

Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ,
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika
(igazgató: Kemény Lajos dr., egyetemi tanár)

A lymphocytá transzformációs teszt a gyógyszer-túlérzékenységi reakciók diagnosztikájában*

Lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions

BATA-CSÖRGŐ ZSUZSANNA DR., ALTMAYER ANITA DR., GARACZI EDINA DR.,
BOROS-GYEVI MÁRTA DR., KENDERESSY SZABÓ ANNA DR., BELSŐ NÓRA DR.,
KORMOS BERNADETT, LÁSZLÓNÉ GORDOS EDIT, BAUNOCH JUDIT,
KEMÉNY LAJOS DR.

ÖSSZEFOGLALÁS

Szerzők egy két és fél éves vizsgálati periódusban pozitív eredményt adó lymphocytá transzformációs teszt (LTT) tanulságait összegzik, melyeket olyan 65 betegen kaptak, akiknél a gyógyszerreakciók súlyosabb volta klinikai felvételt tett szükségessé. A betegek túlérzékenységi reakciói klinikailag jól definiáltak és a gyógyszereszedéssel kapcsolatos anamnesztikus adatok is pontosak. Az eredmények bizonyítják, hogy minden típusú reakcióban lehet a gyógyszerek hatására aktiválódó lymphocytákat találni. Jelen vizsgálatban a pozitív LTT eredmények a betegek klinikai adatai alapján minden esetben relevánsnak bizonyultak.

Kulcsszavak:

lymphocytá transzformációs teszt -
gyógyszer-túlérzékenység

SUMMARY

We analyzed positive lymphocyte transformation test (LTT) results done during a two and a half year period at our clinic. These tests were performed on 65 patients with reactions to the drugs severe enough to require hospitalization. Due to the necessity of clinical admittance for these patients the observed drug reactions were clinically well defined and the drug related histories were precise. Our results show that LTT is capable of detecting drug reactive lymphocytes in vitro in all types of drug hypersensitivity reactions. In this set of patients all positive LTT results were clinically relevant based on the patients' clinical data.

Key words:

lymphocyte transformation test -
drug hypersensitivity

A Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján Dobozy Attila és Hunyadi János az 1970-es évek elején vezették be a lymphocytá blasztos transzformációjának vizsgálatát a gyógyszer-túlérzékenységi reakciók *in vitro* diagnosztikájában. Ez a vizsgálati módszer nemzetközi összehasonlításban is úttörő volt, a vizsgálattal szerzett első tapasztalatok közzétételére a Lancetben került sor 1972-ben (1). A módszer nehezen standardizálható, munkaigényes, jól felkészült és gyakorlott asszisztenciát kíván. Míg a szegedi klinikán a módszert bevezetése óta folyamatosan, jó eredményekkel alkalmaztuk a gyógyszerallergia kivizsgálásában, valószínűleg a munkaigényesség, a standardizálhatóság, egyszerűsítés lehetőségének hiánya miatt a nem-

zetközi gyakorlatban a módszer alkalmazása nem terjedt el (2, 3, 4). A 90-es évek végétől elsősorban Pichler és munkatársai munkájának köszönhetően az LTT alkalmazása a gyógyszer-túlérzékenység vizsgálatában újabb reneszánszát éli (5).

A teszt bevezetését követően hosszú ideig azt gondolták, tanították, hogy a teszt csak a sejt mediálta, késői típusú allergiás reakciók kimutatására alkalmas, ahol a T sejtek az effektor sejtek. Saját vizsgálataink és az irodalmi adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a teszt minden típusú túlérzékenységi reakcióban pozitív lehet (6). A másik kritika a teszttel kapcsolatban a pozitív reakciók klinikai relevanciájának megkérdőjelezése (7). Pichler és munkatársai 1997-ben 923 beteg adatait feldolgozva a teszt szenzitivitását 78, specificitását 85%-osnak ítélték (5). Pontos adatokat nyerni a teszt megítéléséhez nem lehet, ehhez a betegek gyógyszerrel való provokációjára lenne

