

# „Qualitätssicherung beim Lymphozytentransformationstest“ – Addendum zum LTT-Papier der RKI-Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“

## Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“

### Zusammenfassung

In den letzten Jahren gab es erhebliche Fortschritte beim Verständnis der Prozesse, die beim Lymphozytentransformationstest (LTT) ablaufen. Auch zeichnet sich ab, dass diverse methodische Verbesserungen in die Routine eingeführt werden können. Ergebnisse hängen von der sachgemäßen methodischen Durchführung ab. Die Ergebnisinterpretation ist durch die Möglichkeit falsch-positiver und falsch-negativer Befunde erschwert. Weil der LTT sich nicht vollkommen standardisieren lässt, ist die Beachtung von Qualitätssicherungsaspekten durch den Auftraggeber und durch das Labor besonders wichtig.

### Einleitung

Das vorliegende Addendum zur Stellungnahme der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“ am Robert Koch-Institut (RKI) aus dem Jahre 2002 [1] hat das Ziel, wichtige Punkte der Qualitätssicherung von Methodik und Interpretation des Lymphozytentransformationstests (LTT) unter Berücksichtigung der seither erschienenen Literatur darzustellen. Die damalige Beschreibung der biologischen und medizinischen Zusammenhänge ist auch

heute noch gültig und wird hier nicht wiederholt.

Der LTT wird eingesetzt, um bei Hyperreagibilitäten das auslösende Allergen zu identifizieren. Seit der Veröffentlichung der Stellungnahme des RKI zur diagnostischen Relevanz des LTT in der Umweltmedizin im Jahre 2002 wurden die Modellvorstellungen über die spezifische Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptoren und kleinen Antigenmolekülen wie Arzneimitteln [2, 3] und Metallen [4, 5, 6, 7, 8] präzisiert. Auch gab es verschiedene methodische Entwicklungen, die den LTT vereinfachen und seine Aussagekraft verbessern sollen [9, 10, 11, 12]. Vonseiten der Kommission erschien es daher sinnvoll, eine Ergänzung zur Stellungnahme von 2002 vorzunehmen.

### Umweltmedizinische Stoffe, die im LTT untersucht wurden

Die Zusammenstellung in **■ Tabelle 1** zeigt exemplarisch, für welche umweltmedizinisch relevanten Stoffe der LTT in den letzten Jahren eingesetzt wurde. In den meisten dieser Publikationen wurde eine Assoziation zwischen LTT-Ergebnis und Allergenempfindlichkeit der Patienten beschrieben. Aber nur bei wenigen dieser Stoffe gibt es hinreichende Daten bezüglich der diagnostischen Sensitivität und

Tabelle 1

#### Umweltmedizinisch relevante Stoffe, bei denen der LTT in den letzten Jahren angewandt wurde (Auswahl)

Stoff	Literatur
Chrom	[24, 69, 70, 71]
Nickel	[12, 24, 40, 69, 70, 72, 73]
Kobalt	[24, 69, 70]
Gold	[24, 69, 70, 73, 74]; [38, 74] (Zytokine)
Palladium	[73]
Quecksilber	[73]
Titan	[48]
Beryllium	[11, 75, 76]
Blei	[77, 78] (Maus, lymph node assay)
Cadmium	[78] (Maus, lymph node assay)
Duftstoffe	[29, 79]

Spezifität des LTT, d. h., für viele Allergene/Antigene liegen nur begrenzte Erfahrungen und oft nur ein bis zwei Studien vor.

Neben den in der Tabelle aufgeführten Stoffen wurde der LTT auch zum Nach-

weis einer Sensibilisierung gegenüber klassischen Umweltallergenen, z. B. aus Pollen [13, 14, 15], Milben [16, 17] und Tierhaaren [18] eingesetzt. Es wird sich in der Zukunft erweisen, ob der LTT auch bei diesen Allergenen zu einer Verbreiterung der diagnostischen Möglichkeiten beitragen kann.

## Methodik

Bei einem störanfälligen Test, wie dem LTT, ist eine korrekte methodische Durchführung unbedingt einzuhalten. Deswegen wird hier auf einige Details der Methodik eingegangen.

## Präanalytik

**Zeitpunkt.** Bei akuten Hyperreaktivitätsereignissen in Zusammenhang mit Arzneimitteln dürfte die höchste Treffsicherheit ca. 4–8 Wochen nach der klinischen Reaktion vorliegen [19]. Wenn schon früher, d. h. in der aktiven Phase des immunologischen Geschehens, gemessen wird, besteht sowohl die Gefahr des Kaschierens einer spezifischen Reaktion durch verstärkte Spontanproliferation als auch das Problem der Nichtentdeckung, weil die spezifisch sensibilisierten Zellen noch nicht aus dem Manifestationsorgan in die Peripherie gewandert sind. Wenn nach mehr als 12 Wochen gemessen wird, nimmt die Effektstärke ab, weil sich die sensibilisierten Zellen in die Lymphknoten zurückziehen. Aber auch nach Jahren sind noch positive Befunde möglich [19].

**Blutentnahme.** Viele Labors benötigen 20 ml Natrium-Heparinblut für den ersten zu untersuchenden Stoff, zusätzlich 5 ml für jeden weiteren Stoff.

**Probentransport.** Der Transport erfolgt bei Raumtemperatur. Die Probe sollte innerhalb von 24 Stunden im Labor ankommen, damit sie sofort bearbeitet werden kann. Nach mehr als 24 Stunden kommt es zu einem Vitalitätsverlust der Lymphozyten.

