez C, Blanca M. Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and Fas-L to be related to disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 2002a; 109(1): 155-161.

Posadas SJ, Torres MJ, Mayorga C, Juarez C, Blanca M. Gene expression levels of cytokine profile and cytotoxic markers in non-immediate reactions to drugs. *Blood Cells Mol Dis* 2002b; 29(2): 179-189.

Przybilla B, Aberer W, Bircher AJ, Brehler R, Brockow K, Dickel H, Fuchs T, Hertl M, Mockenhaupt M, Pfaar O, Ring J, Sachs B, Vieluf D, Wedi B, Worm M, Zuberbier T, Merk HF. Allergological approach to drug hypersensitivity reactions. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6(3): 240-243.

Pyle HD, Rattner H. Contact Dermatitis from Penicillin. *JAMA* 1944; 125(13): 903.

Quaglino P, Caproni M, Osella-Abate S, Torchia D, Comessatti A, Del Bianco E, Antiga E, Frezzolini A, Schena D, Marzano A, De Simone C, Parodi A, Fabbri P, Bernengo MG. Serum interleukin-13 levels are increased in patients with Stevens-Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis but not in those with erythema multiforme. *Br J Dermatol* 2008; 158(1): 184-186.

Rawlins MD, Thompson JW. Pathogenesis of adverse drug reactions. In: Davies DM, Hrsg. Textbook of adverse drug reactions. Oxford: Oxford University Press, 1977; 10-31.

Riezzo I, Bello S, Neri M, Turillazzi E, Fineschi V. Ceftriaxone intradermal test-related fatal anaphylactic shock: a medico-legal nightmare. *Allergy* 2010; 65(1): 130-131.

Ring J. *Angewandte Allergologie*. München: Urban & Vogel GmbH, 2007.

Rodilla EM, Gonzalez ID, Yges EL, Bellido FJ, Bara MT, Toledano FL. Immunological aspects of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6(5): 789-800.

Romano A, Blanca M, Torres MJ, Bircher A, Aberer W, Brockow K, Pichler WJ, Demoly P. Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy* 2004; 59(11): 1153-1160.

Romano A, Di Fonso M, Papa G, Pietrantonio F, Federico F, Fabrizi G, Venuti A. Evaluation of adverse cutaneous reactions to aminopenicillins with emphasis on those manifested by maculopapular rashes. *Allergy* 1995; 50(2): 113-118.

Romano A, Viola M, Mondino C, Pettinato R, Di Fonso M, Papa G, Venuti A, Montuschi P. Diagnosing nonimmediate reactions to penicillins by in vivo tests. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129(2): 169-174.

Roujeau JC. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis are severity variants of the same disease which differs from erythema multiforme. *J Dermatol* 1997; 24(11): 726-729.

Roujeau JC, Albengres E, Moritz S, Piacentino A, Cuny M, Revuz J, Touraine R. Lymphocyte transformation test in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 78(1): 22-24.

Rozieres A, Hennino A, Rodet K, Gutowski MC, Gunera-Saad N, Berard F, Cozon G, Bienvenu J, Nicolas JF. Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy. *Allergy* 2009; 64(4): 534-542.

Rzany B, Hering O, Mockenhaupt M, Schroder W, Goertler E, Ring J, Schopf E. Histopathological and epidemiological characteristics of patients with erythema exudativum multiforme major, Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 1996; 135(1): 6-11.

Sachs B, Al Masaoudi T, Merk HF, Erdmann S. Combined in vivo and in vitro approach for the characterization of penicillin-specific polyclonal lymphocyte reactivity: tolerance tests with safe penicillins instead of challenge with culprit drugs. *Br J Dermatol* 2004; 151(4): 809-816.

Sachs B, Erdmann S, Malte BJ, Neis M, Al Masaoudi T, Merk HF. 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* 2002; 32(5): 736-744.

Sachs B, Merk HF. Drug allergies. Clinical aspects, pathophysiology and treatment of cutaneous manifestations. *Hautarzt* 2005; 56(1): 8-15.

Sachs B, Renn C, Al Masaoudi T, Merk HF. Fenoterol-induced erythema exudativum multiforme-like exanthem: demonstration of drug-specific lymphocyte reactivity in vivo and in vitro. *Acta Derm Venereol* 2001; 81(5): 368-369.

Sala CA, Labrador-Horrillo M, Guilarte M, Luengo O, Cardona V. Generalised delayed desquamative exanthema after intradermal testing with betalactam antibiotics. *Allergy* 2011; 66(5): 702-703.

Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; 254(5029): 279-282.

Schneider CH, De Weck AL. A new chemical spect of penicillin allergy: the direct reaction of penicillin with epsilon-amino-groups. *Nature* 1965; 208(5005): 57-59.

Schnyder B, Mauri-Hellweg D, Zanni M, Bettens F, Pichler WJ. Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alphabeta T cell clones. *J Clin Invest* 1997; 100(1): 136-141.

Schnyder B, Pichler WJ. Skin and laboratory tests in amoxicillin- and penicillin-induced morbilliform skin eruption. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(4): 590-595.

Schnyder B, Pichler WJ. Mechanisms of drug-induced allergy. *Mayo Clin Proc* 2009; 84(3): 268-272.

Schreiber GH, Schreiber RD. Interferon- γ . In: Thomson AW, Lotze MT, Hrsg. *The Cytokine Handbook*. Amsterdam: Academic Press, 2003; 567-601.

Sedgwick JD, Holt PG. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 57(1-3): 301-309.

Seguin B, Uetrecht J. The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3(4): 235-242.

