



Limfocita transzformációs teszt – Gyógyszerallergiák diagnosztikája



Kiss Mária

**XVIII. MIT-MLDT Laboratóriumi Szakmai Továbbképző Tanfolyam
Budapest, 2015. április 22.**

Gyógyszer által indukált adverz reakciók

- **Ismert mellékhatások – megjósolható reakciók**
 - előfordulás kb. 80 %-ban
 - általában dóziszfüggő
 - a gyógyszer farmakológiai reakciója következtében jön létre

- **Mellékhatások egyéb okok következtében jönnek létre**
(nem megjósolható, nem várt reakciók)
 - nem függ a szer farmakológiai hatásától
 - általában nem dóziszfüggő
 - gyógyszer intolerancia – egyéni érzékenység
 - gyógyszer idioszinkrázia
 - gyógyszer túlérzékenységi reakciók
(Drug Hypersensitivity Reaction)
(DHR)

Demoly P et al.

Position Paper – International consensus (ICON) on drug allergy

Allergy, 69: 420-437 (2014)

A gyógyszer túlérzékenységi reakciók (DHR) definíciója

Olyan gyógyszer mellékhatás, amely klinikailag allergiás reakcióra emlékeztet.

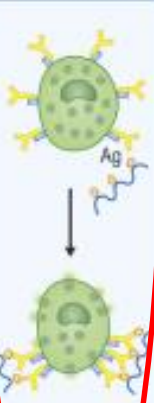


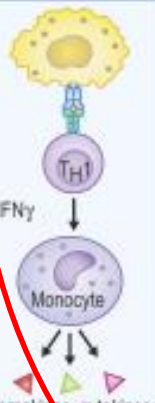
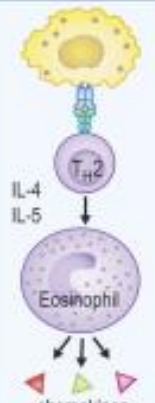
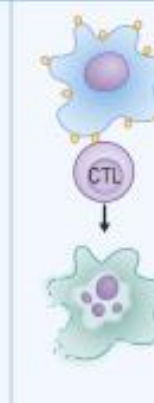
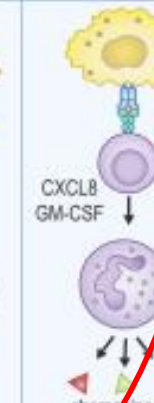
A gyógyszer allergia olyan DHR, amelynél az immunológiai mechanizmus (vagy gyógyszer-specifikus antitest vagy T sejt) kimutatható.

- szenzibilizáció, melynek során gyógyszer-specifikus T sejtek, ill.í bizonyos reakciókban antitestek alakulnak ki**
- specifikus immunológiai memória kialakulása a gyógyszerrel szemben**

Pszeudoallergiás reakciók:

Az allergiás reakció effektor sejtjeit az IgE-n kívül más is aktiválhatja: citokinek, C3a, C5a, PAF, LTB4, opiátok, bázikus peptidek, kontraszt anyagok, stb.

A gyógyszer érzékenység kialakulásának immunmechanizmusai (Módosított Gell-Coombs séma)

	Type I	Type II	Type III	Type IV a	Type IV b	Type IV c	Type IV d
Immune reactant	IgE	IgG	IgG	IFN γ , TNF α (T _H 1 cells)	IL-5, IL-4/IL-13 (T _H 2 cells)	Perforin/ GranzymeB (CTL)	CXCL-8, GM-CSF (T-cells)
Antigen	Soluble antigen	Cell or matrix-associated antigen	Soluble antigen	Antigen presented by cells or direct T cell stimulation	Antigen presented by cells or direct T cell stimulation	Cell-associated antigen or direct T cell stimulation	Soluble antigen presented by cells or direct T cell stimulation
Effector	Mast-cell activation	FcR ⁺ cells (phagocytes, NK cells)	FcR ⁺ cells Complement	Macrophage activation	Eosinophils	T cells	Neutrophils
							
Example of hypersensitivity reaction	Anaphylaxis, allergic rhinitis, asthma (with IVb)	Haemolytic anaemia, thrombocytopenia	Serum sickness, Arthus reaction	Tuberculin reaction, contact dermatitis (with IVc)	Maculopapular exanthema with eosinophilia, Chronic asthma, allergic rhinitis	Contact dermatitis, maculopapular and bullous exanthem, hepatitis	AGEP, Behçet disease, psoriasis

