

LYMFOSYYTTISTIMULAATIOTESTI LÄÄKEAINEALLERGIAN DIAGNOSTIIKASSA

Elina Neittaanmäki

Opinnäytetutkielma

Lääketieteen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos/Ihotaudit

Toukokuu 2015

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

NEITTAANMÄKI, ELINA K. M.: Lymfosyyttistimulaatiotesti lääkeaineallergian diagnostiikassa

Opinnäytetutkielma, 47 sivua, 5 liitettä (10 sivua)

Tutkielman ohjaaja: dosentti Rauno Harvima

Toukokuu 2015

Asiasanat: allergia, allergiatestit, lymfosyyttistimulaatiotesti, lääkeallergia, lääkeihottumat

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia lymfosyyttistimulaatiotestiä (LST) (synonyymi lymfosyyttitransformaatiotesti) lääkeaineallergian diagnostiikassa. Aineisto koostui potilaista, jotka olivat tulleet allergiatutkimuksiin Kuopion yliopistollisen sairaalan ihotautien klinikkaan v. 1998–2013. Tutkimuksen lähtökohtana oli koota aineistosta potilaiden diagnoosit ja heille tehdyt allergiatutkimukset. Tavoitteena oli vertailla allergiatutkimusten tuloksia keskenään. Tutkielman tarkoitus oli toimia pilottitutkimuksena, joka arvioi LST:n käyttökelpoisuutta ja luotettavuutta lääkeaineallergian diagnostiikassa.

Tutkimustulokset kerättiin potilaiden sairauskertomusteksteistä jälkeenpäin v. 2010 ja v. 2014–2015. Aineisto koostui 51 potilaasta, joista 44:lle oli tutkittu lääkeaineita lymfosyyttistimulaatiotestillä v. 1998–2013. Lisäksi viidellä potilaalla oli tutkittu nikkeli-allergiaa ja kahdella vehnä- ja ohra-allergiaa ja myös nämä tulokset sisällytettiin tähän tutkimukseen. Kaikille aineiston potilaille oli tehty LST, jonka tulokseksi oli kirjattu positiivinen, negatiivinen tai epävarma. Osalle potilaista oli tehty altistus, jolla poissuljettiin tai varmistettiin allergia. Lääkeaineille tehtyjä lymfosyyttistimulaatiotestejä oli 60 kpl, joista LST oli positiivinen kuudessa tapauksessa eli 10 %:ssa, epävarma neljässä eli 7 %:ssa ja negatiivinen 50:ssä eli 83 %:ssa tapauksista. Altistuskokeella 44 potilaan joukosta allergia varmistettiin viiden potilaan kohdalla (11 % potilaista) ja poissuljettiin 15 potilaan kohdalla (34% potilaista). Siten 24 potilaan kohdalla allergia jäi epäselväksi (55 % potilaista). Useiden potilaiden kohdalla LST oli ainoa toteutunut allergiatesti.

Tutkimusta hankaloitti se, että alkuasetelmassa ei vakioitu potilaalle tehtäviä allergiatutkimuksia. Siten potilaat olivat keskenään hyvin heterogeeninen joukko, joita yhdisti se, että heillä epäiltiin lääke-aineallergiaa ja LST oli suoritettu kaikille. Lisäksi useita lääkeaineita testattiin vain kerran. Hyviä tuloksia saatiin beetalaktaami-allergian yhteydessä, koska altistus oli useimmiten suoritettu ja määrällisesti beetalaktaami-allergiaepäilyjä oli aineistossa eniten. Negatiivisista altistuksista kefaleksiinille 5/6, fenoksimetyylipenisilliinille 2/3 ja bentsyylipenisilliinille 3/3 antoi negatiivisen LST:n tuloksen.

Tulosten luotettavuus olisi parantunut, jos LST olisi suoritettu rutiinisti kaikille potilaille samaan aikaan suhteessa lääkkeen aiheuttamaan reaktioon. Lisäksi muiden tekijöiden, kuten immunosuppressiivisten lääkkeiden testiä häiritsevä vaikutus, huomioonottaminen olisi tarkentanut tutkimustuloksia.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Medicine

Medicine

NEITTAANMÄKI, ELINA K. M.: Lymphocyte stimulation test in the diagnosis of drug allergy

Thesis, 47 pages, 5 appendixes (10 pages)

Tutor: Rauno Harvima, docent

May 2015

Key words: allergy, allergy tests, drug allergy, drug eruptions, lymphocyte stimulation test

The aim of this thesis was to explore the lymphocyte stimulation test (LST) (synonym lymphocyte transformation test) in the diagnosis of drug allergy. The data consisted of patients with a suspicion of a drug allergy and they were treated and diagnosed in Kuopio University Hospital's Clinic of Dermatology in 1998–2013. The starting point of the study was to collect together patient's diagnoses and the results of the performed allergy tests. The aim was to compare the test results. The thesis works as a pilot study and evaluates the feasibility and reliability of LST in drug allergy.

The data from the patient case history were collected retrospectively in 2010 and 2014–15. The data consisted of 51 patients, from which 44 patients had a drug-allergy suspicion. Additionally, five patients were tested by LST for nickel allergy and two patients for wheat- and oat-allergy. LST was performed to all of the patients and the result was given as positive, negative or unclear. In some cases also the drug exposure was performed and in these cases the drug allergy was either excluded or confirmed. The number of LSTs performed for drugs was 60. LST was positive in six cases (10 % of all tests performed for drugs), unclear in 4 cases (7 %) and negative in 50 cases (83 %). By drug exposure in 44 patients the allergy was confirmed in five patients (11 % of patients) and excluded in 15 patients (34 % of patients), so in 24 patients (55 % of patients) the drug exposure wasn't performed and the allergy stayed unclear. In many cases LST was the only allergy test performed.

The research was partly troublesome because at project start-up few things were not been considered. Firstly, the patients were a heterogeneous group considering the fact that the only things connecting them were that LST was performed and there was a suspicion of drug allergy. Secondly, it was not standardized which allergy tests will be made and the moment of LST commensurate to the drug reaction was varying. Thirdly, many drugs had been tested only once. Good results were got in allergies to betalactams. In these cases the exposure was mostly performed and the number of betalactam-allergy suspects was the biggest in the data. From the negative exposures to cephalexin 5 of 6, phenoxymethylpenicillin 2 of 3 and benzylpenicillin 3 of 3 gave negative results in LST.

The reliability of the results could have been higher, if LST would have been performed in the standardized moment commensurate to the drug reaction. In addition other factors, such as considering the action of immunosuppressive drugs to LST test results, could have been resulted in more precise research results.

Sisältö

1 TEOREETTINEN TAUSTA

1.1 Yliherkkyys

1.2 Immunologisen kudoksen vaurion mekanismit

1.2.1 Anafylaktinen eli tyypin 1 allerginen reaktio

1.2.2 Sytolyyttinen eli tyypin 2 allerginen reaktio

1.2.3 Immunokompleksivälitteinen eli tyypin 3 allerginen reaktio

1.2.4 Soluvälitteinen eli tyypin 4 allerginen reaktio

1.3 Lääkeihottumat

1.3.1 Mekanismit

1.3.2 Lääkeihottumien taudinkuvat

1.3.2.1 Eksanteema

1.3.2.2 Urtikaria ja angioödeema

1.3.2.3 Erythema fixum

1.3.2.4 Stevens-Johnsonin oireyhtymä ja toksinen epidermaalinen nekrolyysi

1.4 Allergiatestit *in vivo*

1.4.1 Prick-testi

1.4.2 Intrakutaanitesti

1.4.3 Epikutaanikokeet

1.4.4 Altistus osastolla

1.5 Allergiatestit *in vitro*

1.5.1 Lymfosyyttistimulaatiotesti

1.5.2 Spesifisen IgE:n määrittäminen seerumista

1.5.2.1 Allergeenikomponentti-tutkimukset

1.5.2.2 Mikrosirututkimus

1.5.3 RAST-inhibitioanalyysi

1.6 Histamiini *in vitro* -liberaatio

1.6.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia eli HPLC

1.6.2 Radioimmuunianalyysi eli RIA

1.6.3 Radioensyyminanalyysi eli REA

2 TUTKIMUSTEHTÄVÄ

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Tutkimuspaikka ja –ajankohta