Silva R, Cruz L, Botelho C, Cadinha S, Castro E, Rodrigues J, Castel-Branco MG. Work up of patients with history of beta-lactam hypersensitivity. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2009; 37(4): 193-197.

Spier HW, Sixt I. Untersuchungen über die Abhängigkeit des Ausfalles der Ekzem-Läppchenproben von der Hornschichtdicke. *Hautarzt* 1955; 6(4): 152-159.

Spiewak R, Moed H, von Blomberg BM, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. Allergic contact dermatitis to nickel: modified in vitro test protocols for better detection of allergen-specific response. *Contact Dermatitis* 2007; 56(2): 63-69.

Surtees SJ, Stockton MG, Gietzen TW. Allergy to penicillin: fable or fact? *BMJ* 1991; 302(6784): 1051-1052.

Tassignon J, Burny W, Dahmani S, Zhou L, Stordeur P, Byl B, De Groote D. Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. *J Immunol Methods* 2005; 305(2): 188-198.

Terrados S, Blanca M, Garcia J, Vega J, Torres MJ, Carmona MJ, Miranda A, Moya M, Juarez C, Fernandez J. Nonimmediate reactions to betalactams: prevalence and role of the different penicillins. *Allergy* 1995; 50(7): 563-567.

Tokura Y, Mori T, Hino R. Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases. *J UOEH* 2010; 32(4): 317-328.

Torres MJ, Blanca M. The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavams. *Med Clin North Am* 2010; 94(4): 805-820.

Torres MJ, Mayorga C, Fernandez TD, Cornejo-Garcia JA, Antunez C, Valenzuela M, Del Prado MF, Rodriguez-Pena R, Blanca M. T cell assessment in allergic drug reactions during the acute phase according to the time of occurrence. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19(1): 119-130.

Torres MJ, Sanchez-Sabate E, Alvarez J, Mayorga C, Fernandez J, Padial A, Cornejo-Garcia JA, Bellon T, Blanca M. Skin test evaluation in nonimmediate allergic reactions to penicillins. *Allergy* 2004; 59(2): 219-224.

Trautmann A. *Allergiediagnose, Allergietherapie*. Stuttgart: Thieme, 2006.

Trcka J, Schäd SG, Pfeuffer P, Raith P, Bröcker E-B, Trautmann A. Penicillintherapie trotz Penicillinallergie? Plädoyer für eine allergologische Diagnostik bei Verdacht auf Penicillinallergie. *Deutsches Ärzteblatt* 2004; 101(43): 2888-2892.

Trcka J, Seitz CS, Bröcker EB, Gross GE, Trautmann A. Aminopenicillin-induced exanthema allows treatment with certain cephalosporins or phenoxymethyl penicillin. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(1): 107-111.

Tuomela M, Stanescu I, Krohn K. Validation overview of bio-analytical methods. *Gene Ther* 2005; 12(Suppl 1): 131-138.

Valyasevi MA, Van Dellen RG. Frequency of systematic reactions to penicillin skin tests. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85(5): 363-365.

von Greyerz S, Bultemann G, Schnyder K, Burkhart C, Lotti B, Hari Y, Pichler WJ. Degeneracy and additional alloreactivity of drug-specific human alpha beta(+) T cell clones. *Int Immunol* 2001; 13(7): 877-885.

von Pirquet C. *Allergie*. *Münch Med Wochenschr* 1906; 53: 1457-1458.

Wahlkvist H, Masjedi K, Gruvberger B, Zuber B, Karlberg AT, Bruze M, Ahlborg N. The lipophilic hapten parthenolide induces interferon-gamma and interleukin-13 production by peripheral blood-derived CD8+ T cells from contact allergic subjects in vitro. *Br J Dermatol* 2008; 158(1): 70-77.

Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 2009; 1(1): 20-36.

Warrington RJ, Tse KS. Lymphocyte transformation studies in drug hypersensitivity. *Can Med Assoc J* 1979; 120(9): 1089-1094.

Watson J, Trechot P, Loss-Ayav C, Schmutz JL, Barbaud A. Negative predictive value of drug skin tests in investigating cutaneous adverse drug reactions. *Br J Dermatol* 2009; 160(4): 786-794.

Weber-Mani U, Pichler WJ. Anaphylactic shock after intradermal testing with betalactam antibiotics. *Allergy* 2008; 63(6): 785.

Weiss AJ. Membranes and membrane plates used in ELISPOT. *Methods Mol Biol* 2005; 302: 33-50.

WHO. International drug monitoring: the role of national centres. Report of a WHO meeting. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1972; 498: 1-25.