Gyógyszerallergiás reakciók

Korai típusú reakciók



Angioedema



Urticaria

Anaphylaxis shock

(rhinitis, conjunctivitis, bronchospasmus, gastrointestinalis tünetek)

Gyógyszerallergiás reakciók

Késői típusú gyógyszerérzékenység



Erythema exsudativum multiforme



Maculopapulosus exanthema



Stevens-Johnson syndroma



Lyell syndroma/TEN

(késői urticaria, fix gyógyszerexanthema, vasculitis, DRESS syndroma, belső szervek érintettsége bőrtünetekkel vagy anélkül)

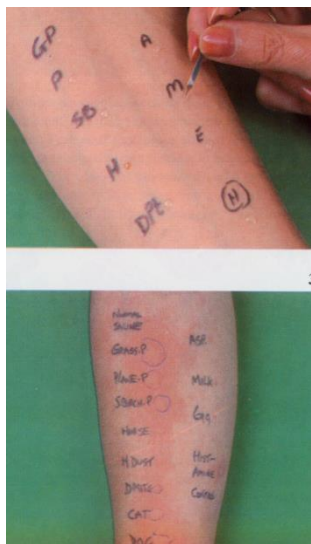
Azonnali típusú gyógyszerérzékenység diagnosztikája

In vivo tesztek

In vitro tesztek

Provokáció

Bőr próbák
prick teszt,
intrademális
teszt

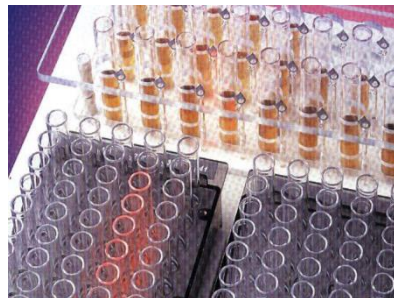


β -laktám antibiotikumok,
izom relaxánsok,
platina sók, heparin

**Proliferáció
limfocita
transzformációs
teszt (LTT)**

In vitro tesztek

**Specifikus
IgE vizsgálatok**
RAST
Immunoassays



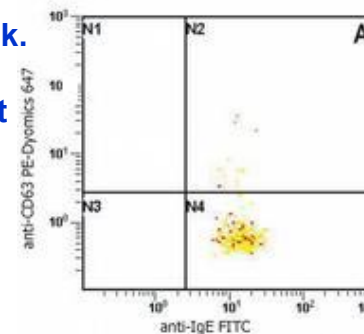
Kevés gyógyszerre létezik.
Nem kellően validált.
Csak a bőrteszttel együtt
meggyőző.

**Hisztamin
felszabadulás**

Drága és bonyolult.
Nem több mint a bőrteszt
vagy a spec. IgE vizsgálat.

**Basophil
aktivációs
teszt**

CD63
CD203c



Késői típusú gyógyszerérzékenység diagnosztikája

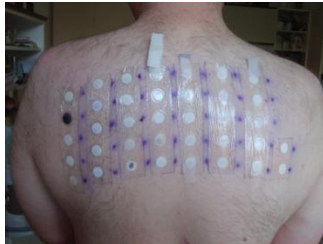
In vivo tesztek

In vitro tesztek

Provokáció

Bőr próbák

Patch teszt
késői leolvasású
intradermális teszt



Kevés gyógyszerre létezik.
Nem validált.

**Proliferáció
limfocita
transzformációs
teszt (LTT)**

**Sejt felszíni
aktivációs
markerek**

CD69 up-
reguláció

korai T sejt
aktivációs marker;
flow citometria;

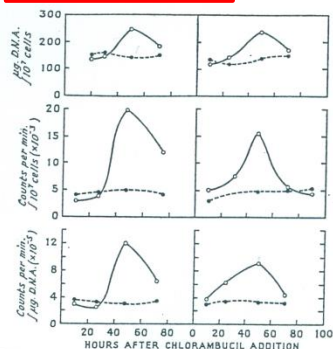
Citokinek

IL-6
TH1 citokinek
IFN- γ
IL-2
TH2 citokinek
IL-5
IL-13

**A kutatásban van
jelentőségük.**

Citotoxicitás

Immunhisztológia;
granzyme B
ELISPOT;
CD107a, mint
granulum marker



Measurements of the effects of chlorambucil treatment *in vitro* on the D.N.A. content of C.L.L. lymphocytes and their incorporation of ³H-thymidine.