**Lymphozytenisolierung.** Verdünntes, heparinisiertes Blut wird auf einen Dichtegradienten (Ficoll) geschichtet. Nach Zentrifugation sammeln sich die Lym-

phozyten und Makrophagen über dem Ficoll, andere Zelltypen darunter.

**Löslichkeit des Allergens.** Das verdächtige Allergen muss den Prüfansätzen zugesetzt werden. Dies ist unproblematisch, wenn der chemische Stoff in reiner Form verfügbar ist und sich im Inkubationsmedium gut löst. Oft aber gibt es Probleme mit der Löslichkeit bestimmter chemischer Formen, z. B. von Metallen [20, 21]. Auch kann die Verwendung von Lösungsmitteln das Ergebnis beeinflussen [22]. Wenn der einzelne verdächtige Stoff eines Gemisches unbekannt ist, muss eine Stoffprobe des verdächtigen Präparates mit eingeschickt werden und als Prüfsubstanz dienen. Solche Allergen-Gemische können im Rahmen eines Suchtests nützlich sein, aber die Anwesenheit vieler Stoffe in hohen Konzentrationen steigert das Risiko einer unspezifischen Stimulierung.

Zu berücksichtigen ist auch, dass nicht immer nur die Ausgangssubstanz, sondern manchmal deren Metabolite zu klinischen Reaktionen führen können. Alleinige Testung mit der Ausgangssubstanz im LTT kann dann zu einem negativen Ergebnis führen. Erst durch Einsatz der – allerdings nur selten zur Verfügung stehenden – Metabolite können dann oft doch noch positive Befunde erhoben werden, wie dies z. B. für Pyrazolone gezeigt werden konnte [23].

## Analytik

**Inkubationsbedingungen.** Den isolierten Lymphozyten (z. B. 200.000 Zellen in 0,1 ml Medium) wird autologes Serum und das Prüfreagenz zugesetzt (z. B. je 0,05 ml). Die Zellen werden 5 Tage lang bei sterilen Bedingungen unter einer Atmosphäre von 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid bei 37 Grad Celsius inkubiert. Das Proliferationsmaximum liegt bei Mitogen-Stimulation normalerweise um Tag 3, bei Antigen-Stimulation oft erst an Tag 5 oder später. Dann wird radioaktiv markiertes Thymidin zugegeben und weitere 20 Stunden inkubiert. Danach wird die in die DNS eingebaute Radioaktivität in „counts per minute“ (cpm) gemessen und als Maß für die Zellprolifera-

tion verwendet. Es müssen mehrere Inkubationsansätze, jeweils möglichst in 5-fach Bestimmung, wie folgt hergestellt werden:

1. Prüfansätze: Den Prüfansätzen wird das verdächtige Allergen zugesetzt. Dies geschieht in der Regel in einer Konzentrationsreihe mit 5 aufsteigenden Konzentrationen (z. B. 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM). Oft ergibt sich nur bei einer oder zwei der Konzentrationen ein klares Zeichen der allergen-spezifischen Proliferationssteigerung und bei den hohen Konzentrationen eine Hemmung der Proliferation, bedingt durch unspezifische Zelltoxizität.
2. Positivkontrolle unspezifisch: Diesem Ansatz wird ein Lektin zugegeben (z. B. Pokeweed Mitogen oder Phytohämagglutinin). Das Lektin führt bei intaktem System zu einer starken unspezifischen Proliferationsstimulierung.
3. Positivkontrolle spezifisch (fakultativ): Verschiedene Labore stimulieren in weiteren Ansätzen mit Tetanus-Toxoid. Bei den meisten aktiv Tetanusgeimpften Personen ergibt sich eine starke spezifische Stimulierung der Lymphozytenproliferation. Dies zeigt an, dass die isolierten Lymphozyten zu einer allergenspezifischen Reaktion befähigt sind. Jedoch zeigen nicht alle geimpften Personen eine Stimulation.
4. Negativkontrolle: Parallelansatz ohne Zugabe eines stimulierenden Agens. Er zeigt die Spontanproliferation der Lymphozyten an.

## Postanalytik

Die absolute Menge an eingebauter Radioaktivität bei den verwendeten Positivkontrollen gibt Hinweise auf die Intaktheit der zellulären Bestandteile des Blutes. Die eigentliche Auswertung erfolgt anhand des Quotienten aus eingebauter Radioaktivität in den Positivkontrollen beziehungsweise in den Testansätzen zur eingebauten Radioaktivität in den Negativkontrollen. Er wird als SI (Stimulationsindex) bezeichnet. Bei der Positivkontrolle mit einem Lektin kann der SI typischerweise bis etwa 100 betragen. Bei der

Positivkontrolle mit Tetanustoxin kann der SI etwa 40 betragen. Sehr starke interindividuelle Unterschiede sind die Regel. Testansätze sind nur dann auswertbar, wenn die Positivkontrollen einen ausreichend hohen SI liefern und damit anzeigen, dass die Lymphozyten vital sind und das Testsystem in Ordnung ist.

**Befundermittlung.** Weil der LTT keine voll standardisierbare Methode ist, sollte das Labor seine spezifische Methodik gegenüber dem Auftraggeber offenlegen [24]. Zu jeder Befundmitteilung gehört die Angabe der Mittelwerte aus den einzelnen Mehrfachbestimmungen für die Kontrollen (cpm) und die SI-Werte der Testansätze und der Positivkontrollen. Falls vorhanden, sollte für jede Testsubstanz eine Angabe darüber gemacht werden, wie nach Literaturangaben die Sensitivität und die Spezifität einzuschätzen ist. Es sollte aus dem Befund deutlich hervorgehen, dass lediglich ein Parameter der Sensibilisierung gemessen wurde und somit das Ergebnis nur einen Mosaikstein in der Allergiediagnostik des Patienten darstellen kann.