* Dr. Dobozy Attila akadémikus, egyetemi tanár 70. születésnapja tiszteletére

szükség nagy beteganyag, ami nem kivitelezhető. Sajnos általában kisszámú betegen végzett vizsgálatok közlései alapján az *in vitro* tesztek közül az LTT-t ítélnék messze a legjobbnak. Specifikus IgE meghatározás csupán néhány gyógyszerrel lehetséges, a tesztek specificitása az LTT-hez hasonló, de a szenzitivitása alacsonyabb. A különböző basophil aktivációs tesztek, a hisztamin felszabadulás mérése kizárólag I. típusú reakciókban jön szóba, ezek a tesztek sem könnyen kivitelezhetőek, egyelőre kevés az adat velük kapcsolatban. Szintén kevés adat áll rendelkezésre a különböző citokin - például IL-5 - felszabadulást mérő módszerek hatékonyságáról (8). Jelen munkában a Szegedi Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán 2005. március és 2008. szeptember között elvégzett, pozitív eredményt adó LTT vizsgálatok adatait elemeztük azon betegeken, akik súlyos reakcióval kerültek felvételre. A betegek klinikai felvétele biztosította a pontos diagnózist és a részletes, megfelelően dokumentált anamnézist.

Betegek és módszer

1998-ig a lymphocyták blastos transzformációját a ³H-thymidin sejtekbe való beépülésével mértük. 1998-ban áttértünk egy kolorimetriás, izotópmentes módszerre, melyet az LTT vizsgálatokhoz hazánkban először a Debreceni Bőrgyógyászati Klinikán vezettek be (9). Az MTT módszer a sejtenyészetekben az élő sejtek számának meghatározását teszi lehetővé, így indirekt módon a sejtek sejtenyészeten történő szaporodása mérhető (10). Kezdetben a vizsgálatokat párhuzamosan végeztük a régi és új módszerrel, az MTT alkalmazására azután térünk át miután 50 betegnél különböző gyógyszerekkel elvégzett vizsgálat hasonló eredményt adott mindkét vizsgálómódszerrel.

Lymphocytá szeparálás

5-10 ml heparinnal alvadást gátolt vénás vért Ficoll-Paque™-ra (GE-Healthcare, AP Hungary Kft.) rétegezzük, majd 30 percig 1600 rpm, szobahőmérsékleten centrifugáljuk. A mononukleáris sejtek a sűrűséggrádiensnek megfelelően szeparálódnak, a mononukleáris sejtréteget összegyűjtjük, a sejteket PBS-ben ismételt centrifugálásal átmoszuk.

Lymphocytá tenyésztés

A lymphocytákat 100 000 sejt/lyuk sejtszámmal 96-lyukú sejtenyészítő edénybe passzáljuk. A megfelelő gyógyszerhígításokat rámérjük a sejtekre, összesen 200 µl végtérfogatban, majd 72 órán át inkubáljuk a sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-tartalom mellett. A negatív kontroll nem tartalmaz gyógyszert, csak a tenyésztőmédiúmot, ami RPMI 1640 (Gibco) +10%FBS (Hyclone)+ 1% L-glutamin, 1% MEM vitamin oldat, 1% antibiotikum/antimycoticum oldat (mind a Gibcótól), pozitív kontrollként 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA, Sigma) stimulált sejtek szolgálnak. A gyógyszereket két hígításban alkalmazzuk, néhány kivételtől (például a szalicilsav) eltekintve a gyógyszerek gyári készítményeit használjuk a vizsgálathoz. Minden gyógyszerből oldat készül, mely általában vizes hígítású. Az egyes gyógyszerek végkoncentrációját a gyógyszer terápiás vérszintje és a lymphocytá tenyésztésben mutatott toxicitása alapján határozzuk meg.