○ — chlorambucil-treated lymphocytes.
● — control non-drug-treated lymphocytes.

ing figure. Following chlorambucil treatment for 48 hours, the D.N.A. level per cell had increased to approximately 170% of control values, and the amount of ³H-thymidine incorporated both into whole cells and into isolated D.N.A. was increased by a factor of 3-5 times control levels. After 72 hours these values had returned to those of normal untreated control cells.

These studies illustrate that chlorambucil is capable of stimulating lymphocytes isolated from the peripheral blood of C.L.L. patients to undergo D.N.A. synthesis in terms of an increased rate of incorporation of ³H-thymidine into D.N.A. This primary effect of the drug may be relevant in designing optimal dosage schemes and may be an important factor in determining the sequence of drugs in combination schedules which are now becoming widely used in the treatment of malignant disease.

Chester Beatty Research Institute,
London S.W.3.

BRIDGET T. HILL.

LYMPHOCYTE CYTOCHEMISTRY

SIR,—Cytochemical studies in our laboratory have demonstrated metabolic disturbances in lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukaemia (C.L.L.), Waldenström's disease, and Kahler's disease. None of these patients had been treated with cytostatic drugs or corticoids before the cytochemical studies.

Our results suggest that variations in enzyme activity are of particular diagnostic importance in haemopathy:

	Waldenström's disease	C.L.L.	Kahler's disease
Periodic-acid/Schiff reaction	++	++	+
Alkaline phosphatase	+	+	+
Adenosine triphosphatase	+	+	+
Esterases	++	++	++
Sudan black	++	++	++
Immunoglobulins	..	IgM	IgA, M

* 10-36% +ve.

Cytochemistry also provides the following information:

1. The intensity of the periodic-acid/Schiff reaction reflects the amount of polysaccharide in the globulins synthesized by the lymphocyte or the plasma-cell.
2. The increases of alkaline phosphatase and of adenosine triphosphatase reflect cellular synthetic activity.
3. The positive reaction of certain lymphocytes in Waldenström's disease with sudan black raises the question of their relationship to the histiocyte lineage.

INSERM (U 100),
Toulouse, France.

J. GROZDEA
J. COURERAND.

LYMPHOCYTE-TRANSFORMATION TEST IN DETECTION OF DRUG HYPERSENSITIVITY

SIR,—Many methods are used for demonstrating drug hypersensitivity, but opinions have diverged on their specificity, sensitivity, and reproducibility. Identification of the drug allergen by the lymphocyte-transformation test was first reported by Hirschhorn et al.¹ and Holland and Mauer,² and later also by others, but several authors failed to confirm these findings.³

In this clinic 438 lymphocyte-transformation tests were performed in 229 cases of suspected drug hypersensitivity, using 44 different drug preparations. The lymphocyte response was measured by adding ³H-thymidine to the optimum culture. Each drug had previously been tested for optimum stimulating concentration and lowest toxic concentration (by means of phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures). Lymphocyte-transformation tests had been performed only with drugs having the lowest toxic concentration rather than the optimum stimulating one.

The antigen which caused the hypersensitivity reaction could be identified in 110 of the 229 cases. 17 patients showed a positive reaction to several drugs. The results were:

Drug	No. of tests	Positive	Negative
Penicillin	87	30	57
Other antibiotics	64	15	49
Antipyretics	113	34	79
Analgesics	27	8	19
Chemotherapeutics	30	9	21
Other preparations	107	29	78
Proteins and peptides	10	7	3

In an earlier series we demonstrated with the help of the lymphocyte-transformation test ⁴ hypersensitivity in 70% of undoubtedly drug-hypersensitive patients.

It is concluded that whereas a positive result reliably indicates that a drug has caused the allergic reaction, negative results do not fully exclude hypersensitivity, since this is often caused *in vivo* by a metabolite or conjugate of the drug rather than to the original preparation.

Department of Dermatology
and Venereology,
University Medical School,
Szeged, Hungary.