3.2 Potilaiden ikä- ja sukupuolijakauma

3.3 Aineiston keräys

3.4 Lymfosyyttistimulaatiotestin laboratoriotekniikka

4 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

4.1 Koko aineisto

4.2 Tulokset ryhmälle 1

4.3 Tulokset ryhmälle 2

4.4 Tulokset nikkeli-allergiassa ja vehnä- ja ohra-allergiaepäilyn yhteydessä

5 POHDINTA

6 YHTEENVETO

7 LÄHDELUETTELO

8 LIITTEET

Johdanto

Lymfosyyttistimulaatiotesti (LST) on soluviljelyyn perustuva allergiatutkimusmenetelmä. Testin laboriotekniikan kuvasivat ensimmäisinä Holland ja Mauer v. 1964 ja Caron ja Sarkany v. 1965. Tutkimusta voidaan käyttää allergian osoittamiseksi joillekin ruoka-aineille, lääkeaineille ja kosketusantigeeneille. LST mittaa T-muistisolujen vastetta lääkeaineelle. Se perustuu havaintoon, että spesifiset T-solut laajenevat ja jakautuvat kohdatessaan antigeenin. Käytännössä mitataan ³H-tymidiinin (tritioitu tymidiini) sisäänottoa jakautuvissa soluissa.

Lymfosyyttistimulaatiotesti ei ole tullut rutiinikäyttöön lääkeaineallergian diagnostiikassa. Testin spesifisyydestä ja sensitiivisyydestä on saatu vaihtelevia tuloksia ja sen käyttöä rajoittaa ennen kaikkea systemaattisten tutkimustulosten puute. Lisäksi, vaikka testi on kokeneissa käsissä yksinkertainen suorittaa, vaatii laboriotekniikka kuitenkin huolellisuutta ja käytännön kokemusta. Testitulosten saaminen vie enemmän aikaa kuin esim. ihotestien kohdalla. Potilaalle tutkimus on helppo ja turvallinen, sillä näytteeksi tarvitaan vain pieni määrä potilaan veriseerumia.

Yleisesti on arvioitu, että 5–10 %:lla väestöstä olisi allergiaa yhtä tai useampaa lääkeainetta kohtaan. Yksittäiselle lääkeaineelle allergiat ovat kuitenkin harvinaisia. Lääkeallergioiden diagnostiikassa ongelmallista on se, että kemiallisilta ja farmakologisilta ominaisuuksiltaan erilaiset lääkeaineet aiheuttavat keskenään erilaisia immuunireaktioita. Tällöin luotettavan *in vitro* -testin löytäminen, joka voisi yksin kattaa lääkeaineallergian diagnostiikan, on käytännössä mahdotonta. Tällä hetkellä allergiadiagnostiikassa vain lääkealtistuksella voidaan lopulta varmistua allergiasta. Altistuksella on kuitenkin omat heikkoutensa, joista merkittävin on se, että altistusta ei voida suorittaa potilaille, jotka ovat saaneet vaikean lääkereaktion tai joilla on muita vasta-aiheita kuten raskaus, vaikea sydänsairaus.

LST on hyvä diagnostiikan apuväline, jos potilaan ihoreaktio on ollut vaikea ja tämän vuoksi altistusta ei ole voitu toteuttaa. Se voi auttaa osoittamaan oikean lääkeaineen, jos epäiltyjä lääkkeitä on useita ja LST:lla on siten painoarvoa lääkeallergian diagnostiikassa. Negatiivisella testituloksella ei kuitenkaan voida poissulkea allergiaa (Pichler ja Tilch 2004). Kaiken kaikkiaan lääkeallergian diagnoosin tulee perustua sekä tarkkoihin esitietoihin että suoritettuihin allergiatutkimuksiin.

1 Teoreettinen tausta

1.1 Yliherkkyys

Yliherkkyys tarkoittaa joko ei-immunologista reaktiota, joka voi olla esim. toleranssin puutos ruoka-ainetta kohtaan (esim. laktoosi-intoleranssi), tai allergista immunologista reaktiota. Allergia on yksi yliherkkyyden ilmenemismuoto. Allergian ja yliherkkyyden raja voi olla kuitenkin epäselvä. Esimerkiksi monet ruoka-aineet voivat aiheuttaa toistuvasti usein lieviä yliherkkysoireita ilman, että taustalla on allergiaa. Kyseessä on allergia, jos spesifinen, immunologisten mekanismien käynnistämä reaktio allergeenia kohtaan voidaan osoittaa. Esimerkiksi laktoosi-intoleranssissa ja maitoallergiassa ilmenee samantyyppisiä oireita maitotuotteiden käytön yhteydessä. Laktoosi-intoleranssin taustalla ei ole immunologista mekanismeista vaan se johtuu maidon laktoosia hajottavan entsyymin puutteesta ja luokitellaan siten yliherkkyudeksi. Maitoallergia on allerginen reaktio, koska sen aiheuttaa immuunipuolustuksen reaktio maidon allergeeneille. Samoin keliakia (gluteiiniyliherkkyys) ja vilja-allergia eivät ole sama sairaus (THL, 2014).

1.2 Immunologisen kudsvaurion mekanismit

Immunologisen kudsvaurion mekanismit jaotellaan Philip Coombsin ja Robin Gellin v. 1963 laatiman luokittelun mukaan neljään ryhmään, jotka ovat anafylaktinen (tyyppi 1), sytolyttinen (tyyppi 2), immunokompleksivälitteinen (tyyppi 3) ja soluvälitteinen (tyyppi 4) reaktiotyyppi. Nykyisin tiedetään fysiopatologisten mekanismien olevan käytännössä monimutkaisempia ja reaktiotyyppien välillä esiintyvän päällekkäisyyttä, mutta luokittelu on edelleen käyttökelpoinen. (Centner ja de Weck 1995)

1.2.1 Anafylaktinen eli tyypin 1 allerginen reaktio

Vasta-aine (antibody) kiinnittyy kohdesolun pintaan ja veressä kiertävä antigeeni tunnistaa sen rakenteen. Kohdesoluina toimivat kudoksien syöttösolut tai veren basofiiliset valkosolut. Solun pinnalle muodostuu vasta-aine-antigeeni-kompleksi, joka saa aikaan välittäjäaineiden vapautumisen solusta. Vapautuneet välittäjäaineet (mm. histamiini, prostaglandiinit, leukotrieenit) saavat aikaan ja käynnistävät allergisen reaktion. Reaktio on nopea ja se ilmaantuu nopeasti vasta-aineen ja antigeenin reagoidessa. Täten tyypin 1 allergista reaktiota kutsutaan myös nimellä välitön allergia. Vasta-aineet ovat pääasiassa IgE:ta. Muun muassa atopian, astman, urtikarian ja angioödeeman taustalla on tämän tyyppisiä yliherkkyysmekanismeja. Syöttösoluista voi vapautua välittäjä-aineita myös ilman IgE-välitteistä mekanismeista. Puhutaan ns. pseudoallergisista reaktioista eli ei-

immuunivälitteisistä yliherkkyyksireaktioista ja ne määritellään negatiivisiksi, mutta oireet ovat samanlaiset kuin allergisissa reaktioissa. (Centner ja de Weck 1995, Savolainen ym. 1999)