- Wills-Karp M, Finkelman FD. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal* 2008; 1(51): pe55.
- Wolkenstein P, Chosidow O, Flechet ML, Robbiola O, Paul M, Dume L, Revuz J, Roujeau JC. Patch testing in severe cutaneous adverse drug reactions, including Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Contact Dermatitis* 1996; 35(4): 234-236.
- Wyatt JP. Patients' knowledge about their drug allergies. *J Accid Emerg Med* 1996; 13(2): 114-115.
- Yawalkar N, Egli F, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ. Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. *Clin Exp Allergy* 2000a; 30(6): 847-855.
- Yawalkar N, Hari Y, Frutig K, Egli F, Wendland T, Braathen LR, Pichler WJ. T cells isolated from positive epicutaneous test reactions to amoxicillin and ceftriaxone are drug specific and cytotoxic. *J Invest Dermatol* 2000b; 115(4): 647-652.
- Yawalkar N, Pichler WJ. Pathogenesis of drug-induced exanthema. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(1-3): 336-338.
- Yawalkar N, Pichler WJ. Mechanisms of cutaneous drug reactions. *J Dtsch Dermatol Ges* 2004; 2(12): 1013-1023.
- Yawalkar N, Shrikhande M, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ. Evidence for a role for IL-5 and eotaxin in activating and recruiting eosinophils in drug-induced cutaneous eruptions. *J Allergy Clin Immunol* 2000c; 106(6): 1171-1176.
- Zanni MP, von Greyerz S, Schnyder B, Brander KA, Frutig K, Hari Y, Valitutti S, Pichler WJ. HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *J Clin Invest* 1998; 102(8): 1591-1598.
- Zawodniak A, Lochmatter P, Yerly D, Kawabata T, Lerch M, Yawalkar N, Pichler WJ. In vitro detection of cytotoxic T and NK cells in peripheral blood of patients with various drug-induced skin diseases. *Allergy* 2010; 65(3): 376-384.
- Zhao Y, Balato A, Fischelevich R, Chapoval A, Mann DL, Gaspari AA. Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 2009; 161(6): 1301-1306.
- Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39(4): 561-577.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
γ	Gamma
μg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AGEP	Akute generalisierte exanthematische Pustulose
AM	Ampicillin
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
AUC	Area under the curve
AX	Amoxicillin
BCIP/NBT	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat / Nitroblue Tetrazolium
BP	Benzylpenicillin
BSA	Bovine serum albumin
Cef	Ceftriaxon
CD	Cluster of differentiation
CXCL	CXC-Chemokin Ligand
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
DRESS	Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms
ECT	Epikutantest
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEM	Erythema exsudativum multiforme
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot-Assay	Enzyme-linked Immunospot Assay
et al.	et alii
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm, Gravitation
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human leucocyte antigen
ICT	Intrakutantest
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

LTT	Lymphozytentransformationstest
m	Männlich
M	Molarität
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MPE	Makulopapulöses Exanthem
mRNA	Messenger RNA
MTA	Medizinisch-technischer Assistent
n	Anzahl
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	Nicht durchgeführt
NEAA	Non-Essential Amino Acids
neg.	Negativ
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OPT	Orale Provokationstestung
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PHA-L	Phytohemagglutinin-L
pos.	Positiv
PRR	Pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
S-ALP	Streptavidin Alkaline Phosphatase
SI	Stimulationsindex
SJS	Stevens-Johnson Syndrom
T _C	Zytotoxischer T-Lymphozyt
TEN	Toxisch epidermale Nekrolyse
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U/min	Umdrehungen pro Minute
w	Weiblich
WHO	World Health Organization

9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1	Erweiterte Klassifikation der Überempfindlichkeitsreaktionen vom Spättyp gegen Arzneimittel.	6
Abb. 2	Strukturformel des Betalaktamringes.	7
Abb. 3	Testverfahren bei Spättypallergien gegen Arzneimittel.	13
Abb. 4	Prinzip des ELISpot-Assays.	29
Abb. 5	Prinzip der Zelldepletierung mittels MACS.	32
Abb. 6	Nickel-spezifische IL-13 Spots bei Patientin MR unter Verwendung verschiedener Färbungen und ELISpot-Platten.	36
Abb. 7	Vergleich der Nickel-spezifischen Zytokinproduktion unter Verwendung verschiedener ELISpot-Platten.	37
Abb. 8	Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen bei Einsatz von verschiedenen Betalaktam-Konzentrationen im ELISpot-Assay.	41
Abb. 9	ROC-Kurven bei Einsatz von verschiedenen Betalaktam-Konzentrationen im ELISpot-Assay.	43
Abb. 10	Frequenzen Betalaktam-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay.	45
Abb. 11	Allergenspezifische Zytokinprofile der 20 Patienten.	46
Abb. 12	Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem Sensibilisierungsmuster.	48
Abb. 13	Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem Sensibilisierungsmuster bei Patienten, die zuvor ein makulopapulöses Exanthem gehabt entwickelten.	49
Abb. 14	Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und der klinischen Manifestation.	50
Abb. 15	Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem allergieauslösenden Betalaktam.	50
Abb. 16	Zusammenhang zwischen der Zytokinfreisetzung und dem Atopie-Status.	51
Abb. 17	Aminopenicillin-spezifische Zytokinfreisetzung.	52
Abb. 18	Benzylpenicillin-spezifische Zytokinfreisetzung.	53
Abb. 19	Ceftriaxon-spezifische Zytokinfreisetzung.	54

Abb. 20	Spezifische Zytokinfreisetzung bei Patienten, bei denen kreuzreaktive Betalaktam-Antibiotika ähnliche Zytokinprofile hervorriefen (1).	55
Abb. 21	Spezifische Zytokinfreisetzung bei Patienten, bei denen kreuzreaktive Betalaktam-Antibiotika ähnliche Zytokinprofile hervorriefen (2).	56
Abb. 22	Spezifische Zytokinfreisetzung bei Patienten, bei denen kreuzreaktive Betalaktam-Antibiotika abweichende Zytokinprofile hervorriefen.	56
Abb. 23	Frequenzen allergenspezifischer Zellen im ELISpot-Assay bei Einsatz von PBMC, CD8 ^{neg} oder CD4 ^{neg} Zellen.	58
Abb. 24	Allergenspezifische Zytokinprofile der Patienten im ELISpot-Assay bei Einsatz von PBMC, CD8 ^{neg} oder CD4 ^{neg} Zellen.	60
Abb. 25	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des ELISpot-Assays.	62
Abb. 26	Histologische Schnittpräparate von 4 Patienten.	64
Tabelle 1	Klassifizierung von Epikutantestreaktionen.	27
Tabelle 2	Klinische und demographische Daten der Patienten.	38
Tabelle 3	Klinische und demographische Daten der Kontrollpersonen.	39
Tabelle 4	Ergebnisse der allergologischen Hauttestungen und der oralen Provokationstestung.	40
Tabelle 5	Cut-off Werte für die einzelnen Zytokine und Betalaktam-Antibiotika.	44
Tabelle 6	Sensitivität des ELISpot-Assays.	47
Tabelle 7	Spezifität des ELISpot-Assays für die einzelnen Zytokine und Betalaktam-Antibiotika.	54
Tabelle 8	Übereinstimmungsraten der qualitativen Ergebnisse im ELISpot-Assay.	63
Tabelle 9	Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der immunhistochemischen Färbungen.	64
Tabelle 10	Übersicht über Studien, in denen <i>in vitro</i> Testverfahren zur Diagnostik von Arzneimittelallergien eingesetzt wurden.	73