### Modifikationen der Analytik

Die beschriebene Methode kann an vielen Stellen modifiziert werden. Hier einige Beispiele:

Die Lymphozyten werden üblicherweise über einen Ficoll oder Percoll Dichtegradienten angereichert [25]. Durch Variieren der Bedingungen kann in gewissen Grenzen der Anteil begleitender Monozyten sowie stimulierender oder hemmender Lymphozytensubpopulationen [26] beeinflusst werden.

Dem Inkubationsmedium kann anstelle des autologen Serums (Eigenplasma) ein kommerziell verfügbares AB-Spenderpoolserum zugesetzt werden. Aber die Inkubation in Eigenplasma führt oft zu einer stärkeren Stimulierung der Lymphozyten [27].

Endotoxin-Verunreinigungen in Allergenlösungen stimulieren unspezifisch die Proliferation [28]. Mittels Affinitätschromatographie über Polymyxinsäulen können Endotoxine zum größten Teil entfernt werden.

Das Zytokinmilieu beeinflusst die Entwicklung der Lymphozyten. Einige Untersucher fanden, dass durch Zugabe bestimmter Zytokine die Signalstärke stabilisiert und erhöht wird [9, 29].

Klassisch wird der LTT mit radioaktiv markiertem Thymidin durchgeführt, dessen Einbau in die DNS mittels Flüssigkeits- oder Festphasen-Szintillationszählung gemessen wird. Alternativ kann Bromdesoxyuridin eingesetzt werden, dessen Einbau in die DNS mit Antikörpern detektiert wird [27]. Eine weitere neuere Entwicklung liegt in der Verwendung von Carboxyfluoreszin-Verbindungen [30]. Die Analyse der proliferierten Zellen erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Die Methode liefert zusätzlich Information über die im Blut vorhandene Zahl an allergenspezifischen Zellen [10, 31]. Bei Untersuchungen zu Beryllium hatte diese Methode eine sehr hohe Spezifität, besser als der klassische LTT [11].

Neben der Messung der DNA-Synthese als generellen Proliferationsmarker lässt die Bestimmung von Zytokinen eine spezifische Aussage über stimulierte Zellen und ihre Funktionen zu. Daher wurden mehrere Alternativen zum klassischen LTT etabliert, die nicht auf Methoden der Proliferationsmessung, sondern auf die Bestimmung von Zytokinen im Überstand aufbauen [32, 33, 34, 35, 36]. Auf diese Messmethode wurde auch in der RKI-Stellungnahme zur Wertigkeit von Zytokinen in der Umweltmedizin Bezug genommen [37]. Die Ergebnisse scheinen im Prinzip mit denen des LTT vergleichbar zu sein. Analog zur durchflusszytometrischen Analyse von proliferierenden Zellen kann deren intrazelluläre Zytokinsynthese gemessen werden. Auch dies lässt spezifische Aussagen zu, ist jedoch noch nicht in der umweltmedizinischen Routine etabliert. Die neue Technik des Elispot macht ebenfalls zytokinsezernierende Zellen sichtbar, kann zwischen naiven und Memoryzellen unterscheiden, und es gibt positive Berichte in der Diagnostik von Metallunverträglichkeiten [12, 35, 38, 39, 40].

Der MELISA (memory lymphocyte immunostimulation assay) ist eine patentierte Variante des LTT, die in der Literatur kontrovers diskutiert wird [41, 42, 43, 44, 45, 46].

### Aussagekraft/Interpretation

#### Bedeutung des Stimulationsindex

Der LTT ist ein biologischer Test mit hoher Variabilität. Die Thymidineinbaureate der Positiv- und Negativkontrollen von verschiedenen Patienten unterscheidet sich stark, ebenso die Steigerung durch unspezifische Stimulanzen (Lektin). Deswegen sollte erst bei einem Stimulationsindex von  $> 2$  von einer möglichen Zunahme der Proliferationsrate ausgegangen werden. Bei einem SI von  $> 3$  kann bei guter Methodik eine Proliferationsstimulierung sicher angenommen werden. Ein SI zwischen 2 und 3 ist in der Regel grenzwertig und nur in einem sehr gut kontrollierten System „mit großer Wahrscheinlichkeit positiv“, wie in der ersten Mitteilung angegeben [1]. Bei Testsubstanzen, bei denen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die verwendeten Konzentrationen eine unspezifische T-Zell-Stimulation verursachen (z. B. native Medikamente, Allergenmischungen), kann u. U. erst bei einem noch höheren SI davon ausgegangen werden, dass eine spezifische Steigerung erfasst wird.

Ein Teil der großen interindividuellen Variabilität kommt dadurch zustande, dass ein geringer und unterschiedlicher Anteil der Lymphozyten im Kulturansatz allergenspezifisch ist (z. B. 1 unter 20.000 Lymphozyten). Je nach deren Anzahl beim einzelnen Patienten und der Anwesenheit von stimulierenden und hemmenden Faktoren kann der SI sehr unterschiedlich ausfallen.