1.2.2 Sytolyyttinen eli tyypin 2 allerginen reaktio

Veressä kiertävä vasta-aine (IgG, IgM) kiinnittyy antigeeniin, joka on osa kohdesolun pintarakennetta. Kohdesoluna voi olla bakteerisolua tai elimistön omat verisolut. Syntyvä antigeeni-vasta-aine-kompleksi ei itsessään vaurioita solua, mutta saa aikaan komplementin aktivoitumisen, joka voimistaa reaktiota ja voi johtaa sytolyyysiin ja solun tuhoutumiseen. Solun tuhoamiseen voivat osallistua komplementin lisäksi myös makrofagit ja neutrofiilit, sytotoksiset luonnolliset tappajasolut ja tappaja-T-solut ja pernan ja maksan retikuloendoteliaaliset solut. Komplementin aktivaatiossa syntyy anafylotoksiineja (C3a ja C5a), jotka vapauttavat histamiinia basofiileistä ja syöttösoluista ja voivat aiheuttaa välittömän yliherkkyyksireaktion oireita. Sytolyyttinen reaktio on keskeinen osa elimistön normaalia vasta-ainevälitteistä immuunipuolustusta. Muun muassa autoimmuuni-hemolyyttisen anemian, trombosytopenian ja Goodpasturen syndrooman taustalla ovat sytolyyttiset yliherkkyyksireaktiot. (Centner ja de Weck 1995, Savolainen ym. 1999)

1.2.3 Immunokompleksivälitteinen eli tyypin 3 reaktio

Tässä reaktiotyypissä antigeeni-vasta-aine-reaktio tuottaa immuunikomplekseja. Vasta-aineet ovat luokkaa IgG tai IgM. Suuret ja pienet immunokompleksit usein poistetaan verenkierrosta fagosytoosin kautta. Keskisuuret kompleksit saostuvat päätevaltimoihin (munuaiset, iho, suonipunos). Ne aktivoivat komplementin, jonka seurauksena C5a houkuttelee paikalle neutrofiilisiä granulosityyttejä, jotka fagosytoivat immunokomplekseja. Samalla vapautuu kudostuhoa aiheuttavia lysosomaalisia entsyymejä ja sytokiineja. Endoteelisolut aktivoituvat erittämään sytokiineja, jotka taas houkuttelevat granulosityyttejä. Syntyy akuutti tulehdusreaktio ja kudosaivaurio. Immunokompleksit stimuloivat myös verihituleita, jolloin muodostuu mikrotrombeja. Kun reaktio on paikallinen, se tunnetaan nimellä Arthusin ilmiö: siihen liittyy trombooseja ja hemorragiaa. Seerumitauti on kyseessä silloin, kun reaktio on systeeminen. Immunokompleksivälitteisiä reaktioita voi olla myös esim. glomerulonefriitin, kyhmyruusun, vaskuliitin ja eksanteeman taustalla. (Centner ja de Weck 1995, Savolainen ym. 1999)

1.2.4 Soluvälitteinen eli tyypin 4 allerginen reaktio

Mekanismi tunnetaan myös nimellä viivästynyt yliherkkyyks, sillä reaktio kehittyy hitaasti, yleensä noin 24-72 tunnin aikana. Aiheuttajia eivät ole veressä kiertävät vasta-aineet. Tulehdusreaktio käynnistyy, kun antigeeni ja spesifinen T-solu kohtaavat, jonka seurauksena T-solut vapauttavat

liukoisia välittäjä-aineita. Paikalle houkutellaan makrofaageja ja lymfosyyttejä, jotka antigeenin kohdatessaan käynnistävät fagocytoosin. Tämä ja sytokiinien erityys johtavat tulehdusreaktion syntyyn. Reaktio ja paikallinen sytokiinieritys jatkuvat, jos antigeenin tuhoaminen pitkittyy ja kroonistuu ekseemaksi. Lisäksi aktivoituneet makrofaagit voivat muuttua epiteloidisoluiksi ja voi syntyä krooninen granulomatoottinen tulehdus. Elimistön normaaliin soluvälitteiseen immuunipuolustukseen kuuluu viruksien, bakteerien, sienien ja muiden vieraiden solujen, kuten syöpäsolujen ja kudossiirännäisten, tuhoaminen, josta vastaavat aktivoituneet tappaja-T-solut ja luonnolliset tappajasolut. Auttaja-T-solujen aktivoimat makrofagit taas tuhoavat solun sisällä bakteereja, mutta ovat osallisena myös muissa viivästyneissä tulehdusreaktioissa, kuten kosketusekseemassa ja tuberkuliinireaktiossa (Mantoux-koe). (Centner ja de Weck 1995, Savolainen ym. 1999)

1.2 Lääkeihottumat

1.2.1 Mekanismit

Lääkkeen aiheuttaman ihoreaktion taustalla on useita tekijöitä, kuten metabolia, yliannostus, lääkkeen kertyminen elimistöön, allergiset reaktiot. Potilailla on eroja lääkeaineiden metaboliassa, jonka perusta on geenitasolla (esim. CYP2D6-fenotyypin hitaat ja ultranopeat metaboloijat). Ihottuman voi aiheuttaa myös lääkeaineiden keskinäiset interaktiot, jotka korostuvat, kun lääkkeitä on käytössä useita. Lääkeihottumat voivat syntyä joko ei-allergiselta tai allergiselta pohjalta. Jotkut lääkkeet vaikuttavat suoraan synnynnäiseen immuunipuolustukseen ja/tai effektorisoluihin ilman spesifisen immuunipuolustuksen kehittymistä. Puhutaan pseudoallergisesta ei-immuunivälitteisestä yliherkkyysoireyksiä. Tällaiset reaktiot määritellään negatiivisiksi, mutta oireet ovat samanlaiset kuin spesifisen immuunipuolustuksen kehittyessä syntyvissä reaktioissa. Ei-allergisten reaktioiden taustalla voi olla esimerkiksi yliannostus, lääkkeen kertyminen elimistöön tai ei-toivotut farmakologiset vaikutukset (mm. pitkäaikaisen systeemisen tai vahvan paikallisen kortikosteroidin aiheuttamat striat iholla). Joskus lääkkeen vaikutusmekanismin pohjalta osataan jo ennalta varautua lääkkeen haittavaikutuksiin, esim. metotreksaattihoidon aikana ilmaantuvat suun haavaumat voivat johtua metotreksaatin sytotoksisesta vaikutuksesta (Weller ym. 2008).

Allergiset reaktiot ovat harvoin ennalta-arvattavia. Reaktioita esiintyy vain harvoilla lääkettä saavilla potilailla ja lääkkeen pieni annos ei ole este allergisen reaktion syntymiselle. Allergiset reaktiot eivät kuulu lääkkeen normaaliin biologiseen vaikutusmekanismiin ja ne yleensä ilmaantuvat immuunivasteen kehittymiseen vaadittavan latentin ajan jälkeen. Kemiallisesti toisiaan muistuttavat lääkkeet voivat ristireagoida ja aiheuttaa allergiaa samalle potilaalle.

Lääkeaineallergiat ovat melko yleisiä, mutta yksittäiselle lääkeaineelle harvinaisia (Weller ym. 2008). Kuitenkin on korostettava, että erilaisten bakteeri- ja virusinfektioiden ja lääkeallergioiden aiheuttamat ihottumareaktiot ovat samankaltaisia ja täten infektioireaktiot ovat usein virheellisesti tulkittu lääkeainereaktioiksi. Esimerkiksi perustellusti epäillyistä penisilliinireaktioista 90% olikin infektiin liittyviä reaktioita (Solensky 2003).

Suurin osa reaktioista syntyy soluvälitteisen immuunireaktion pohjalta. Kliinisesti lääkeihottuma voi muistuttaa tavanomaisten ihottumien sekatyyppejä ja saada monenlaisia eri ilmenemismuotoja. Yleisimmin nähdään makulopapulaarista ihottumaa ja eksanteemaa. Harvinaisempien ja vaikeampien reaktioiden seurauksena voidaan nähdä muun muassa rakkuloiden muodostusta, erythrodermiaa, toksinen epidermaalinen nekrolyysi (TEN), akuutti yleistynyt eksantematoottinen pustuloosi (AGEP), DRESS (drug reaction/rash with eosinophilia and systemic symptoms). Auttaja-T4⁺ -solut esiintyvät usein eksanteemassa, kun taas sytotoksiset-T8⁺ -solut dominoivat rakkulataudeissa (TEN, Stevens-Johsonin oireyhtymä) ja *erythema fixumissa*. Urtikarian ja angioödeeman taustalla on usein IgE-välitteinen tyypin 1 yliherkkyysoireyhtymä ja vaskuliittien taustalla on tyypin 3 immuunikompleksi-välitteinen reaktio. Lääkkeen aiheuttama urtikaria on yleensä välitöntä (yleensä pseudoallergiaa, joskus IgE-välitteistä), mutta myös immuunikompleksien aiheuttamissa vaskuliitti- ja seerumitaudin kaltaisissa reaktioissa voi esiintyä iholla urtikariaa (Weller ym. 2008).