10 VERÖFFENTLICHUNGEN

Abstrakts, angenommen als Posterpräsentationen:

Allergy, June 2009, Volume 64, Issue Supplement S90 (Abstracts of the XXVIII EAACI Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Warszawa, Poland, 6-10 June 2009):

Trcka J, Niemer MA, Schäd SG, Gross G. Cytokine expression profile and quantification of drug-specific T cells in patients with delayed-type hypersensitivity to beta-lactams.

JDDG, April 2011, Volume 9, Issue Supplement S1 (Abstraktband anlässlich der 46. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft Vereinigung Deutschsprachiger Dermatologen e. V. in Dresden vom 30. März bis 2. April 2011):

Niemer MA, Trcka J, Schäd SG, Gross G. Allergologische Diagnostik bei Stevens-Johnson Syndrom: klinische Fallstudie und *in vitro* Untersuchung der Allergen-spezifischen T-Zellen mittels ELISPOT.

Trcka J, Niemer MA, Schäd SG, Trautmann A, Gross G. *In vitro* Allergiediagnostik bei schweren Arzneimittelreaktionen: Pilotstudie zur Untersuchung Allergen-spezifischer T-Zellen mittels ELISPOT bei der Spättypallergie gegen Aminopenicilline.

11 DANKSAGUNGEN

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. Gerd Gross für die Unterstützung und die Möglichkeit zur Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. med. Jiri Trcka für die Einarbeitung in diese interessante allergologische Thematik. Er hat mich in allen Phasen dieser Arbeit mit außergewöhnlichem Engagement, steter Gesprächsbereitschaft und vielen unverzichtbaren Hilfestellungen hervorragend betreut und gefördert. Seine fachliche Unterstützung und sein geduldiges Interesse waren sehr wertvoll bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Susanne Schäd danke ich insbesondere für die Einarbeitung in die ELISpot-Methode und für die Bereitstellung des ELISpot-Readers. Mit zahlreichen fachlichen und motivierenden Diskussionen hat sie ganz entscheidend zur Optimierung der Methode und zur Auswertung der Daten beigetragen. Besonders dankbar bin ich auch für die große Hilfe bei der Auswertung der histologischen Schnitte.

Ganz besonders danke ich allen Patienten und Probanden, die ihr Blut für diese Studie gespendet haben.

Frau Maria Frommhold danke ich für die sorgfältige Durchführung und Dokumentation der Hauttestungen und für die Unterstützung bei der Auswahl der Patienten. Dem Laborteam Frau Bärbel Krüger, Frau Heike Bergmann, Frau Doreen Ogorreck, Frau Monika Thomsen und Frau Rita Nolte danke ich für die nette Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Frau Heike Bergmann danke ich zudem für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Wolf Malkusch der Firma Carl Zeiss Micro Imaging GmbH für die ausführliche und geduldige Einführung in die Handhabung des ELISpot-Readers, der aktualisierten Reader-Software sowie für die schnelle Hilfe bei technischen Problemen.

Frau Dipl.-Math. Helga Krentz vom Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universität Rostock danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Liebe, mit der sie mich durch das Studium begleitet haben. Mit ihrem Verständnis während der Laborarbeiten und der moralischen Unterstützung während des Schreibens haben sie mir die nötige Ruhe und Kraft zur Fertigstellung dieser Arbeit gegeben.

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Lübeck, den 04.07.2013

Maraike Annika Niemer

13 ANHANG

Tabelle i Klinische und demographische Daten der Patienten mit Nickelallergie und der Kontrollpersonen.

Patient	Alter/ Geschlecht	Epikutantest Nickelsulfat	Atopie-Score	Gesamt-IgE (kU/l)
BW	53 / w	+++	7	39,5
CK	77 / w	+++	1	n.d.
AW	55 / w	+++	6	n.d.
MR	47 / w	++	2	n.d.
BS	67 / w	++	5	18,4
TS	43 / m	++	4	n.d.
EW	68 / w	+++	12	33,4
AJ	36 / w	+++	6	n.d.
Kontrollperson				
JT	44 / m	-	8	n.d.
MN	25 / w	-	10	n.d.
LM	27 / w	-	10	n.d.
YE	26 / w	-	3	n.d.
FB	25 / w	-	3	n.d.
SN	25 / w	-	6	n.d.
NH	26 / m	-	?	n.d.
IW	51 / w	-	4	n.d.
SO	23 / w	-	?	n.d.
MT	58 / w	-	11	n.d.

w, weiblich; m, männlich; n.d., nicht durchgeführt.