A. DOBOZY
J. HUNYADI
N. SIMON.

IMMUNOCOMPETENCE OF MATERNAL LYMPHOCYTES

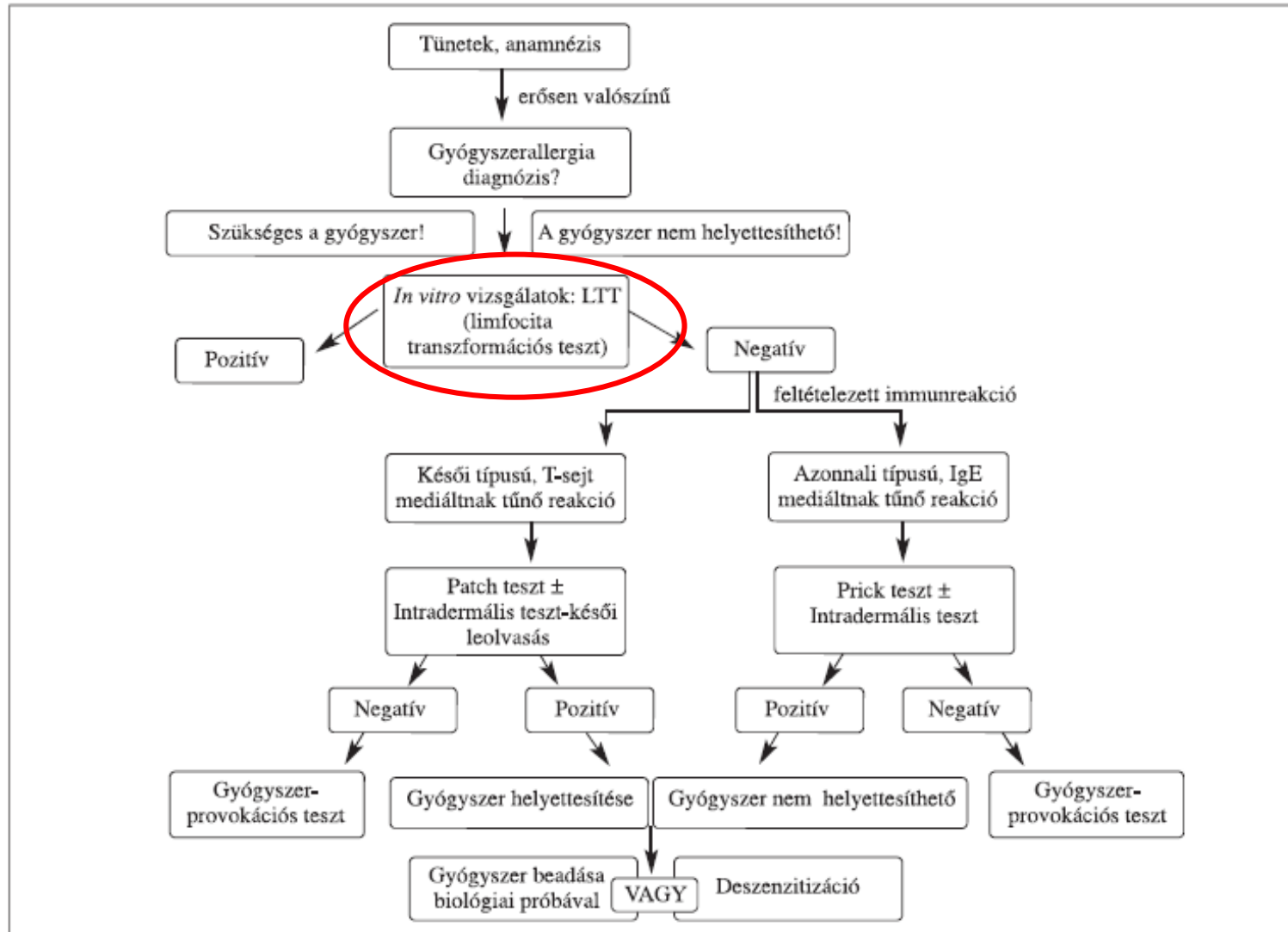
SIR,—The survival of the "fetal allograft" even in mothers pre-sensitized to paternal histocompatibility antigens remains a fascinating enigma of transplantation immunobiology. The inconceivable fact that the mother does not reject the histoincompatible semi-allogeneic F₁ hybrid fetus raises the possibility that pregnancy renders the maternal

1. Hirschhorn, K., Bach, F., Kolodny, R. L., Firschein, I. L., Hasheim, N. *Science*, London, 1963, 142, 1185.
2. Holland, P. H., Mauer, A. M. *Lancet*, 1964, i, 1368.
3. Arbesman, C. E. in *New Concepts in Allergy and Clinical Immunology*; p. 201. Amsterdam, 1971.
4. Simon, N., Dobozay, A., Hunyadi, J. *Z. Haut- u. Geschlkrank.* 1971, 46, 713.