1.2.2 Lääkeihottumien taudinkuvat

Seuraavaksi esitellään muutama tavallisimpiin lääkeaineihottumiin kuuluva taudinkuva.

1.2.2.1 Eksanteema

Tavallisin lääkeihottuman tyyppi on eksanteema. Myös mikrobi-infektiot, erityisesti virusinfektiot, voivat laukaista eksanteeman. Sen taustalla voi olla myös viruksen ja antibiootin yhteisvaikutus: esimerkiksi mononukleosisin yhteydessä käytetty aminopenisilliini voi laukaista eksanteeman. Eksanteemassa esiintyy turvonneita, punoittavia läiskiä, jotka voivat yhdessä muodostaa suurempia yhtenäisiä ihottuma-alueita. Kliininen kuva voi muistuttaa myös tuhkarokkoa. Eksanteema alkaa noin kahden viikon kuluttua lääkkeen aloituksesta, seuraavan kerran immunologinen muisti on kehittynyt ja reaktio alkaa muutamassa tunnissa altistuksesta. Eksanteema katoaa hitaasti ja voi kestää 2–3 viikkoa. Tavallisimpia aiheuttajia ovat mikrobilääkkeet, varsinkin beetalaktaamit ja epilepsialääkkeet (Alanko 2011, Harvima 2014). Eksanteema voi myös edetä ekseemaksi.

1.2.2.2 Urtikaria ja angioödeema

Urtikaria eli nokkosihottuma on tavallisimmin akuutin infektion aiheuttama, mutta syynä voi olla myös lääkkeen aiheuttama reaktio. Urtikariassa esiintyy ihosta lievästi koholla olevia, ympäröivää ihoa vaaleampia tai punoittavampia, kutisevia paukama, joiden ympäritys voi punoittaa. Niiden ilmaantuminen ja häviäminen on nopeaa. Tyypillistä on, että yksittäinen paukama on samassa paikassa korkeintaan vuorokauden ja ei parantuessaan jätä jälkeä. Angioödeemaa voi esiintyä yhdessä urtikarian kanssa tai erillisenä ja se ilmenee usein turvotuksena iholla, erityisesti huulten tai silmien ympärillä, ja limakalvoilla. Anafylaktinen reaktio on kyseessä, jos lisäksi ilmenee yleisoireita (verenpaineen lasku, hengitysvaikeus, pahoinvointi) ja kurkunpään turvotusta. Yliherkkyysreaktio alkaa muutamien minuuttien – tunnin sisällä lääkkeen oton jälkeen. Angioödeema voi ilmentyä heti ensimmäisen annoksen jälkeen, joissakin tapauksissa kuukausien tai vuosien kuluttua säännöllisen lääkityksen aloituksen jälkeen. Tavallisimpia aiheuttajia ovat penisilliinit (allergisia ja pseudoallergisia reaktioita) ja asetyylisalisyylihappo (pseudoallergisia). Omalizumabin, joka on vaikeaan astmaan käytettävä anti-IgE-valmiste, on kuvattu aiheuttaneen urtikariaa ja angioödeemaa. Angioödeeman aiheuttajiksi on lisäksi kuvattu muun muassa ACE-estäjät ja ATR-salpaajat (Alanko 2011).

1.2.2.3 *Erythema fixum*

Erythema fixum (toistopunoittuma) taudinkuvaan kuuluu iholle tai limakalvolle ilmaantuva ärhäkkään punainen, tarkkarajainen läiskä, joita voi olla yksi tai useampia, joskus esiintyy myös rakkuloita. Tyypillistä on, että reaktion toistuessa läiskä ilmestyy aina samaan kohtaan. Lääkkeen käytön jatkuessa tai toistuessa ihottumaa tulee lisää myös uusiin kohtiin ja on usein entistä voimakkaampaa. Voimakas, rakkulainen reaktio voi muistuttaa Stevens-Johnsonin oireyhtymää. Reaktio alkaa usein ½–6 tuntia lääkkeen käytön aloituksen jälkeen. Hävitessään ihottuma jättää ihoon pigmentaation, joka voi kestää kuukausia ja siten diagnoosi voidaan tehdä myös jälkikäteen. *Erythema fixum* aiheuttaja on aina lääkeaine. Tavallisimpia aiheuttajia ovat muun muassa karbamatsipiini, doksisykliini, sulfonamidit, metronidatsoli, barbituraatit (Alanko 2011, Harvima 2014).

1.2.2.4 Stevens-Johnsonin oireyhtymä ja toksinen epidermaalinen nekrolyysi

Vaikeimpiin lääkeihottumiin kuuluu Stevens-Johnsonin oireyhtymä (SJS) ja toksinen epidermaalinen nekrolyysi (TEN, Lyellin oireyhtymä), joiden katsotaan olevan saman reaktion eri vaikeusasteita. Saman oireyhtymään kuuluvaksi voidaan luokitella myös *erythema multiforme*,

jonka vaikeammassa *major*-muodossa esiintyy rupeutuvia läiskiä ja rakkuloita. SJS:ssa esiintyy purppuramaisia läiskiä, maalitaululeesioita, rakkuloita ja eroosiota iholla ja suun, silmien ja genitaalien limakalvoilla. Tauti voi edelleen kehittyä toksiseksi epidermaaliseksi nekrolyysiksi, jossa iho kuoriutuu suurina alueina palovammojen tapaan, jolloin kuolleisuus on noin 10–30 %. Vaikeita tapauksia ilmoitetaan Suomessa muutama vuodessa. Aiheuttajiksi on kuvattu mm. sulfonamidit, epilepsialääkkeet ja allopurinoli (Alanko 2011, Harvima 2014).

1.3 Allergiatestit *in vivo*

1.3.1 Prick-testi

Prick-testillä eli ihopistokokeella (engl. skin Prick test) tutkitaan IgE-välitteistä allergiaa. Sillä voidaan selvittää onko potilaalla taipumus välittömiin yliherkkyysoireisiin (atopia) ja millä allergeeneilla on mahdollisesti yhteys oireisiin. Tietyissä tapauksissa testillä voidaan myös tutkia yliherkkyyttä kosketusallergeeneja kohtaan, kuten lateksikumiallergia.

Yleensä Prick-testi tehdään perussarjalla, josta keskeisinä tutkitaan siitepölyt (koivu, leppä, pujo), eläimet (kissa, koira) ja huonepölypunkki. Positiivisen testituloksen eli herkistymisen on oltava yhteydessä potilaan kliinisiin oireisiin, jolloin allergia vasta varmistuu. Perussarjan lisäksi voidaan tutkia potilaan oireista riippuen erilaisia kohdennettuja sarjoja kuten ruoka-ainesarja, tuorevihannes- ja maustesarja, jauhosarja. Lääkeaineallergiaa, esim. penisilliiniallergiaa, voidaan myös tutkia Prick-testillä, jolloin Prick- ja intrakutaanitesti ovat yhdistetty. Pistotestiä pidetään yksinkertaisena, turvallisena ja nopeana. Useita allergeeneja voidaan testata yhdellä kertaa. Koska käytössä on tärkeimmistä allergeeneista biologisesti ja immunokemiallisesti vakikoidut uutteen ja vakioitu testausväline (teräslansetti, jossa on 1 mm:n kärki), ovat tulokset luotettavia.