FRAGEBOGEN – Spättypallergie Arzneimittel

Initialen: **Geburtsdatum:** **Geschlecht:**

Datum:

Menge Blutentnahme:

I. Beschreibung der allergischen Reaktion

01 Wie hat sich die allergische Reaktion manifestiert?

02 Sind Hautreaktionen aufgetreten?

Beschreibung:

Verteilung/Ausdehnung:

Dynamik:

03 Waren Juckreiz/Schmerzen vorhanden?

04 Klassifikation

- 01 Makulopapulöses Exanthem
- 02 Urtikarielles Exanthem
- 03 Fixes Arzneimittlexanthem
- 04 Erythema nodosum
- 05 Erythema exsudativum multiforme, Minorform
- 06 Erythema exsudativum multiforme, Majorform
- 07 Stevens-Johnson Syndrom
- 08 Toxische epidermale Nekrolyse
- 09 DRESS
- 10 AGEP
- 11 Purpura chronica progressiva
- 12 Vaskulitis
- 13 nur Pruritus
- 14 Andere:

05 Begleitfaktoren

- 01 Virale Infektion:
- 02 Bakterielle Infektion:
- 04 Fieber
- 05 Photosensibilisierung
- 06 Stress
- 07 Sport/Training
- 08 Andere:

06 Weitere Symptome

Respiratorische Symptome

- 01 Husten
- 02 Heiserkeit
- 03 Rhinorrhoe
- 04 Nasale Obstruktion
- 05 Dyspnoe

- 06 Bronchospasmus
- 07 Interstitielle oder alveoläre Pneumonitis
- 08 Lungenfibrose
- 09 Lungenödem

Gastrointestinale Symptome

- 10 Nausea
- 11 Emesis
- 12 Diarrhoe

Hämatopoetische Symptome

- 13 Hämolytische Anämie
- 14 Leukopenie
- 15 Thrombozytopenie

Kardiovaskuläre Symptome

- 16 Tachykardie
- 17 Hypotension
- 18 Arrhythmie

Psychische Symptome

- 19 Angst-/Panikreaktion
- 20 Schwindel
- 21 Ohnmacht
- 22 Parästhesie/Hyperventilation
- 23 Schwitzen

Beteiligung anderer Organe

- 24 Leber
- 25 Niere

Andere Symptome

- 26 Fieber
- 27 Lymphadenopathie
- 28 Kopfschmerzen
- 29 Arthralgie/Myalgie
- 30 Ödem
- 31 Malaise

- 07 Welche Medikamente haben Sie eingenommen, als die allergische Reaktionen zum ersten Mal auftraten? (Dosierung, Dosierungsschema, Dauer der Therapie)?
- 08 Applikationsweg?
- 09 Was für ein zeitlicher Zusammenhang bestand zwischen Medikamenteneinnahme und allergischer Reaktion?
- 10 Welche der Medikamente haben sie abgesetzt als die allergischen Reaktionen auftraten?
- 11 Wie wurde die allergische Reaktion therapiert?
- 12 Wie schnell ist eine Besserung eingetreten?
- 13 Haben Sie vorher oder danach nochmals ähnliche Symptome entwickelt?
- 14 Sind ähnliche Symptome einmal ohne Medikamenteneinnahme aufgetreten?
- 15 Haben Sie das verdächtige Medikament oder ein strukturell Verwandtes früher schon eingenommen? Wie oft?
- 16 Haben Sie das verdächtige Medikament oder ein strukturell Verwandtes später nochmals eingenommen und vertragen?
- 17 Haben Sie zur Zeit allergische Reaktionen?

II. Klassifikation zur Wahrscheinlichkeit einer Medikamentenallergie (Nyfeler und Pichler, 1997)

1. Eine (zweite) Provokation mit dem Medikament führte zu einer positiven Reaktion
2. Das gleiche Medikament führte bei Wiedereinnahme zu den gleichen allergischen Reaktionen
3. Klare Anamnese bezüglich Erfahrung mit dem Medikament
4. Spätere Einnahme des Medikamentes führte zu keiner Reaktion
5. Die Symptome passten zu einer pseudoallergischen Reaktion (ausschließlich bezogen auf Urtikaria und Angioödem nach Einnahme von NSAIDs)

Kategorie:

- | | |
|-------------------------|--|
| A ($P > 0,9$) : | Ein Kriterium 1. – 3. erfüllt (sicher) |
| B ($P = 0,5 - 0,9$) : | zeitlich offenkundige Beziehung zwischen Einnahme und Symptomen (wahrscheinlich) |
| C ($P = 0,1 - 0,5$) : | Anamnese unklar, wenig Erfahrung mit dem Medikament (wenig wahrscheinlich) |
| D ($P < 0,1$) : | Kriterium 4. oder 5. erfüllt (ausgeschlossen) |

III. Eigenanamnese18 Rauchen Sie bzw. haben Sie geraucht? (PY) 19 Hauttyp? (I - VI)

- | |
|---|
| I - sehr helle Haut, Sommersprossen, rote Haare, helle Augen |
| II – helle Haut, blonde Haare, helle Augen |
| III – hellbraune Haut, hellbraune bis dunkelbraune Haare, helle oder braune Augen |
| IV – mittelbraune Haut, dunkle Haare, dunkle Augen |
| V – dunkelbraune Haut |
| VI – schwarze Haut |