A limfocita transzformációs teszt (LTT) bevezetése a gyógyszerérzékenység vizsgálatára a szegedi Bőrklinikán (1970-es évek)



A gyógyszer túlérzékenység kivizsgálásának menete az SZTE Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján



Az LTT technikai aspektusai

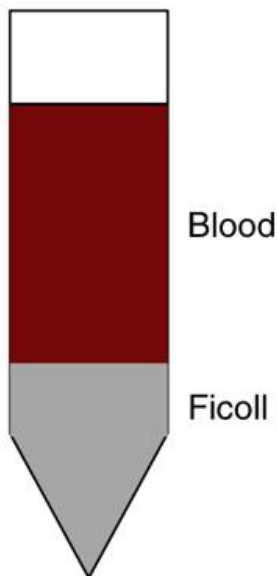


Véralvadás-gátolt vér szükséges
(heparin, EDTA, citrát)

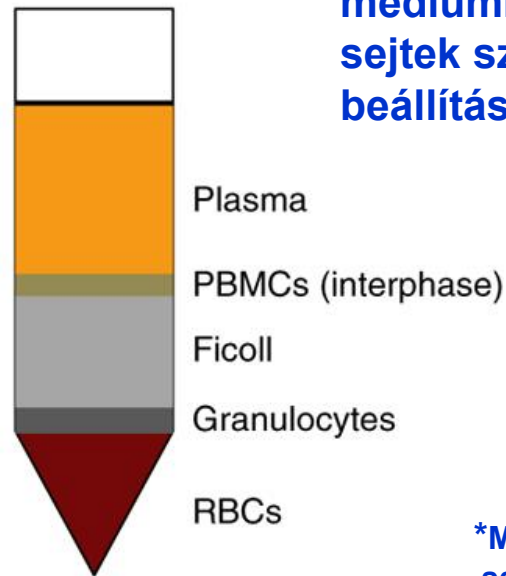
- 4 ml vér + 4 ml PBS → összekeverés
- rárétegzés 4 ml Ficoll-Paque reagensre
- centrifugálás 400g, 20 perc

- **Mononukleáris sejtek óvatos kinyerése**
mosás PBS-ben, centrifugálás;
sejtek szuszpendálása a tenyésztő-
médiumban;
sejtek számolása, a sejt koncentráció
beállítása: $1 \times 10^6/\text{ml}$

Centrifugálás előtt



Centrifugálás után



Tenyésztő médium összetétele:

RPMI 1640

10% FBS*

1% L-glutamin

1% vitamin oldat

1% antibiotikum/antimyc.

*Más csoportok FBS helyett AB szérumot vagy saját savót használnak.

Az LTT technikai aspektusai

Gyógyszer hígítások:

- Ideális:** 3-5 gyógyszer koncentráció;
leggyakoribb 0,1 – 1 – 10 – 100 µg/ml
(de figyelembe vesszük a terápiás és a toxikus koncentrációt);
tiszta hatóanyag;
új gyógyszer esetén először toxicitási teszt
- Praktikus:** 2-3 gyógyszer koncentráció;
leggyakoribb 10 – 100 µg/ml;
gyári készítmények (törzsoldat készítés, hígítás)

Pozitív kontroll: 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA) stimulált sejtek

Negatív kontroll: gyógyszert nem tartalmaz

Sejtek tenyésztése:

37 °C, 72 h, 5% CO₂
(2-3 párhuzamos)

Sejtproliferáció mérése

³H-thymidin inkorporáció mérése
CFSE assay
BrdU inkorporáció (nem radioaktív)
EdU inkorporáció
MTT teszt

A sejtproliferáció mérésére használatos módszerek

DNS szintézis mérésén alapuló eljárások

^3H -thymidin inkorporáció mérése

tradicionálisan leggyakrabban használt eljárás;
radioaktív módszer – speciális körülmények