Testialue on kyynärvarren sisäsivu tai selkä (lapset). Prick-testissä ihoon pistetään lansetilla nestemäinen standardoitu allergeeniute tai esim. hedelmiä testatessa lansetti pistetään ensin halkaistuun hedelmänpalaan. Allergeenin aiheuttama Prick-testireaktio luetaan 15 minuutin kuluttua ja positiiviseksi reaktioksi luetaan läpimitaltaan 3 mm ja sitä suuremmat paukamet. Ihoreaktiiviteetin kontrollina käytetään 10 mg/ml histamiiniliuosta ja negatiivisena kontrollina allergeeniutteen perusliuosta. Positiivinen reaktio tarkoittaa sitä, että potilaan ihon soluissa on allergeenille spesifisiä IgE-vasta-aineita. Tulosten tulkinta vaatii kokemusta. Antihistamiinien ja H1-reseptorisalpausten vaikuttavien lääkkeiden (esim. tietyt mielialalääkkeet) käyttö on keskeytettävä 3–7 päivää ennen testiä (Haahtela ym. 2011).

1.3.2 Intrakutaanitestit

Intrakutaanitestissä eli ihonsisäisessä testissä (engl. intracutaneous test) käytetään ainoastaan vesiliukoisia allergeenivalmisteita. Testissä käytetään negatiivista ja positiivista vertailuliuosta, joista positiivisena toimii 0,1 mg/ml vahvuinen histamiinihydrokloridiliuos ja negatiivisena allergeenivalmisteen perusliuos. Testi on mahdollista toteuttaa myös titraussarjana. Siinä määritetään allergeenipitoisuus, joka aiheuttaa yhtä voimakkaan reaktion kuin positiivinen vertailuliuos. Jos epäillään voimakasta allergiaa, aloitetaan testi liuoksella, joka on jopa tuhat kertaa perusallergeeniliuosta laimeampaa. Testialue on sama kuin Prick-testissä. Ihon sisään ruiskutetaan allergeeniliuosta noin 0,02–0,05 ml, kunnes ilmenee noin 3 mm:n kokoinen paukama. Alle 5 mm:n (20 mm²) paukamit luetaan negatiivisiksi. Yleensä intrakutaanitestiä hyödynnetään silloin, kun Prick-testin tulos jää negatiiviseksi, mutta tulos halutaan varmistaa esim. penisilliini- ja puudutusainetestauksissa. Intrakutaanitestit on testimenetelmänä herkkä ja sen avulla voidaan testata myös heikkoja allergeeniuutteita. Lisäksi testiä käytetään Mantoux- eli tuberkuliinikokeessa ja kosketusallergian testaamiseen (Haahtela ym. 2011).

1.3.3 Epikutaanikokeet

Epikutaanikokeilla (engl. epicutaneous test, patch test) tutkitaan viivästynyttä kosketusallergiaa kuten allergista ekseemaa. Yleensä epikutaanitesti tehdään, kun käsiekseemapotilaalla epäillään kosketusallergiaa esim. kumikemikaaleille, kromaatile, formaldehydille, luonnonhartsille tai epoksihartsille. Etenkin käsi-, kasvo- ja sääri-ihottumiin voi liittyä kosketusallergioita.

Vaseliiniin tai muuhun voidepohjaan sekoitetut laimennetut allergeenit laitetaan muoviseen tai alumiiniseen testikupuun (Finn Chamber). Nestemäisiä allergeeneja varten kuvun pohjalle laitetaan imupaperiekikko. Testikupuun laitetaan 15–18 mikrolitraa allergeenia. Teippiin kiinnitetyt kuvat liimataan tavallisesti yläselkään. Testisarjoina myös alaselkä ja olkavarsi soveltuvat testialueiksi. Potilaan käyttämät lääkkeet eivät yleensä vaikuta epikutaanitestien tulokseen, mutta kortikosteroidit ovat tästä poikkeus (esim. prednisoloni yli 10 mg:n päiväannoksella). Testiteipit poistetaan yleensä 48 tunnin kuluttua. Testitulokset luetaan ensimmäisen kerran samalla, kun testikuvat poistetaan. Teippien poistosta pitäisi kulua ainakin 20–30 min ennen tulosten ensimmäistä lukua. Toinen testiluku tehdään 2–4 vuorokauden kuluttua. Testeissä on nähtävissä ärsytysreaktioita ja allergisia reaktioita. Allergiatesteihin perehtynyt ihotautilääkäri pystyy yleensä erottamaan ne toisistaan, mutta aina se ei ole mahdollista. Joissain tapauksissa voidaan harkinnan mukaan tehdä titraussarja epäillylle testiaineelle (Haahtela ym. 2011).

Joskus epikutaanitestistä voidaan tehdä *erythema fixum* -ihottumakohtaan epäillyllä lääkeaineella, jolloin testi voi antaa positiivisen tuloksen vain tälle alueelle eikä terveelle iholle. Epikutaanitestejä on lukuisia sarjoja, joista tavallisesti käytetään perussarjaa ja ihonhoitosarjaa. Työ- tai muita epikutaanisarjoja voidaan valita potilaalta saatujen esitietojen perusteella, esim. ammatti-ihotautiepäilyissä, kun allergista käsiekseemaa pidetään työperäisenä. Nikkeli ja koboltti aiheuttavat herkästi viivästynyttä kosketusallergiaa. Pesunesteistä, shampoista ja kosmeettisista ihonhoitotuotteista voi tulla allergista ekseemaa (formaldehydi ja sen vapauttajat, isotiatsolinoni). Viime vuosina epikutaanitesteissä on todettu lisääntyvästi isotiatsolinoni-allergiaa. Tätä kemikaalia käytetään säilöntäaineena ihonhoito- ja kosmetiikkatuotteissa. Epikutaanitesteillä voidaan myös selvittää kosketusallergiaa paikallishoitoon käytetyille lääkeaineille. Tällaisia lääkeaineita ovat mm. neomysiini, basitrasini, hydrokortisoni.

Epikutaanitesteissä allergisen reaktion esilletulo on vaihteleva ja yleensä reaktio ilmenee 1–7 päivän sisällä, jolloin altistuksen yhdistäminen oireisiin voi olla potilaalle vaikeaa. Esim. neomysiini ja basitrasini voivat aiheuttaa allergisen ihoreaktion erittäin viivästyneesti, jopa 5–7 päivän kohdalla. Hydrokortisoni ja muut kortikosteroidit ovat haasteellisia tutkia, koska ne sammuttavat omaa allergiareaktiotaan ja iholla nähtävä reaktio on nettotulos.

1.3.4 Altistus osastolla

Lääkeainealtistus (engl. drug provocation test) on ainoa diagnostinen menetelmä, jolla voidaan varmistaa epäily lääkeyliherkkyydestä. Se tehdään aikaisintaan 1–2 kuukauden kuluttua ihottuman parantumisesta. Tarkoituksena on saada esille mahdollinen lääkereaktio. Altistus toteutetaan sairaalassa valvotuissa olosuhteissa, yleensä ihotautien osastolla. Anafylaktinen reaktio on harvinainen lääkealtistuksen komplikaatio, mutta sen hoitamiseen on oltava aina valmius (Alanko 2011).

Altistuksessa annetaan potilaalle epäiltyä lääkettä suun kautta nousevina annoksina. Yleensä altistus aloitetaan lumelääkkeellä, mutta lume voidaan sijoittaa myös myöhempään kohtaan altistusohjelmassa. Altistuksen alussa epäiltyä lääkeainetta annetaan potilaalle pieni annos, tavallisesti 10 % normaalista kerta-annoksesta. Jos alkuannos ei aiheuta välitöntä reaktiota 2–3 tunnin seuranta-aikana, usein annetaan seuraavaksi 25-prosenttinen ja sitten 100-prosenttinen annos. Esimerkiksi penisilliinin (V-Pen) kohdalla käytetään kaavaa: 100000 + 250000 + 1 milj. yksikköä/vrk. Altistus saadaan yleensä toteutettua 1–2 päivän aikana. Se aloitetaan aamulla ja tunnin välein seurataan iho-oireita, pulssia, verenpainetta ja kuumetta. Eksanteemoissa kokonaisseuranta-ajaksi suositellaan vuorokautta (Alanko 2011, Haahtela ja Hannuksela 2009).