#### Aussagekraft des LTT

Klassischerweise wird der LTT für den Nachweis einer Typ-4-Sensibilisierung (zellvermittelt) eingesetzt. Er beruht darauf, dass allergenspezifische Memory-Zellen in Anwesenheit des Allergens zur Proliferation angeregt werden. Ein positives Ergebnis spricht somit für eine bestehende Sensibilisierung, d. h. Reaktivität des

Immunsystems gegenüber dem Antigen. Damit ist aber noch nicht gesagt, dass dieses Antigen für eine klinisch relevante Allergie verantwortlich ist. Der LTT kann nur in Verbindung mit der Klinik sinnvoll interpretiert werden. Diese Grundproblematik besteht bei allen Allergietests: Auch bei einem positiven IgE ist die Assoziation mit klinischen Symptomen Allergen-abhängig. Zum Beispiel ist die Wahrscheinlichkeit einer klinisch relevanten Überempfindlichkeit bei positivem IgE für Insektengifte groß, bei positivem IgE für Schimmelpilze aber eher gering. Die automatische Gleichsetzung einer Sensibilisierung mit einer evidenten Allergie ist nicht statthaft, da nicht jede Sensibilisierung zu einer Allergie führt. Auch zeigt eine Sensibilisierung nicht in jedem Fall an, dass der betroffene Patient mit dem entsprechenden Allergen aktuell und dauerhaft exponiert ist. Ein positiver Allergietest ist lediglich ein Hinweis darauf, dass dieses Allergen bei gegebener Exposition für die klinische Symptomatik verantwortlich sein könnte.

Ähnlich wie bei anderen Allergietests können auch beim LTT trotz „lege artis“-Durchführung aufgrund der biologischen Variabilität weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse sicher ausgeschlossen werden. Die meisten Erfahrungen liegen bei Arzneimitteln vor [19, 34]. Der prädiktive Wert des LTT variiert von Medikament zu Medikament [19].

Auch von Metall zu Metall gibt es Unterschiede in der klinischen Aussagekraft [47]. Für Beryllium ist die Sensitivität gut [11]. Für Nickel ist die Sensitivität möglicherweise hinreichend gut, aber die Spezifität weniger befriedigend. Bei Metallen, die für Implantate relevant sind, wurden in letzter Zeit Untersuchungen durchgeführt [48], die aber noch nicht ausreichen, um eine Empfehlung ableiten zu können [49].

LTT-Ergebnisse können artifiziell positiv werden, wenn durch zu hohe Allergenkonzentrationen die Proliferation von Lymphozyten unspezifisch stimuliert wird. Dies ist möglicherweise eine Ursache für die hohe Zahl von positiven LTT-Ergebnissen gegenüber einigen Metallen wie Quecksilber und Nickel. Durch gewisse Etablierung und Validierung kann man zumindest bei Standardaller-

genen das Risiko minimieren, dass unspezifische Stimulationskonzentrationen eingesetzt werden.

### LTT als Bestandteil der Allergiediagnostik

Der LTT kann nur ein Mosaikstein in der Beurteilung einer Hyperreaktivität sein [50, 51]. Andere Beurteilungskriterien sind die Expositionsanamnese (der Patient muss mit der Substanz in Kontakt gekommen sein) und der zeitliche Zusammenhang mit dem Auftreten der Symptomatik, der Epikutantest und unter Umständen ein Provokationstest (inhalativ, oral). Wie der LTT misst auch der Epikutantest eine Sensibilisierung, aber mit dem Unterschied, dass der LTT eher die systemischen Lymphozyten erfasst und der Epikutantest überwiegend dermale Effekte anzeigt. Für verschiedene Stoffe ist die Sensitivität von Epikutantest und LTT vergleichbar [19, 52].

### Vorteile des LTT im Vergleich zum Epikutantest

Der LTT bringt keine Risiken für den Patienten wie Induktion oder Verstärken einer Überempfindlichkeit, Induktion von Hauterscheinungen, Ulzeration, Keloidbildung, Verfärbung, anaphylaktische Reaktionen und ist auch nicht von der Hautbeschaffenheit abhängig. Die mit dem Epikutantest verbundenen Unannehmlichkeiten und der Zeitaufwand für den Patienten entfallen [53]. Es wird nicht die lokale, sondern die systemische Sensibilisierung getestet, was bei entsprechender Manifestation vorteilhaft sein kann. Ferner ist die Auswertung beim LTT weniger subjektiv [54].

### Nachteile des LTT

Der LTT erfordert die Abnahme einer größeren Menge Blut (je nach Zahl der Messparameter), was vor allem bei Kindern ein Problem sein kann. Er ist sehr personalintensiv, zeitaufwendig, störanfällig und damit auch recht teuer. Das LTT-Ergebnis ist außerdem, wie oben beschrieben, nur ein Mosaikstein in der Allergiediagnostik.

## Qualitätssicherung

Die qualitative Wertigkeit des Testes ist abhängig von der Validierung und dem Qualitätsbewusstsein im durchführenden Labor. Wie schon dargelegt, gibt es sehr viele methodische Varianten, die einen Einfluss auf das Ergebnis haben können.

Das Labor ist verpflichtet, die Richtlinien der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) in der aktuellen Fassung oder alternativ die Festlegung der entsprechenden Normen (vor allem DIN/EN/ISO 17025 oder 15189) einzuhalten. Es sollte Aussagen zur diagnostischen Schärfe seines Testes machen können, indem Ergebnisse (SI-Werte) von Patienten mit Allergie und Ergebnisse von Patienten ohne Allergie auf den entsprechenden Stoff getrennt geführt werden.

Ein grundsätzliches Problem besteht darin, dass einheitliche vitale Lymphozyten-Präparate jeweils nur in geringer Menge (typische Blutabnahme etwa 20 ml, im Extremfall einer Blutspende bis 500 ml) zur Verfügung stehen können. Sie sind weder innerhalb eines Labors als Kontrolle längerfristig verfügbar, noch reichen in der Regel die Mengen aus, um zwischen Laboren Ringversuche durchzuführen. Damit sind die Möglichkeiten einer Standardisierung derzeit ziemlich begrenzt. Bei Vergleichsuntersuchungen zum Beryllium-LTT ergaben sich zwischen Laboren Unterschiede, die größer waren, als man durch Zufall erwartet hätte [55].