MTT teszt (dimethylthiazol-diphenyl-tetrazolium-bromide, Sigma)

A felülúszót eltávolítjuk, majd 100-100 µl színtelen RPMI (Gibco) tápoldatot mérünk a sejtekre. Ezután hozzáadjuk a sejtekhez az MTT reagenst 0,5 mg/ml-es végkoncentrációban, majd 4 órás inkubáció következik 37 °C-on, 5% CO₂-tartalom mellett. Az inkubációs idő leteltével a sejtenyészítő edényt 10 percig 200 g-vel lecentrifugáljuk, majd a felülúszót eltávolítjuk. A képződött kék színű formazán kristályokat 100-100 µl 2% 2n HCL tartalmú izopropanolban és 20-20 µl 10%-os SDS-ben oldjuk fel. A keletkezett színreakció abszorbanciáját 540 nm-en mérjük le. Pozitívnak vesszük az eredményt, ha a gyógyszer legalább az egyik hígításban 2,5x nagyobb értéket ad, mint a negatív kontroll.

A vizsgált időszakban 2005. március 1. és 2008. szeptember 30. között 3251 betegnél végeztünk LTT vizsgálatot. 65 olyan beteg volt, akinél LTT vizsgálattal pozitívítást találtunk, és akit súlyos tünetek miatt a klinikára fel kellett venni. Ennek a 65 betegnek pontosan ismert a diagnózisa és az anamnézise. A 65 betegből 50 nő és 15 férfi volt. A legfiatalabb beteg 19 éves, a legidősebb 81 éves volt. A betegek átlagéletkora 53 év. Három kivételtől eltekintve az LTT vizsgálatot a betegség gyógyulását követően pár héttel végeztük. Ha a beteg szisztémás szteroid terápiában részesült, akkor a gyógyszer elhagyását követően minimum 4 hetet vártunk a vizsgálattal.

Eredmények

A vizsgált időszakban a 3251 betegre összesen 12119 gyógyszer vizsgálata esett, ami egy betegre átlagosan 4 különböző gyógyszert jelent. A 12119 gyógyszerrel való vizsgálatból 775 pozitív eredményt kaptunk, ami a gyógyszerekre vonatkoztatva 6,4 %, 618 betegnél kaptunk pozitívítást, ez a betegek 19 %-a.

Az 1. táblázatban a klinikán kezelt és pozitív LTT eredményt adó 65 beteg diagnózis szerinti megoszlását tüntettük fel. Látható, hogy az LTT pozitívítása a különböző túlérzékenységi reakciókban egyaránt előfordul, a teszt tehát alkalmas mind a korai típusú reakciók gyógyszerreinek kimutatására, mind a késői típusú reakciókéra. A reakciók kialakulásában feltűnő a nők dominanciája, lehet, hogy a nők több gyógyszert fogyasztanak. A súlyos reakciók kialakulása inkább a közép- és idősebb korosztálynál fordul elő, talán ez is a gyógyszerfogyasztás gyakoriságával függ össze.

Az anamnézis és a tünetek alapján mind a 65 hospitalizált beteg pozitív LTT eredménye klinikailag relevánsnak volt ítélni. A 2. táblázat az egyes kórformákban előfor-

Diagnózis	Betegszám	Betegek kora	Neme
súlyos anaphylaxia	6	20-62, átlag: 42 év	3 nő/ 3 férfi
urticaria, angioödema	26	19-77, átlag: 54 év	22 nő/ 4 férfi
immunkomplex vasculitis	4	32-73, átlag: 58 év	2 nő/2 férfi
maculopapulosus reakció	14	27-81, átlag: 60 év	11 nő/3 férfi
AGEP	2	75 és 79 éves	2 nő
erythaema nodosum	1	34 éves	nő
fix gyógyszerexanthema	1	65 éves	nő
erythaema multiforme	7	38-76, átlag: 54 év	6 nő/1 férfi
Stevens-Johnson syndroma	3	36-62, átlag: 48 év	1 nő/2 férfi
Lyell syndroma	1	63	nő