Lääkeainealtistus on kallis ja vie muita diagnostisia testejä enemmän aikaa ja resursseja. Lisäksi se voi altistaa potilaan henkeä uhkaavalle reaktiolle. Toisaalta se on ainoa menetelmä, jolla voidaan poissulkea tai varmistaa lääkeallergia. Altistus kannattaa tehdä, jos epäilty lääke on potilaalle tärkeä tai jos epäily allergiasta kohdistuu useampaan lääkkeeseen, minkä vuoksi esimerkiksi antibioottien käyttöä on rajoitettu. Ehdottomia vasta-aiheita ovat anafylaktiset reaktiot ja henkeä uhkaavat ihoreaktiot, kuten toksinen epidermaalinen nekrolyysi, Stevens-Johnsonin syndrooma ja punahukkatyyppiset (SLE-tyyppiset) yleisreaktiot. Lisäksi vasta-aiheita ovat kaikki ihoreaktiot, joihin liittyy verenkuvamuutoksia tai elinten toimintahäiriöitä, vaikeat perussairaudet, raskaus ja beetasalpaajalääkitys (Alanko 2011, Haahtela ja Hannuksela 2009).

1.4 Allergiatestit *in vitro*

1.4.1 Lymfosyyttistimulaatio

Lymfosyyttistimulaatiotesti (engl. lymphocyte stimulation test) eli LST on soluviljelyyn perustuva allergiatutkimusmenetelmä. Tutkimusta voidaan käyttää allergian osoittamiseksi joillekin ruoka-aineille, lääkeaineille ja kosketusantigeneille. Lymfosyyttistimulaatiotestin e laboratoriotekniikan kuvasivat ensimmäisinä Holland ja Mauer v. 1964 ja Caron ja Sarkany v. 1965. Testi mittaa T-muistisolujen vastetta lääkeaineelle. Se perustuu havaintoon, että spesifiset T-solut laajenevat ja jakautuvat kohdatessaan antigeenin. Käytännössä mitataan ³H-tymidiinin eli tritoidun tymidiinin sisäänottoa (inkorporaatio) jakautuvissa soluissa. Tritium on vedyn radioaktiivinen isotooppi ja tymidiini on pyrimidiininukleosidi, joka on yksi DNA:n rakennuspalikoista. Tritioitu tymidiini on radioaktiivisesti leimattu nukleosidi ja sen avulla voidaan mitata solujen jakaantumista. Tritioitu tymidiini pääsee solun sisään ja sitoutuu solun DNA:han. Solun jakautuessa sen DNA kahdentuu, jolloin tritioitu tymidiini tulee osaksi solun kromosomaalista DNA:ta. Nestetuikelaskimella, joka mittaa β -säteilyä, voidaan määrittää solujen DNA:n radioaktiivisuus (Kalekivi 2012).

Lymfosyyttistimulaatiotesti ei ole tullut rutiinikäyttöön lääkeaineallergian diagnostiikassa. Sen käyttökelpoisuutta on kyseenalaistettu ja monet laboratoriot eivät ole saavuttaneet riittävää sensitiviteettiä (Pichler ja Tilch 2004). LST:lla on tiettyjä etuja. Se on nopea ja helppo toteuttaa, jos tekniikka on käytössä rutiinisti ja sen suorittamisesta on kokemusta. Se voidaan suorittaa monille eri lääkeaineille käyttämällä samoja testireagensseja. *In vitro* -testinä se on turvallinen potilaalle. Testi voidaan suorittaa lääkeaineille, jotka saavat aikaan keskenään erilaisia immuunireaktioita, sillä lääkeaineelle spesifiset T-solut ovat lähes aina mukana lääkeyliherkkyyksireaktioissa. Suurin haitta on se, että T-solujen vaste lääkeaineelle ei välttämättä korreloi kliinisiin oireisiin. Tekniikka on haastava ja luotettavia tuloksia voidaan saada vain, kun laboratoriohenkilökunnalla on riittävästi

kokemusta testin suorittamisesta ja tulosten tulkinnasta. Lisäksi, testin sensitiivisyys on osoittautunut rajalliseksi, lähinnä puuttuvan systemaattisen tutkimuksen vuoksi. Tämän vuoksi negatiivinen testituloks ei sulje pois lääkeyliherkkyyttä, mutta positiivinen testitulos voi auttaa osoittamaan joukosta epäiltyjä lääkeaineita sen, jolle potilas on yliherkkä (Pichler ja Tilch 2004).

Testin tärkeä osa on kontrolli- eli referenssiljely ilman lääkettä, sillä lääkkeellä stimuloitu jakaantuminen on suhteutettava taustajakaantumiseen (background proliferation). Tulokset annetaan stimulaatioindekseinä (SI): jakaantuminen mitataan ³H-tymidiinin sisäänottoindeksi-arvona, määrä jaettuna pitoisuudella per minuutti, cpm (counts per minute). SI lasketaan jakamalla lääkkeellä stimuloitu jakaantuminen (cpm) spontaanilla (ilman lääkettä tapahtuneella) jakaantumisella (cpm). Spontaani jakaantuminen (ja cpm:n arvot) vaihtelee runsaasti eri henkilöiden välillä, mikä tekee SI-arvot helpommin keskenään vertailtaviksi kuin cpm-arvot.

Testi tulkitaan positiiviseksi, jos tietty SI-arvo on saavutettu. Tässä tutkimuksessa SI-arvo 2–3 kirjattiin positiiviseksi. Pichler ja Tilch (2004) luokittelevat SI-arvon >2 positiiviseksi testitulokseksi. He tulkitsevat SI-arvot välillä 2–3 heikoiksi positiivisiksi ja beetalaktaamien kohdalla SI-arvon >3 positiiviseksi. Tämä rajanveto perustuu arvoihin, jotka on todettu altistetuilla, mutta ei-allergisilla yksilöillä. Loppujen lopuksi, ei ole yksinkertaista määrittää SI-arvoa, joka tulkittaisiin merkitykselliseksi sensitiivisyyden kannalta. Taustalla on mm. immuunireaktion tyypistä ja T-solureseptorin affiniteetista lääkeaineen antigeenille riippuvia tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa reaktion ja siten SI-arvon voimakkuuteen (Pichler ja Tilch 2004).

Testin ajankohdalla voi olla myös merkitystä LST:n tuloksiin. Pichler ja Tilch (2004) suorittavat testin rutiinisti 4–8 viikon kuluttua reaktiosta. He suosittelevat, että testi tehtäisiin viimeistään 2–3 vuoden kuluttua alkuperäisestä lääkealtistuksesta. Immunosuppressiivisten lääkkeiden käyttö testin tekohetkellä voi vähentää lymfosyyttien jakaantumista *in vitro*. Kortikosteroidien on usein havaittu häiritsevän testituloksia kun taas esim. metotreksaatti ja atsatiopriini vaikuttavat vähemmän jakaantumiseen. Lisäksi anti-inflammatoristen tulehduskipulääkkeiden on havaittu lisäävän proliferaatiota ja tämän on tulkittu johtuvan niiden PGE₂-synteesiä vähentävästä mekanismista (Walker ym. 1983). Tätä farmakologista mekanismia ei ole kuitenkaan nähty kaikilla tutkimuspotilailla. Pichler ja Tilch (2004) suorittavat testin vain, jos potilaalla on käytössä <0,2 mg/kg prednisoloni-equivalenttia/vrk.