IV. Erkrankungen

20 Haben Sie weitere allergische Erkrankungen? Seit wann, welche?

21 Sind sonstige allergologische Testungen durchgeführt worden? Welche? Ergebnis?

22 Haben Sie weitere Hauterkrankungen?

23 Haben Sie sonstige Erkrankungen?

V. Familienanamnese

24 Haben Blutsverwandte allergische Erkrankungen? Wer? Was?

VI. Medikamente

25 Welche Medikamente nehmen Sie zur Zeit ein? Seit wann?

26	Haben Sie in den letzten 3 Monaten immunmodulierende Medikamente eingenommen?	<input type="checkbox"/>
VII. Erlanger Atopie-Score, adaptiert nach Diepgen et al. (1991)		
27	Atopische Familienanamnese (Verwandte 1. Grades)	<input type="checkbox"/>
	Ekzeme (2)	
	Rhinitis/Asthma (1)	
28	Beugeneckzem (1)	<input type="checkbox"/>
29	Rhinitis/Konjunktivitis (1)	<input type="checkbox"/>
30	Allergisches Asthma (1)	<input type="checkbox"/>
31	Milchschorf (3)	<input type="checkbox"/>
32	Juckreiz beim Schwitzen (3)	<input type="checkbox"/>
33	Textilunverträglichkeit (1)	<input type="checkbox"/>
34	Metallunverträglichkeit (1)	<input type="checkbox"/>
35	Xerosis cutis (3)	<input type="checkbox"/>
36	Ohrrhagaden (2)	<input type="checkbox"/>
37	Dyshidrose (2)	<input type="checkbox"/>
38	Brustwarzenekzem (2)	<input type="checkbox"/>
39	Perlèche (1)	<input type="checkbox"/>
40	Pulpitis sicca (1)	<input type="checkbox"/>
41	Palmare Hyperlinearität (2)	<input type="checkbox"/>
42	Herthoge Zeichen (2)	<input type="checkbox"/>
43	Weißer Dermographismus (3)	<input type="checkbox"/>
44	„Dirty Neck“ (2)	<input type="checkbox"/>
45	IgE > 150 U/ml (1)	<input type="checkbox"/>
	IgE > 400 U/ml (2)	<input type="checkbox"/>
	Punkte gesamt	<input type="checkbox"/>
	0 – 3: Keine atopische Hautdiathese	
	4 - 9: Atopische Hautdiathese unklar	
	10 – 13: Atopische Hautdiathese wahrscheinlich	
	> 14: Atopische Hautdiathese	

Tabelle ii Frequenzen Betalaktam-spezifischer T-Zellen und Leerwerte im ELISpot-Assay bei Patienten und Kontrollpersonen.

	Leerwert				Ampicillin				Amoxicillin				Benzylpenicillin				Ceftriaxon			
	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13
BH	2	0	0	1	9	6	4	9	18	8	3	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	0	0	1
MW	1	1	0	2	6	32	15	51	11	27	13	35	11	5	2	10	4	0	0	4
HP	3	0	0	3	8	3	1	1	39	9	5	13	94	19	12	45	3	1	0	1
TK	0	0	1	0	14	16	7	11	17	14	5	8	8	5	3	5	1	1	0	0
JS	20	1	1	1	0	8	4	6	0	4	4	6	0	1	0	1	0	0	0	0
EZ	1	1	0	1	1	2	1	1	0	0	2	1	0	1	1	0	1	0	1	1
GS	2	0	0	2	18	12	7	20	18	10	4	20	38	14	10	61	0	1	2	0
CA	3	0	1	1	1	5	4	6	4	8	3	7	7	2	1	4	3	0	2	1
LP	6	2	1	3	2	1	4	1	5	1	2	0	4	0	0	0	5	0	1	0
GH	2	0	0	0	30	20	5	49	32	31	6	56	3	5	0	10	0	1	1	1
WP	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	1	0	0	1	1	0	0	1	2
RJ	4	0	1	1	7	41	14	52	3	43	5	25	10	1	1	12	3	1	1	0
MB	6	2	0	0	5	2	4	9	0	8	2	19	5	0	1	3	2	0	1	1
BA	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	18	1	0	1	13	0	0	0
UB	1	0	0	0	1	1	1	4	1	2	0	7	1	0	1	2	1	2	0	2
BS	1	1	0	0	2	1	1	2	5	0	1	2	0	0	0	2	0	0	1	2
GB	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	4	3	14	0	2	0	1
ES	2	2	1	2	0	1	3	8	0	0	0	2	1	4	3	6	0	1	2	2
HS	3	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	13	0	0	0	1	0	0	0
BH2	0	0	1	0	1	5	1	9	1	4	1	12	0	8	1	14	3	0	0	0
FB	6	1	2	1	2	1	0	0	5	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	0	0
SN	2	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JT	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
HE	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0
JF	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JA	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
MN	2	0	1	2	0	1	1	0	1	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
YE	6	0	1	2	1	0	0	0	4	0	0	3	1	0	0	0	2	0	1	2
RN	2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LM	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
MT	9	1	1	2	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	3	8	0	0	3
JW	2	3	1	3	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
FZ	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
LG	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
KS	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
RW	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
BK	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	0	0	3	0	0	0
ER	1	0	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
GG	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	3	0	1	0
IW	4	0	2	1	0	1	0	0	4	1	1	1	0	0	0	0	2	1	0	3

Für die Betalaktame ist die Zahl spezifischer T-Zellen je 10^6 PBMC aufgeführt, d.h. die Mittelwerte aus drei Bestimmungen nach Abzug des Leerwertes. Die Leerwerte entsprechen den Mittelwerten aus den Zahlen Zytokin-freisetzender Zellen in jeweils drei Wells, in denen PBMC in Kulturmedium inkubiert wurden.

Tabelle iii Frequenzen Betalaktam-spezifischer T-Zellen und Leerwerte bei Patienten und Kontrollpersonen bei Einsatz von PBMC, CD8^{neg} oder CD4^{neg} Zellen im ELISpot-Assay.