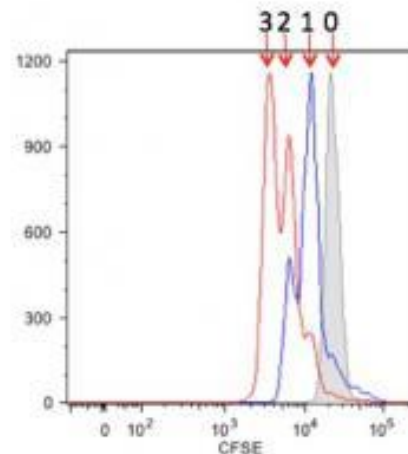
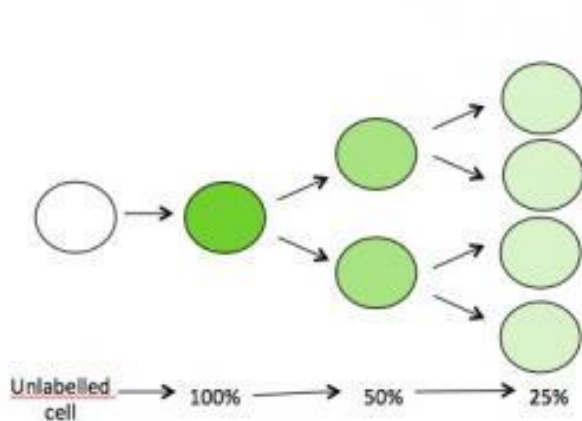
BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) inkorporáció mérése

nem radioaktív vizsgálat;
DNS-be beépülése után antitestekkel kimutatható, mérhető;
áramlási citometria és enzim immunoassay

EdU (5-ethyl-2'-deoxyuridine) inkorporáció

áramlási citometria

CFSE (carboxyfluorescein succiminidyl ester) vizsgálat



A sejteket előzetesen jelölni kell CFSE-vel.

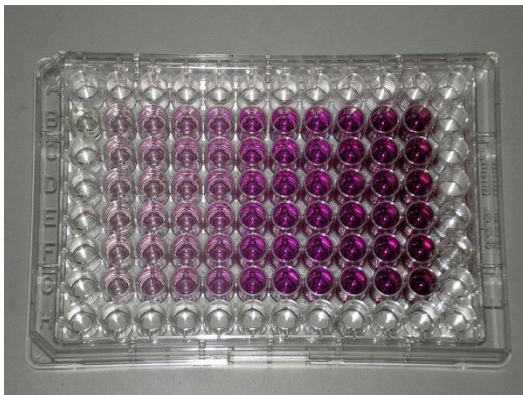
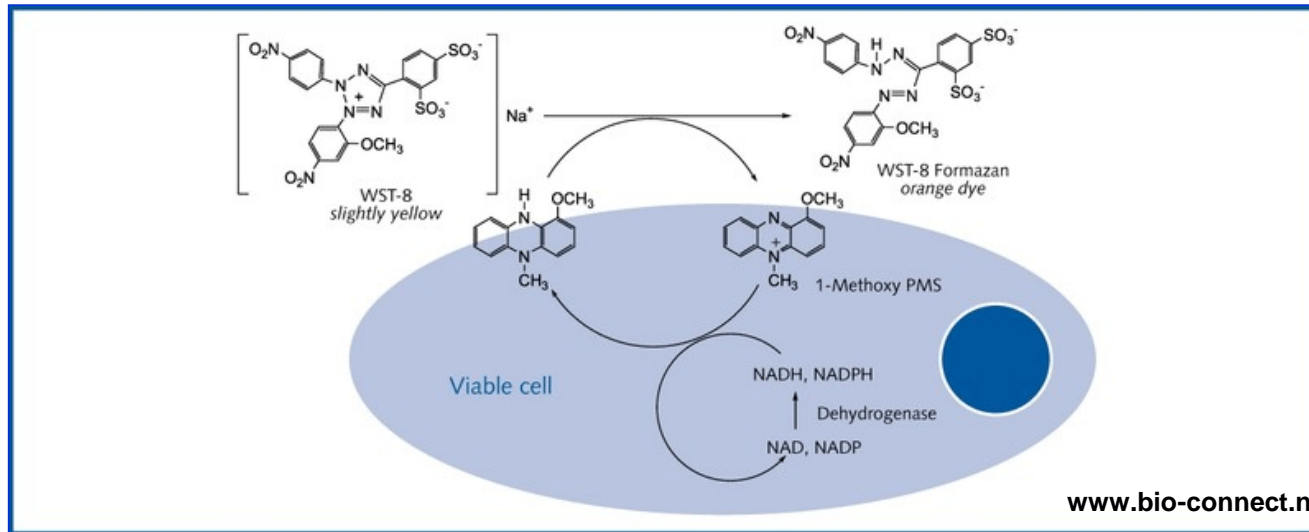
Előnye: A sejtek életben maradnak,
tovább vizsgálhatók;
szubpopulációk, citokin termelés