1.4.2 Spesifisen IgE:n määrittäminen seerumista

Spesifinen IgE -tutkimus (S-AllIgE, synonyymi RAST, CAPRAST, ImmunoCAP®; engl. specific IgE test) määrittää kvantitatiivisesti allergeeni-spesifiset IgE-vasta-aineet tutkittavasta seeruminäytteestä. Tutkimus soveltuu allergeeniselvittelyihin, kun epäily allergiasta on vahva yhdelle tai useammalle allergeenille. Valikoimaan kuuluu yli 650 yksittäistä IgE-tutkimusta ja 90 allergeenikomponentti-IgE-tutkimusta. Määrittäminen on herkkä ja tarkka. Useiden laajojen tutkimusten mukaan on testin sensitiivisyydeksi arvioitu 84–95 % ja spesifisyydeksi 85–94 %. Allergiaselvittelyissä tulee tarkastella spesifisiä IgE-vasta-ainetasoja aina yhdessä kliinisten oireiden ja anamneesin kanssa.

Tulokset ovat kvantitatiivisia ja ne ilmoitetaan välillä 0,1–100 kU/l. Yksittäisen IgE-tutkimuksen viitearvona käytetään arvoa <0,35 kU/l, mutta teknisesti on mahdollista määrittää pitoisuuksia myös välillä 0,1–0,35 kU/l. Spesifinen IgE >0,35 kU/L tulos kertoo, että henkilöllä voi esiintyä IgE-välitteisen allergian oireita. Matala IgE-pitoisuus (0,35–0,69 kU/L) merkitsee yleensä sitä, että oireita aiheuttavan allergian todennäköisyys on pieni, kun taas hyvin korkea IgE-pitoisuus (>17,5 kU/L) korreloi hyvin kliinisen oirekuvan kanssa. IgE-pitoisuus on korkein 4–6 viikon kuluttua allergeenialtistuksesta. Tulos korreloi usein, mutta ei aina, kokonais-IgE-pitoisuuden kanssa. IgE-vasta-aineiden ristireagointi on yleistä mm. siitepölyallergeenien ja ruoka-aineiden välillä (synlab Finland Oy). On kuitenkin korostettava, että negatiiviseksi ilmoitetun IgE:n viitearvoksi valittu 0,35 kU/l on keinotekoinen jakoperuste. Allergeeni-spesifisten raja-arvojen luominen toisi varmuutta diagnostiikkaan.

Spesifisen IgE:n määrittäminen on hyödyllinen työkalu allergiadiagnostiikassa. Tutkimuksella on hyvä yhteneväisyys eri maiden, laboratorioden ja potilaiden välillä. IgE-vasta-aineiden kehittyminen ja herkistyminen voidaan havaita varhaisessa vaiheessa, jopa ennen kliinisten oireiden esiintymistä. Tutkimus auttaa ymmärtämään allergian kehittymistä ja ristireagoivia allergeeneja. (synlab Finland Oy, Thermo Fisher Scientific Inc 2012).

1.4.2.1 Allergeenikomponentti-tutkimukset

Komponenttidiagnostiikka on uusi tutkimusala, joka on tuonut tarkkuutta allergiaselvittelyihin. Allergeenikomponentti-tutkimuksella (synonyymi seerumin IgE-allergeenikomponenttien määrittäminen, engl. allergen component test) pystytään osoittamaan tarkasti se yksittäinen allergeeniproteiini, jolle potilas on herkistynyt. Allergeenilähde koostuu yksittäisistä allergeeniproteiineista eli komponenteista. Komponentit kuuluvat erilaisiin proteiiniiryhmiin, joiden ominaisuudet vaihtelevat.

Esimerkiksi PR 10-proteiinit (Bet v 1 koivuhomologit) ja profiiliinit ovat labiileja proteiineja, jotka eivät ole merkittäviä allergisten reaktioiden aiheuttajia. Yleensä niiden aiheuttamat oireet ovat lieviä ja rajoittuvat suoraan limakalvokontaktiin. Sen sijaan stabiilit komponentit, kuten siementen, pähkinöiden ja palkokasvien varastoproteiinit, kananmunan ovomukoidi ja maidon kaseiini, voivat aiheuttaa vakavia allergiareaktioita. Anafylaksian riski on moninkertainen, jos henkilö on herkistynyt stabiilille komponentille. Komponenttitutkimukset mahdollistavat vakavan reaktion riskin arvion ja ristiallergioiden erottamisen oireisista allergioista paremmin kuin mihin perinteisillä allergiatesteillä voi päästä. Tutkimuksilla voidaan päästä tarkkaan diagnoosiin ja siten potilasta voidaan paremmin ohjeistaa mm. välttämisdieetin ja vakavien reaktioiden varalle. Ne sopivat myös perusterveydenhuollon käyttöön (Kukkonen ym. 2015, synlab Finland Oy).

1.4.2.2 Mikrosirututkimus

Mikrosiru (S-IgESiru, synonyymi ImmunoCAP ISAC; engl. microchip) perustuu samaan tekniikkaan kuin spesifisen IgE:n määrittäminen, mutta sen avulla voidaan kerralla tutkia suurta joukkoa komponentteja ja määrittää IgE yksittäistä komponenttia kohtaan. Mikrosiru tutkii seeruminäytteestä sitä, minkälaisille proteiiniperheille henkilö on herkistynyt. Näytteeksi riittää 30 µl seerumia. Mikrosiru sisältää 112 komponenttia yli 50 allergeenilähteestä. Tutkimus on yksittäisiä komponenttitutkimuksia kalliimpi (350 euroa v. 2015). Tuloksen tulkinta vaatii kokemusta ja kuuluu allergologian erikoislääkärille. Mikrosirututkimus soveltuu epäselvän anafylaksian selvittelyyn ja tapauksiin, joissa allergeeniksi epäilty komponentti on saatavilla vain sirussa, esim. seesaminsiemenen Ses i 1, kiivin Act d 1 (Kukkonen ym. 2015).

1.4.3 RAST-inhibitioanalyysi

RAST-inhibitioanalyysi (eng. RAST inhibition) perustuu radioimmunianalyysiin ja muistuttaa tekniikaltaan läheisesti RAST-testiä (nykyisin spesifisen IgE:n määrittäminen). Testi perustuu kilpailevaan reaktioon ja tutkittavana näytteenä toimii potilaan seeruminäyte, joka sisältää potilaan IgE:ta tietylle allergeenille. Näytteeseen lisätään leimattua vasta-ainetta ja sekä liukoista antigeeniä että tietty, standardoitu määrä kiinteään faasiin sidottua antigeeniä. Nämä antigeenit ovat keskenään identtisiä tai ristireagoivia. Leimattu vasta-aine sitoutuu inhiboidusti kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Mitä vaikutuskykyisempi liukoisessa muodossa oleva antigeeni on, sitä enemmän se sitoo leimattua vasta-ainetta ja sitä vähemmän vasta-ainetta sitoutuu kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Vasta-aineen sitoutumisen jakautuminen heijastaa siten antigeenin aktiivisuutta ja ristireagoivaa nestemäisen antigeenin ja kiinteään faasiin sidotun antigeenin välillä. RAST-

inhibitiota ei käytetä rutiinisti kliinisessä työssä, mutta siitä voi olla lisähyötyä allergeenien diagnostiikassa esim. monimutkaisissa ruoka-aineallergioissa (Brooks ja Bush 2007, Murali 1999).

1.5 Histamiini *in vitro* -liberaatio

1.5.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia eli HPLC

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) on tekniikka, jonka avulla analysoidaan epäorgaanisia ja orgaanisia yhdisteitä. Erityisen hyvin se soveltuu suurikokoisten orgaanisten molekyylien, kuten lääkeaineiden, hormonien, aminohappojen, proteiinien ja lipidien, tutkimiseen. Periaatteessa HPLC:n käyttöön vaaditaan vain, että tutkittava näyte on liukoinen johonkin liuottimeen. Käytännössä rajoituksia voivat olla myös esimerkiksi sopivan yleisdetektorin puute tai näytteen ja liuottimen välinen reaktio. Muiden kromatografisten menetelmien tavoin HPLC:lla on mahdollista analysoida usea aine samaan aikaan. HPLC:n etuja ovat suuri erotuskyky, herkkyys, nopeus, automaatio ja soveltuvuus lukuisille keskenään erilaisille yhdisteille. Välineistö on kestävä ja turvallinen. HPLC:ssa käytetään tehokasta kolonnia, jonka kiinteän faasin partikkelit ovat muutaman nanogramman luokkaa (Halonen 2004, Jaarinen ja Niiranen 2005).