		Leerwert				Ampicillin				Amoxicillin				Benzylpenicillin				Ceftriaxon			
		IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13
BH	PBMC	3	0	n.d.	2	0	12	n.d.	10	0	13	n.d.	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	1	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	4	1	n.d.	1	7	16	n.d.	18	0	12	n.d.	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	n.d.	0
	CD4 ^{neg}	4	1	n.d.	1	1	2	n.d.	1	3	3	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	0	n.d.	1
MW	PBMC	19	1	0	8	10	29	12	25	13	26	15	47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	0	0
	CD8 ^{neg}	10	2	1	11	6	42	21	65	17	29	16	47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	1	0	0
	CD4 ^{neg}	5	1	0	2	5	1	2	2	0	1	2	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	0	0
HP	PBMC	17	0	n.d.	1	0	3	n.d.	9	6	8	n.d.	15	15	5	n.d.	22	0	0	n.d.	1
	CD8 ^{neg}	18	0	n.d.	1	0	2	n.d.	10	9	6	n.d.	14	48	6	n.d.	26	0	0	n.d.	0
	CD4 ^{neg}	28	1	n.d.	4	0	0	n.d.	10	15	0	n.d.	16	51	0	n.d.	18	0	0	n.d.	0
GS	PBMC	2	1	n.d.	2	16	4	n.d.	20	15	3	n.d.	6	36	5	n.d.	29	1	0	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	3	1	n.d.	2	22	7	n.d.	34	12	5	n.d.	20	55	6	n.d.	53	0	0	n.d.	1
	CD4 ^{neg}	4	0	n.d.	3	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	7	0	n.d.	5	0	0	n.d.	0
GH	PBMC	1	1	n.d.	1	48	35	n.d.	71	43	28	n.d.	66	8	5	n.d.	13	2	0	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	3	1	n.d.	4	69	42	n.d.	102	41	26	n.d.	77	22	6	n.d.	14	0	0	n.d.	0
	CD4 ^{neg}	7	0	n.d.	1	8	1	n.d.	4	5	1	n.d.	3	3	0	n.d.	2	3	1	n.d.	2
RJ	PBMC	3	0	1	2	12	44	8	28	17	20	6	21	4	6	0	1	0	0	0	0
	CD8 ^{neg}	3	0	1	1	49	53	17	65	7	23	11	35	3	2	2	4	3	2	0	0
	CD4 ^{neg}	5	0	0	3	4	5	4	3	3	5	7	3	0	0	2	0	0	0	0	0
GB	PBMC	0	0	0	0	1	1	1	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	8	1	16	0	0	2	0
	CD8 ^{neg}	0	1	1	0	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	10	1	12	0	0	0	0
	CD4 ^{neg}	0	0	0	0	1	0	1	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	0	0	0	0	0	2	1
BH2	PBMC	5	1	n.d.	1	3	5	n.d.	7	1	1	n.d.	2	0	3	n.d.	8	0	0	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	4	0	n.d.	1	0	7	n.d.	6	0	4	n.d.	2	0	7	n.d.	8	0	1	n.d.	2
	CD4 ^{neg}	1	1	n.d.	1	1	1	n.d.	1	0	0	n.d.	2	1	1	n.d.	2	0	0	n.d.	0
FB	PBMC	2	2	n.d.	1	3	0	n.d.	0	2	1	n.d.	0	4	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	2	1	n.d.	1	2	0	n.d.	0	6	0	n.d.	0	7	0	n.d.	0	6	0	n.d.	0
	CD4 ^{neg}	1	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	0	1	n.d.	0
SN	PBMC	4	1	n.d.	4	3	1	n.d.	0	0	0	n.d.	0	1	1	n.d.	0	0	0	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	8	1	n.d.	0	0	0	n.d.	1	0	0	n.d.	1	0	0	n.d.	2	0	0	n.d.	2
	CD4 ^{neg}	9	0	n.d.	2	2	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	0	1	n.d.	0
JT	PBMC	0	1	n.d.	2	2	0	n.d.	0	3	0	n.d.	0	2	0	n.d.	0	1	1	n.d.	1
	CD8 ^{neg}	2	1	n.d.	3	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0
	CD4 ^{neg}	1	0	n.d.	1	1	0	n.d.	1	0	0	n.d.	0	0	1	n.d.	1	0	0	n.d.	0
MN	PBMC	1	0	1	0	2	0	0	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	0	1	0	1	0	0
	CD8 ^{neg}	0	0	0	1	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1	1	0	0	0	0	0
	CD4 ^{neg}	0	1	1	0	1	0	0	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	0	0	0	0	0	0	0
YE	PBMC	7	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CD8 ^{neg}	13	1	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CD4 ^{neg}	7	0	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
MT	PBMC	9	0	1	0	0	1	0	1	3	0	0	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	0	0
	CD8 ^{neg}	19	2	1	3	0	0	1	0	2	0	1	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	0	0
	CD4 ^{neg}	17	1	1	1	3	0	0	0	1	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	0	0
BK	PBMC	33	0	n.d.	1	0	0	n.d.	0	0	2	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	1	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	4	3	n.d.	5	0	0	n.d.	0	0	1	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	n.d.	0
	CD4 ^{neg}	3	0	n.d.	0	2	0	n.d.	1	2	1	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	0	n.d.	0
HB	PBMC	1	0	n.d.	2	0	0	n.d.	1	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	1	0	n.d.	0
	CD8 ^{neg}	0	0	n.d.	2	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0	1	0	n.d.	0	1	0	n.d.	0
	CD4 ^{neg}	1	1	n.d.	2	1	0	n.d.	0	1	0	n.d.	0	1	0	n.d.	0	0	0	n.d.	0

Für die Betalaktame ist die Zahl spezifischer T-Zellen je 10^6 PBMC aufgeführt, d.h. die Mittelwerte aus drei Bestimmungen nach Abzug des Leerwertes. Die Leerwerte entsprechen den Mittelwerten aus den Zahlen Zytokin-freisetzender Zellen in jeweils drei Wells, in denen PBMC in Kulturmedium inkubiert wurden.