### Hinweise zur Indikation

In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Publikationen dem LTT, auch in der Variante als MELISA zum Teil ein hoher Stellenwert in der umweltmedizinischen Diagnostik von Typ-4-Allergien eingeräumt [54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]. Die Kommission gibt zur Indikation folgende Hinweise:

Bei Verdacht auf Hypersensibilisierung vom Typ 4 erscheint es in der Regel sinnvoll, zuerst einen Epikutantest durchzuführen und danach erst die Möglichkeit eines LTT in Erwägung zu ziehen, vor allem wenn bei dringendem klinischen Verdacht auf eine Kontaktallergie der Epikutantest ein negatives oder fraglich positives Ergebnis (unspezifische Hautreak-



tion) geliefert hat. Bei Verdacht auf Substanzen mit potenziell stark sensibilisierenden oder karzinogenen Eigenschaften ist es gerechtfertigt, den LTT ohne vorangehenden Epikutantest durchzuführen.

### Indikation vonseiten des Allergens

Der breiteste anerkannte Anwendungsbereich ist die Diagnostik von Arzneimittel-unverträglichkeiten [19, 34]. Dabei ist die diagnostische Aussagekraft von Arzneimitteln zu Arzneimitteln unterschiedlich.

Das zweite anerkannte Gebiet ist die Diagnostik einer Berylliose. Allerdings sollten auch hier die Ergebnisse kritisch betrachtet werden [63, 64].

Das dritte Gebiet ist das der Kontaktallergene [65]. Die meisten Untersuchungen liegen zum Nickel vor. In den letzten Jahren haben zahlreiche Arbeiten eine Assoziation zwischen positivem LTT (oder Zytokinfreisetzung unter Nickel) und Nickelallergie aufgezeigt. Aber der Nickel-LTT kann vor allem bei unsachgemäßer Durchführung auch falsch-positive Ergebnisse liefern, sodass seine Anwendung derzeit nur in Verbindung mit einem gut begründeten Verdacht auf Nickelallergie gerechtfertigt ist. Auch bei Quecksilber gibt es Hinweise, dass der LTT für den Nachweis einer Amalgamunverträglichkeit nicht nützlich ist [66, 67]. Für verschiedene andere Metalle liegen weniger verwertbare Ergebnisse vor. Bei den Implantat-Metallen sind LTT [49] und modifizierte Testsysteme [58] derzeit in der Erprobung.

### Indikation vonseiten der Patienten

Eine Indikation vonseiten des Patienten kann bestehen, wenn die Epikutantestung kein sicheres Ergebnis liefert, wie z. B. unter hoch dosierter Steroidtherapie und Immunsuppression, oder wenn die letzte Epikutantestung weniger als 12 Monate zurückliegt, gegebenenfalls auch bei Kindern unter 6 Jahren (unter Abwägung der Belastung einer Epikutantestung vs. Blutabnahme) sowie potenziell bei spezifischen Patientengruppen und eventuell bei Schwangeren.

### Präventive Testung

Von einer präventiven Testung kann man Informationen über mögliche Unverträglichkeiten gegenüber einzelnen Stoffen, z. B. Implantatmaterialien im Vorfeld einer Implantierung erhoffen. Dabei ist zu beachten, dass an die Aussagekraft eines solchen präventiven Tests besonders hohe Maßstäbe bezüglich Sensitivität und Spezifität gestellt werden müssen, um zu vermeiden, dass Patienten durch falsch-positive Ergebnisse auf geeignete Implantatmaterialien verzichten müssen. Solange dies nicht gesichert ist, erscheint eine präventive Testung nur in begründeten Ausnahmefällen und bei entsprechendem anamnestischem Verdacht durch einen Allergologen empfehlenswert.

### Einstufung durch die RKI-Kommission

Unter der Voraussetzung, dass die beschriebenen Qualitätsaspekte beachtet werden, kann man den LTT nach dem Bewertungsraster der Kommission [68] folgendermaßen einordnen:

Spezifischer LTT zum Nachweis einer medikamentös-allergischen Reaktion und einer Sensibilisierung gegenüber Beryllium: Kategorie IA (Zitat: „Eine Maßnahme kann bei gegebener umweltmedizinischer Indikation uneingeschränkt empfohlen werden“).

Spezifischer LTT zum Nachweis einer Kontaktallergie gegenüber Nickel: Kategorie II („Eine Maßnahme kann bei gegebener umweltmedizinischer Indikation unter Vorbehalten empfohlen werden“).

Spezifischer LTT zum Nachweis allergischer Reaktionen gegenüber anderen „Umweltstoffen“: Kategorie III (Zitat: „Zu einer Maßnahme kann keine Empfehlung ausgesprochen werden, weil kein ausreichendes Untersuchungsmaterial vorliegt“).