A CFSE vizsgálatok szerint a gyógyszer-specifikus proliferációs válaszban effektor és regulátoros T sejtek is részt vesznek (*Hanafusa T et al. J Dermatol Sci, 65:213 (2012)*)

A sejtproliferáció mérése – MTT assay

Indirekt módszer az élő sejtszám megbecslésére, a sejtpopuláció metabolikus aktivitásának meghatározására.

MTT (dimethylthiazol-diphenyl-tetrazolium-bromide)



Az MTT teszt lépései:

MTT reagens hozzáadása a kultúrákhoz;

Inkubáció 37°C, 4-6 h, 5% CO₂,

Felülúszó óvatos eltávolítása;

A formazán kristályok feloldása sósavas izopropil alkoholban és SDS-ben;

OD mérés 540 nm-en

Az LTT eredmények interpretálása – Stimulációs Index (SI)

$$SI = \frac{\text{proliferáció a gyógyszer jelenlétében}}{\text{proliferáció a gyógyszer hiányában}}$$

Az értékelés előfeltételei:

- a spontán proliferáció alacsony
- a párhuzamosok közötti eltérés < 30%
- mitogén (PHA) jelenlétében $SI \geq 2$

Értékelés

$SI < 2$	negatív
$SI \leq 2-3$	pozitív (gyengén?)
$SI > 3$	pozitív

Vegyük figyelembe:

- vancomycin, paracetamol, bizonyos radiokontraszt anyagok – nem specifikus proliferáció
- egyes NSAID gyógyszerek – szintén okozhatnak nem gyógyszer-specifikus proliferációt

β -laktám antibiotikumok esetén általában csak az $SI > 3$ értéket vesszük pozitívnak.
Hapténként gyenge T sejt proliferációt okozhatnak nem érzékeny egyéneknél is.

Az SI érték tükrözi a T sejt proliferáció intenzitását, DE

- Nem korrelál a klinikai tünetek súlyosságával
- SI lehet marginális súlyos SJS/TEN szindrómákban, de nagyon magas veszélytelen reakciók esetén (MPE)
- A gyógyszer típusa, a stimuláció módja szintén befolyásolja a proliferációt

Reprodukálhatóság kérdése

A teszt komplexitása miatt (celluláris teszt) nem várható olyan mértékű reprodukálhatóság, mint egy szérum tesztől.

Ha erős a pozitivitás, akkor a reprodukálhatóság jobb.

Az LTT vizsgálat időzítése

Megoszlanak a vélemények.

**Akut fázisban nem érdemes – a T sejtek erősen aktiváltak,
az effektor sejtek nagy száma miatt**

**Az ajánlott időzítés: 4-8 héttel az aktív szakasz után
Mindenképpen ajánlott 2-3 éven belül elvégezni.**

Sensitivity & Specificity of the lymphocyte transformation test (LTT)

Author	n	sensitivity	specificity	disease
Nyfeler & Pichler, 1997	100	74	85*	All
Luque E et al., 2001	50	62	93	Penicillins (imm. & non-immEDIATE)
Hari Y et al, 2001	21	67	98	MPE & bullous E.
Naisbitt D et al, 2003	36	94	100	DRESS/ DiHS

The sensitivity of LTT is dependent of the type of reaction !!

Az LTT specificitása elfogadható

A szenzitivitás 60-70%

*Werner J. Pichler
ADR-AC GmbH
Adverse Drug reactions –
Analysis and Consulting
Bern*

A negatív eredmény nem zárja ki a gyógyszer túlérzékenységet!