14 THESEN ZUR DISSERTATION

1. Allergische Überempfindlichkeitsreaktionen machen etwa 6-10% aller unerwünschten Arzneimittelreaktionen aus. Damit der Auslöser und mögliche kreuzreaktive Substanzen identifiziert sowie schwere Reaktionen bei einer Reexposition oder unnötige Einschränkungen zukünftiger Therapiemöglichkeiten verhindert werden können, sollte stets eine allergologische Diagnostik erfolgen.
2. Die allergologische Diagnostik von Arzneimittelreaktionen basiert auf den 4 Säulen Anamnese, *in vitro* Test, Hauttest und Provokationstest. Im Gegensatz zu den Soforttypallergien gegen Betalaktame, bei denen mit dem Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum der Patienten ein validierter *in vitro* Test vorliegt, steht bei den Spättypallergien derzeit kein standardisiertes *in vitro* Testsystem mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zur Verfügung. Da der Kontakt mit dem potentiellen Allergen in Haut- und Provokationstests eine Gefahr für den Patienten darstellt und neben unangenehmen Hautreaktionen auch lebensbedrohliche allergische Reaktionen auslösen kann, würde ein *in vitro* Testverfahren zur vorherigen Abschätzung dieser Testrisiken und zur Diagnostik entscheidend beitragen.
3. In der Pathophysiologie der Spättypallergie gegen Arzneimittel nehmen Arzneimittel-spezifische T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle ein. Es bieten sich daher für die *in vitro* Diagnostik Testverfahren an, die auf dem Nachweis verschiedener Effektorfunktionen von T-Zellen basieren.
4. Im Rahmen dieser Studie wurde der ELISpot-Assay, mit welchem antigenspezifische T-Lymphozyten an Hand ihrer Zytokinfreisetzung auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden können, als *in vitro* Testverfahren für den Nachweis von Spättypallergien gegen Betalaktame evaluiert. Er wurde zunächst in Vorversuchen methodisch optimiert und die Cut-off Kriterien für ein positives Testergebnis wurden definiert.
5. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Frequenz Betalaktam-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Spättypallergie gegen Betalaktame während klinischer Remission im ELISpot-Assay bei Messung der Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-5 und IL-13 signifikant größer war als im peripheren Blut von Kontrollpersonen.
6. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei insgesamt 19 von 20 Patienten mit nachgewiesener Betalaktam-Spättypallergie bei mindestens einem Zytokin ein positives Testergebnis im ELISpot-Assay erzielt wird. Hierbei betrug die Sensitivität 40% für IFN- γ , 70% für IL-4 und 65% für IL-5 bzw. IL-13. Durch eine kombinierte Betrachtung mehrerer Zytokine

konnte die Sensitivität zusätzlich deutlich erhöht werden. Die Spezifität lag für die einzelnen Zytokine und Betalaktame zwischen 90 und 100%.

7. Die qualitativen Ergebnisse des ELISpot-Assay waren gut reproduzierbar. Die Reproduzierbarkeit war bei Messung der Typ 2 Zytokine IL-4, IL-5 bzw. IL-13 höher als bei Messung des Typ 1 Zytokins IFN- γ .
8. Die Betalaktam-spezifischen Zytokinprofile waren bei den einzelnen Patienten sehr heterogen. Das individuelle Zytokinmuster blieb jedoch nach Stimulation der PBMC mit unterschiedlichen Betalaktamen erhalten und zeigte keinen eindeutigen Zusammenhang mit der klinischen Manifestation, dem Sensibilisierungsmuster, dem Atopie-Status und dem eingenommenen Betalaktam-Antibiotikum. Es scheint, dass das Zytokinmuster die individuelle Reaktivität der PBMC der einzelnen Patienten widerspiegelt.
9. Eine Depletion CD8^{pos} Zellen mittels MACS führte zu einer gleichbleibenden oder höheren Anzahl Betalaktam-spezifischer Zellen im ELISpot-Assay im Vergleich zu PBMC. Im Gegensatz hierzu war nach einer Depletion CD4^{pos} Zellen fast keine Zytokinproduktion nachweisbar. Die Daten lassen annehmen, dass die CD4^{pos} T-Lymphozyten für die allergenspezifische Zytokinfreisetzung von IFN- γ , IL-4, IL-5 und IL-13 im ELISpot-Assay eine entscheidende Rolle einnehmen. Auch in den immunhistochemischen Färbungen der Hautbiopsate von Patienten waren die Zellen überwiegend CD4^{pos}.
10. Zusammengefasst stellt der ELISpot-Assay ein geeignetes Testverfahren für den *in vitro* Nachweis von Spättypallergien gegen Betalaktame dar. Die Messung von Typ 2 Zytokinen ist aufgrund der höheren Sensitivität und einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Messung von IFN- γ überlegen. Vor einem Einsatz in der klinischen Routine sollten methodische Vereinfachungen vorgenommen und Studien mit größeren Patientenzahlen zur Überprüfung der diagnostischen Wertigkeit sowie zur Validierung und Standardisierung des Assays durchgeführt werden.