### Federführung

Prof. Dr. Reinhild Klein (externe Sachverständige), Medizinische Klinik II, Universität Tübingen, Otfried-Müller-Str. 10, 72076 Tübingen; Prof. Dr. Michael Schwenk (Tübingen)

### Externe Sachverständige

Dr. Volker von Baehr, IMD-Institut für Medizinische Diagnostik, Nicolaistr. 22, 12247 Berlin-Steglitz; Prof. Dr. Harald Renz, Universitätsklinikum Gießen, Standort Marburg, Abt. Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik – Zentrallaboratorium, Baldingerstraße, 35043 Marburg; Prof. Dr. Ulrich Sack, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Leipzig, Johannisallee 30, 04103 Leipzig

### Kommissionsmitglieder

Dr. A. Beyer (Umweltmed. Ambulanz Berlin-Steglitz/Zehlendorf), Prof. Dr. W. Dott (Universitätsklinikum Aachen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin), Prof. Dr. H. Drexler (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin), Prof. Dr. H. Dunkelberg (Universität Göttingen, Abt. Allg. Hygiene u. Umweltmedizin), Prof. Dr. Th. Eikmann (Universität Gießen, Institut f. Hygiene u. Umweltmedizin), Dr. B. Heinzow (Landesamt für soziale Dienste Schleswig-Holstein, Dezernat Umweltbezogener Gesundheitsschutz), Prof. Dr. C. Hornberg (Universität Bielefeld, Fakultät für Gesundheitswissenschaften), Prof. Dr. Dr. A.D. Kappos (Frankfurt/Main), Prof. Dr. K.E. von Mühlendahl (Kinderhospital Osnabrück, Gemeinnützige Kinderumwelt GmbH), Prof. Dr. D. Nowak (LMU München, Klinikum Innenstadt, Institut u. Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin), PD Dr. F.-A. Pitten (Institut für Krankenhaushygiene und Infektionskontrolle GbR, Gießen), Dr. W. Stück (Ökologischer Ärztenbund/ISDE, Koblenz), Prof. Dr. M. Schwenk (Tübingen), Dr. R. Suchenwirth (Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Abt. Umweltmedizin/Epidemiologie, Hannover), Prof. Dr. M. Wilhelm (Universität Bochum, Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin).

### Ständige Gäste

Dr. N. Englert (Umweltbundesamt, Berlin), Dr. A. Hahn (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin), Dr. U. Winkler

(Bundesministerium für Gesundheit, Referat 332).

## Geschäftsstelle im RKI

Dr. D. Eis, Dr. U. Wolf.