Az LTT vizsgálati értéke különböző betegségekben

Gyakran pozitív (> 50%):

DRESS szindróma (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms)
generalizált maculopapulosus exanthema
bullosus exanthema
akut generalizált exanthematosus pustulosis (AGEP)
anaphylaxis (IgE-mediált, súlyos tünetek)

Alkalmanként pozitív:

hepatitis (gyógyszerfüggő)
pancreatitis
nephritis (gyógyszerfüggő)
urticaria, angioedema
Stevens-Johnson szindróma (SJS)
Toxikus epidermalis necrolysis (TEN)

Nagyon ritkán pozitív (< 10%):

vasculitis
macular exanthema
hemolitikus anaemia
fix gyógyszer exanthema

Bata-Csörgő Zs. et al. Bőrgyógy. Vener. Szle , 85:36-38 (2009)

3251 beteg (2005-2008)

12119 gyógyszer

618 beteg – pozitív LTT (betegek 19%-a)

775 gyógyszer – pozitív LTT (gyógyszerek 6,4%-a)

Diagnózis	LTT vizsgálattal pozitív gyógyszer
súlyos anaphylaxia	szalicilsav, NeoCitran, Venoruton, Aflamin, ASS-C, Etomidat-lipuro
urticaria, angioödema	Cardilopin, Marcain, Bucain, Digimerck, Uregyt, Aleve, Aspirin, Zinnat, Controloc, Motilium, Tetran, Renitec, Plavix, Dona por, Concor, szalicilsav, ciprofloxacín, Cardura, Mebucain, „natív varázs teakeverék”, Mycosyst, Algoflex forte, Algopyrin, Humapronol, Uregyt, Lidocain, Cefzil, Rubophen, Nootropil, Etomidat-lipuro
immunkomplex vasculitis	Astrix, Amilorid, Brinaldix, Dona por
maculopapulosus reakció	Algopyrin, Mixtura pectoralis, Alfetim, Ceclor, penicillin, Klacid, Rudotel, Aclotin, Omeprazol, Vasilip, Nurofen, heparin, Béres calcium, Curam Duo, Betaserc, Nitromint, Aktil Duo, Clexane, Fragmin, heparin, Colfarit, Coverex
AGEP	Terbisil, Lamisil, Apranax
erythaema nodosum	Algopyrin
fix gyógyszerexanthema	Algopyrin
erythaema multiforme	Ednyt, Normodipin, Cardilopin, Xanax, Amilorid, penicillin, Quamatel, Medazepam, Co-Renitec, Norvasc, Augmentin
Stevens-Johnson syndroma	Dalacin, Medazepam, Mexalen
Lyell syndroma	Salazopyrin

Pozitív LTT eredményt adó gyógyszerek

Az LTT módszer

előnyei:

- ***In vitro*** módszer
- **Nem veszélyes** a betegekre
- Több gyógyszer egyidejűleg vizsgálható
- **A magas specificitás** miatt a pozitív eredmény releváns
- Szenzitivitás +/-?
- Jó kutatási eszköz a gyógyszer-érzékenység tanulmányozására

hátrányai:

- Munka- és időigényes
- Speciális felszereltséget igényel (sejttenyésztés, steril körülmények)
- Logisztika, friss vérből történik a vizsgálat
- Szenzitivitás +/-?
- Nem kellően standardizált
- (Szakképzett személyzet, jól bejáratott körülmények, sok vizsgálat szükséges)



Közreműködők

Bata Zsuzsanna
Palotás Zsuzsanna
Garaczi Edina
Altmayer Anita
Kemény Lajos
Husz Sándor





Az LTT vizsgálat finanszírozása

	pontérték
Vérvétel	47
Sejtizolálás	271
LTT	4 964/gyógyszer

Egy gyógyszer esetén fizetősen 24 820.- Ft

Általános problémák a gyógyszerérzékenység diagnosztikájában

1. Több gyógyszer az innate immunrendszert befolyásolja (basophil sejtekből hisztamin felszabadulás, stb.) nincs T sejt összefüggés
2. Azonos klinikai tünetek – más immunmechanizmusok különböző tesztek alkalmasak
3. A gyógyszer metabolitja okozhatja az érzékenységet, vagy valamilyen vivőanyag
4. A beteg egyszerre több gyógyszert szed
5. A provokáció, mint „gold standard” veszélyessége miatt ritkán alkalmazható
6. A gyógyszerérzékenység gyakori – de egyes gyógyszerekre ritka az egyes diagnosztikai módszerek validálása nehézkes (kivéve a β -laktám antibiotikumok)
7. A biológiai terápiák új kihívást jelentenek