1. táblázat

Pozitív LTT eredményt adó betegek

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

2. táblázat

Pozitív LTT eredményt adó gyógyszerek

duló LTT pozitívítást adó gyógyszert mutatja. Érdekes, hogy a legsúlyosabb reakcióknál sosem fordult elő több gyógyszerre pozitív reakció. Szinte minden beteg több gyógyszert szedett egyszerre a tünetek kialakulását megelőzően, így az anamnézis alapján a kiváltó gyógyszer kiválasztása nem volt lehetséges, a pozitív LTT eredmény tehát jelentős segítséget nyújtott a gyógyszer-túlérzékenység kivizsgálásában. A gyógyszerek közül a nem szteroid gyulladáscsökkentők és az antibiotikumok dominálónan fordulnak elő, ugyanakkor nagyon különböző egyéb gyógyszerek is előfordulnak, mutatva, hogy mennyire egyén-függő az egyes gyógyszerekre a túlérzékenységi reakció.

Megbeszélés

A gyógyszer indukálta adverz reakciók leggyakrabban immunreakciók, melyek valódi immuntúlérzékenységi mechanizmussal alakulnak ki. A valódi gyógyszer-túlérzékenységi reakció kialakulását mindig megelőzi szenzibilizáció, mely során gyógyszer-specifikus T sejtek, ill. bizonyos reakciókban antitestek alakulnak ki. A gyógyszerek által okozott immunreakciók kialakulását a gyógyszer tulajdonságai mellett egyéni genetikai tényezők, külső és belső környezeti hatások határozzák meg. A gyógyszerallergiák diagnosztikájában az anamnézis, a klinikai tünetek és a gyógyszeralkalmazás pontos meghatározása alapvetően fontos. Diagnosztikus segítséget *in vitro* és *in vivo* tesztek megfelelően értékelt eredményei adnak, az *in vitro* tesztek közül a leghasznosabb a lymphocytá transzformációs teszt, mint eredményeink mutatják, ez a teszt minden típusú reakcióban használható. Nem tartozik az egysze-

rűbb laboratóriumi tesztek közé, nem könnyen standardizálható, ezért nem széleskörű a használata, de a megfelelően felkészült laboratóriumban az LTT vizsgálat nagyon hasznos, a betegre nézve veszélytelen gyógyszer-túlérzékenységet vizsgáló *in vitro* módszer.

IRODALOM

1. Dobozy A., Hunyadi J., Simon N.: Lymphocyte transformation test in detection of drug hypersensitivity. (1972) *Lancet*, 16, 277.
2. Dobozy A., Hunyadi J., Kenderessy Sz. A.: Der Lymphocyten-T-Transformations-Test bei Arzneimittellergien. (1976) *Z. Hautkr.* 51, 361-366.
3. Dobozy A. és mtsai.: Lymphocyte transformation test in detection of drug hypersensitivity. (1981) *Clin Exp Dermatol*, 6, 367-372.
4. Makó S. és mtsai.: Gyógyszerallergiás reakciók diagnosztikus lehetőségei-a lymphocytatranszformációs teszt a bőrgyógyászatban. (2008) *Orv Hetil*, 149, 1107-1114.
5. Nyfeler, B., Pichler, W. J.: The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. (1997) *Clin Exp Allergy* 27, 175-181.
6. Pichler, W. J., Tilch, J.: The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. (2004) *Allergy*, 59, 809-820.
7. Primeau, M.N., Adkinson, N. F.: Recent advances in the diagnosis of drug allergy. (2001) *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1, 337-341.
8. Romano, A., Demoly, P.: Recent advances in the diagnosis of drug allergy. (2007) *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 7, 299-303.
9. Szabó I. és mtsai.: A gyógyszerallergia laboratóriumi vizsgálata lymphoblastos transzformáció kolorimetriás mérésével. (1998) *Orv Hetil*, 139, 2379-2382.
10. Denizot, F., Lang, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. (1986) *J Immunol Methods* 89, 271-277.