## Literatur

1. RKI-Kommission-Umweltmedizin (2002) Diagnostische Relevanz des Lymphozytentransformationstests in der Umweltmedizin. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 45:745–749
2. Gerber BO, Pichler WJ (2004) Cellular mechanisms of T cell mediated drug hypersensitivity. *Current Opinion Immunol* 16:732–737
3. Pichler WJ, Beeler A, Keller M, et al. (2006) Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int* 55:17–25
4. Templeton DM (2004) Mechanisms of immunosensitization to metals (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 76:1255–1268
5. Lu L, Vollmer J, Moulon C, et al. (2003) Components of the ligand for a Ni<sup>++</sup> reactive human T cell clone. *J Experimental Med* 197:567–574
6. Scott BL, Wang Z, Marrone BL, Sauer NN (2003) Potential binding modes of beryllium with the class II major histocompatibility complex HLA-DP: a combined theoretical and structural database study. *J Inorganic Biochemistry* 94:5–13
7. Amicosante M, Deubner D, Saltini C (2005) Role of the berylliosis-associated HLA-DP<sup>Glu69</sup> supratypic variant in determining the response to beryllium in a blood T-cells beryllium-stimulated proliferation test. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 22: 175–179
8. Thierse HJ, Gamedinger K, Junkes C, et al. (2005) T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology* 209:101–107
9. von Baehr V, Mayer W, Liebenthal C, et al. (2001) Improving the in vitro antigen specific T cell proliferation assay: the use of interferon-alpha to elicit antigen specific stimulation and decrease bystander proliferation. *J Immunol Methods* 251:63–71
10. Quah BJ, Warren HS, Parish CR (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols* 2:2049–2056
11. Milovanova TN (2007) Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. *Cytometry* 72:265–275
12. Lindemann M, Bohmer J, Zabel M, Grosse-Wilde H (2003) ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin Exp Allergy* 33:992–998
13. Bullens DM, Van Den Keybus C, Dilissen E, et al. (2004) Allergen-specific T cells from birch-pollen-allergic patients and healthy controls differ in T helper 2 cytokine and in interleukin-10 production. *Clin Exp Allergy* 34:879–887
14. Burton MD, Papalia L, Eusebius NP, et al. (2002) Characterization of the human T cell response to rye grass pollen allergens Lol p 1 and Lol p 5. *Allergy* 57:1136–1144
15. Rimaniol AC, Garcia G, Till SJ, et al. (2003) Evaluation of CD4+ T cells proliferating to grass pollen in seasonal allergic subjects by flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 132:76–80
16. Parga Lozano C, Marrugo Cano J, Hernandez Bonfante L (2004) Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells to the recombinant allergen BtM of the *Blomia tropicalis* housedust mite. *Allergol Immunopathol (Madr)* 32:247–251
17. Ohki O, Yokozeki H, Katayama I, Nishioka K (2001) Clinical characteristics of mite allergen specific-lymphocytes stimulation test-positive Japanese cases with adult type atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 26:25–35
18. Prahl P, Sonderstrup Hansen G (1982) Lymphocyte responses to an aqueous extract from cow hair and dander. Investigations of asthmatics and normal controls with lymphocyte transformation tests. *Allergy* 37:155–160
19. Pichler WJ, Tilch J (2004) The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 59:809–820
20. Keizer TS, Sauer NN, McCleskey TM (2005) Beryllium binding at neutral pH: the importance of the Be-O-Be motif. *J Inorganic Biochemistry* 99: 1174–1181
21. Di Gioacchino M, Verna N, Di Giampaolo L, et al. (2007) Immunotoxicity and sensitizing capacity of metal compounds depend on speciation. *Internat J Immunopathol Pharmacol* 20:15–22
22. Ryan CA, Cruse LW, Skinner RA, et al. (2002) Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay. *Food Chem Toxicol* 40:1719–1725
23. Brattig NW, Diao GJ, Berg PA (1988) The specificity of the lymphocyte transformation test in a patient with hypersensitivity reactions to pyrazolone compounds. A 10-week follow-up study before and after rechallenge. *Eur J Clinical Pharmacol* 35: 39–45
24. Hallab NJ (2004) Lymphocyte transformation testing for quantifying metal-implant-related hypersensitivity responses. *Dermatitis* 15:82–90
25. Nordlind K (1984) Lymphocyte transformation test in diagnosis of nickel allergy. A comparison between the separation of peripheral blood lymphocytes on Ficoll-Paque, Percoll or by gravity sedimentation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 73:151–154
26. Moed H, von Blomberg BM, Bruynzeel DP, et al. (2005) Regulation of nickel-induced T-cell responsiveness by CD4+CD25+ cells in contact allergic patients and healthy individuals. *Contact Dermatitis* 53:71–74
27. Farris GM, Newman LS, Frome EL, et al. (2000) Detection of beryllium sensitivity using a flow cytometric lymphocyte proliferation test: the Immuno-Be-LPT. *Toxicology* 143:125–140
28. Cirkovic Velickovic T, Thunberg S, Polovic N, et al. (2007) Low levels of endotoxin enhance allergen-stimulated proliferation and reduce the threshold for activation in human peripheral blood cells. *Int Arch Allergy Immunol* 146:1–10
29. Moed H, von Blomberg M, Bruynzeel DP, et al. (2005) Improved detection of allergen-specific T-cell responses in allergic contact dermatitis through the addition of „cytokine cocktails“. *Experimental Dermatology* 14:634–640
30. Hawkins ED, Hommel M, Turner ML, et al. (2007) Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nature Protocols* 2:2057–2067
31. Givan AL (2007) A flow cytometric assay for quantification of rare antigen-specific T cells: using cell-tracking dyes to calculate precursor frequencies for proliferation. *Immunological Investigations* 36:563–580
32. Cederbrant K, Anderson C, Andersson T, et al. (2003) Cytokine production, lymphocyte proliferation and T-cell receptor Vbeta expression in primary peripheral blood mononuclear cell cultures from nickel-allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 132:373–379
33. Minang JT, Arestrom I, Zuber B, et al. (2006) Nickel-induced IL-10 down-regulates Th1- but not Th2-type cytokine responses to the contact allergen nickel. *Clin Exp Immunol* 143:494–502
34. Merk HF (2005) Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology* 209:217–220
35. Jakobson E, Masjedi K, Ahlborg N, et al. (2002) Cytokine production in nickel-sensitized individuals analysed with enzyme-linked immunospot assay: possible implication for diagnosis. *Br J Dermatol* 147:442–449
36. Klein R, Schwenk M, Templeton DM (2006) Cytokine profiles in human exposure to metals. *Pure Appl Chem* 78:2155–2168
37. RKI-Kommission-Umweltmedizin (2004) Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 47:73–79
38. Minang JT, Arestrom I, Troye-Blomberg M, et al. (2006) Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol* 146: 417–426
39. Janetzki S, Cox JH, Oden N, Ferrari G (2005) Standardization and validation issues of the ELISPOT assay. *Methods Molecular Biology (Clifton, NJ)* 302:51–86
40. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BM, et al. (2007) Allergic contact dermatitis to nickel: modified in vitro test protocols for better detection of allergen-specific response. *Contact Dermatitis* 56:63–69
41. Stejskal VD, Forsbeck M, Cederbrant KE, Asteman O (1996) Mercury-specific lymphocytes: an indication of mercury allergy in man. *J Clinical Immunol* 16:31–40
42. Yaqob A, Danersund A, Stejskal VD, et al. (2006) Metal-specific lymphocyte reactivity is down-regulated after dental metal replacement. *Neuro Endocrinology Letters* 27:189–197
43. Brehler R, Becker D, Merk H (1998) MELISA – in vitro test for detection of contact allergy? A comment by the German Contact Allergy Group. *Hautarzt* 49:418–419
44. Koene RA (2005) The „memory lymphocyte immunostimulation assay“ (MELISA) is useless for the detection of metal allergy. *Ned Tijdschr Geneesk* 149:2090–2092
45. Feilzer AJ (2005) The „memory lymphocyte immunostimulation assay“ (MELISA) is useless for the detection of metal allergy. *Ned Tijdschr Geneesk* 149:2644–2645; author reply 2645
46. Bieger WP (2005) Der LTT in der MELISA-Version – nur bedingt geeignet für Typ IV Metallreaktionen. *J Lab Med* 29:65–66
47. Klein R, Schwenk M, Heinrich-Ramm R, Templeton DM (2004) Diagnostic relevance of the lymphocyte transformation test for sensitization to beryllium and other metals (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 76:1269–1281
48. Thomas P, Bandl WD, Maier S, et al. (2006) Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyperresponsiveness in vitro: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis* 55:199–202

49. Thomas P, Schuh A, Ring J, Thomsen M (2008) [Orthopedic surgical implants and allergies: Joint statement by the Implant Allergy Working Group (AK 20) of the DGOOC (German Association of Orthopedics and Orthopedic Surgery), DKG (German Contact Dermatitis Research Group) and DGAKI (German Society for Allergology and Clinical Immunology)]. *Orthopäde* 37:75–88
50. Renz H, Becker WM, Bufer A, et al. (2002) In-vitro-Allergiediagnostik. Leitlinie der DGAI in Abstimmung mit der DDG. *Allergo J* 11:492–506
51. Przybilla B, Aberer W, Bircher AJ, et al. (2008) Allergological approach to drug hypersensitivity reactions. *J Dtsch Dermatol Ges* 6:240–243
52. Ott H, Baron J, Merk HF (2006) In vitro allergy testing. *Hautarzt* 57:502, 504–508
53. Wolf R, Davidovici B, Marcos B, Orion E (2005) Lymphocyte transformation test in patients with allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 53:245
54. Bartram F, Höhne L, von Baehr V, et al. (2007) Umweltmedizinischer Anamneseepfad in der Zahnmedizin/Umwelt-ZahnMedizin. Empfehlungen des Arbeitskreises Zahnmedizin des Deutschen Berufsverbandes der Umweltmediziner e.V. *Umwelt Medizin Gesellschaft* 20:89–98
55. Cher DJ, Deubner DC, Kelsh MA, et al. (2006) Assessment of the beryllium lymphocyte proliferation test using statistical process control. *Inhalation Toxicol* 18:901–910
56. von Baehr V, Hermes A, von Baehr R, et al. (2005) Allergoid-specific T-cell reaction as a measure of the immunological response to specific immunotherapy (SIT) with a Th1-adjuvanted allergy vaccine. *J Investig Allergol Clin Immunol* 15: 234–241
57. Bartram F, Donate HP, Müller KE, et al. (2006) Bedeutung von Epikutantest und Lymphozytentransformationstest für die Diagnostik von Typ IV-Sensibilisierungen. *Umwelt Medizin Gesellschaft* 19:295–299
58. von Baehr V (2007) Zum aktuellen Stand der Labordiagnostik für die ZahnMedizin. *Umwelt Medizin Gesellschaft* 20:99–105
59. Bartram F, Donate HP, Müller KE, et al. (2006) Significance of the patch test and the lymphocyte transformation test in the diagnostics of type IV sensitization. *J Lab Med* 30:101–106
60. Valentine-Thon E, Muller KE, Guzzi G, et al. (2006) LTT-MELISA(R) is clinically relevant for detecting and monitoring metal sensitivity. *Neuro Endocrinol Letters* 27(Suppl 1):17–24
61. Stejskal V (2006) The „memory lymphocyte immunostimulation assay“ (MELISA) is useless for the detection of metal allergy. *Ned Tijdschr Geneesk* 150:520; author reply 520–521
62. Muller KE, Valentine-Thon E (2006) Hypersensitivity to titanium: clinical and laboratory evidence. *Neuro Endocrinol Letters* 27(Suppl 1):31–35
63. Donovan EP, Kolanz ME, Galbraith DA, et al. (2007) Performance of the beryllium blood lymphocyte proliferation test based on a long-term occupational surveillance program. *Internat Arch Occupatational Environmental Health* 81:165–178
64. Maier LA (2001) Beryllium health effects in the era of the beryllium lymphocyte proliferation test. *Applied Occupational Environmental Hygiene* 16:514–520
65. Merk HF (2005) Lymphocyte transformation test as a diagnostic test in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 53:246
66. Cederbrant K, Hultman P (2000) Characterization of mercuric mercury (Hg<sup>2+</sup>)-induced lymphoblasts from patients with mercury allergy and from healthy subjects. *Clin Exp Immunol* 121:23–30
67. Kohler W, Linde K, Halbach S, et al. (2007) Prognosis in the diagnosis of amalgam hypersensitivity a diagnostic case-control study. *Forschende Komplementarmedizin* (2006) 14:18–24
68. RKI-Kommission-Umweltmedizin (2001) Grundsätze der Bewertung von umweltmedizinischen Methoden. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 44:519–522
69. Hallab NJ, Anderson S, Stafford T, et al. (2005) Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 23:384–391
70. Hallab NJ, Caicedo M, Finnegan A, Jacobs JJ (2008) Th1 type lymphocyte reactivity to metals in patients with total hip arthroplasty. *J Orthopaedic Surg Res* 3:6
71. Lindemann M, Rietschel F, Zabel M, Grosse-Wilde H (2008) Detection of chromium allergy by cellular in vitro methods. *Clin Exp Allergy* (in press)
72. Rustemeyer T, von Blomberg BM, van Hoogstraten IM, et al. (2004) Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel. *Clin Exp Allergy* 34:1458–1466
73. Cederbrant K, Gunnarsson LG, Marcusson JA (2000) Mercury intolerance and lymphocyte transformation test with nickel sulfate, palladium chloride, mercuric chloride, and gold sodium thiosulfate. *Environmental Res* 84:140–144
74. Christiansen J, Farm G, Eid-Forest R, et al. (2006) Interferon-gamma secreted from peripheral blood mononuclear cells as a possible diagnostic marker for allergic contact dermatitis to gold. *Contact Dermatitis* 55:101–112
75. Borak J, Woolf SH, Fields CA (2006) Use of beryllium lymphocyte proliferation testing for screening of asymptomatic individuals: an evidence-based assessment. *J Occupational Environmental Med/American College of Occupational and Environmental Medicine* 48:937–947
76. Stange AW, Furman FJ, Hilmars DE (2004) The beryllium lymphocyte proliferation test: relevant issues in beryllium health surveillance. *Am J Industrial Med* 46:453–462
77. Farrer DG, Hueber SM, McCabe MJ Jr (2005) Lead enhances CD4+ T cell proliferation indirectly by targeting antigen presenting cells and modulating antigen-specific interactions. *Toxicol Applied Pharmacol* 207:125–137
78. Carey JB, Allshire A, van Pelt FN (2006) Immune modulation by cadmium and lead in the acute reporter antigen-popliteal lymph node assay. *Toxicol Sci* 91:113–122
79. Sieben S, Hertl M, Al Masaoudi T, et al. (2001) Characterization of T cell responses to fragrances. *Toxicol Applied Pharmacol* 172:172–178