HPLC-tekniikka on yleisimmin käytetty menetelmä histamiinipitoisuuden määrittämiseen biologisista nesteistä. Histamiinin määrittämiseksi HPLC:n avulla on olemassa monia tekniikoita, jotka eroavat keskenään käytetyn derivatisointimenetelmän, kolonnin ja detektorin mukaan. Derivatisointi voidaan suorittaa joko ennen pylvästä tai sen jälkeen (pre- ja postkolonniderivatisaatio). Prekolonnitekniikka on yksinkertainen ja soveltuu näytteen nopeaan analysointiin. Prekolonnitekniikassa derivaatin tuotto mittaushetkellä on riippuvainen mm. derivaatin vakaudesta kromatografisen erottelun aikana. Tärkein syy miksi postkolonniderivatisaatiota käytetään on histamiinin määrittämisessä käytetyn yleisesti derivaatin, o-phthalaldehyde (OPT), rajoitettu vakaus (Granerus 1991). Yamatodani ym. (1985) totesivat, että postkolonniderivatisaation sensitiivisyys on hyvä plasman histamiinin määrittämisessä. Fluoresenssidetektorit soveltuvat hyvin mm. lääkeaineiden, aminohappojen ja peptidien määrittämiseen. Fluoresenssitekniikka on yleisesti todettu spesifisimmäksi ja herkimmäksi menetelmäksi histamiinin analysointiin. Histamiinimäärittämisessä lineaarisuus erilaisilla HPLC-metodeilla on raportoitu erinomaiseksi (Granerus 1991).

Erityiset HPLC-tekniikalla on se, että se mahdollistaa yhtäaikaisen histamiinin ja histamiiniin liittyvien substanssien, kuten metyylihistamiinien, määrittäksen. Useita tuloksia on kirjoitettu

histamiinin ja sen spesifisen metaboliitin Nt-metyylihistamiinin määrytyksestä samasta näytteestä (Granerus 1991). Tämä on kuvattu preparaateista ihmisen virtsasta (Tsuruta ym. 1981, Granerus ja Wass 1984), marsun virtsasta (Houdi ym. 1987) ja rotan aivoista (Tsuruta ym. 1981, Oishi ym. 1984, Harsing ym. 1986, Mine ym. 1986).

1.5.2 Radioimmuunianalyysi eli RIA

Radioimmuunianalyysi eli RIA (engl. radioimmunoassay) on *in vitro* -menetelmä, joka mittaa antigeenin pitoisuuksia näytteestä. RIA on ensimmäinen immunokemiallinen menetelmä, joka kehitettiin analysoimaan nano- ja pikomolaaritason hormonikonsentraatioita biologisissa nesteissä. Menetelmän kehittivät amerikkalaiset Rosalyn Yalow ja Solomon Berson v. 1959. Periaatteessa mikä tahansa biologinen substanssi, jolla on tunnettu vasta-aine, voidaan mitata näytteestä. RIA on vanha tekniikka, mutta sitä käytetään yhä laajasti. Sen etuja ovat helppous, sensitiivisyys ja spesifisyys (Kramer 2013).

RIA:n peruseriaate on kilpaileva sitoutuminen, jossa radioaktiivisesti leimattu antigeeni (merkkiaine) kilpailee leimaamattoman antigeenin kanssa samasta spesifisestä vasta-aineesta. Tutkimuspreparaattiin lisätään tunnettu määrä merkkiainetta ja spesifistä vasta-ainetta ja tutkittava näyte, esim. potilaan veriseerumi, jonka antigeenipitoisuus on tuntematon. Tarkoituksena on selvittää seeruminäytteen antigeenipitoisuus. Veriseerumin leimaamaton antigeeni kilpailee merkkiaineen kanssa sitoutumisesta spesifiseen vasta-aineeseen. Kilpailu vasta-aineesta vapauttaa tietyn määrän merkkiainetta ja tämä määrä on verrannollinen merkkiaineen ja leimaamattoman antigeenin väliseen suhteeseen. Käytännössä, mitä enemmän leimaamattoman antigeenin määrä kasvaa, sitä enemmän se sitoo vasta-ainetta, syrjäyttäen merkkiaineen. Antigeeni-vasta-ainekompleksit erotellaan sitoutumattomista antigeeneista ja supernatantin vapaiden antigeenien radioaktiivisuus mitataan. Käyttämällä tunnettua vakiota voidaan mittaustuloksista luoda matemaattinen käyrä ja tästä sitoutumiskäyrästä voidaan johtaa potilaan seerumissa esiintyvän antigeenin määrä (Kramer 2013).

RIA:lla on useita käyttömuotoja ja sitä käytetään esim. huume-testauksessa, hepatiitti-viruksen seulontaan veripankkiin tulevista näytteistä, varhaisessa syöpäseulonnassa, kasvuhormonitasojen mittaauksessa ja hermovälittäjäaineita koskevissa tutkimuksissa (Advameg Inc). Kaupalliset RIA-reagenssisarjat eli kitit ovat saatavissa myös histamiinin määrytykseen Kittejä valmistavat muun muassa Valeant Pharmaceuticals International Inc. (Laval, Quebec, Kanada), Demeditec Diagnostics GmbH (Kiel-Wellsee, Saksa) ja Immuno-Biological Laboratories GmbH (Hamburg, Saksa). Histamiinipitoisuus plasmassa ja virtsassa voidaan määrittää kvantitatiivisesti.

Esivalmisteluihin kuuluu mm. plasman proteiinien poisto ja histamiinin derivatisaatio N-asetyylihistamiiniksi. Tämän jälkeen suoritetaan protokollan mukainen radioimmunoanalyysi, jonka perusteella voidaan laskea histamiinin pitoisuus näytteessä. *In vitro* -testit histamiinille tukevat rutiinidiagnostiikkaa allergiaselvittelyissä. Se soveltuu myös lääkkeiden aiheuttamien vasteiden tutkimiseen (IBL Immuno-Biological Laboratories GmbH 1999).

Entsyymi-immuunianalyysi eli EIA on RIA:n kanssa samankaltainen analyysimenetelmä, jossa radioaktiivinen leima on korvattu entsyymaattisella leimalla, jonka aktiivisuus mitataan spektrofotometrisesti.

1.4.6 Radioentsyymianalyysi eli REA

Radioentsyymianalyysi- eli REA (engl. radioenzymatic assay) –tekniikan histamiinille kuvasi ensimmäisenä Solomon H. Snyder (Snyder ym. 1966). REA on hyvin sensitiivinen ja spesifinen menetelmä histamiinille. Sen herkkyys on noin 1–2 pg/analyysi. Menetelmä soveltuu histamiinin määrittämiseen biologisista nesteistä. Histamiinitasot plasmassa, veressä ja imurakkulanesteestä voidaan mitata suoraan, kun taas virtsanäytteet vaativat esipuhdistuksen (Harvima 1989). Suuri etu on, verrattuna biologisiin ja fluorometriin määrittämiin, että histamiinin eristystä näytteestä ei tarvita. Myöhemmin tekniikkaan on tehty muokkauksia parantamaan herkkyyttä ja joustavuutta testimenetelmässä (Beaven 1991). Muokkaukset ovat sisältäneet muun muassa rotan munuaisen HMT-preparaatin käyttöönoton (Shaff ja Beaven 1979), joka osoittautui aktiivisemmaksi kuin marsun aivoista tehty preparaatti. Harvima tutkimusryhmineen (1984a) esitti käsittelemättömän HMT-preparaatin sisältävän sisäsyntyistä histamiinia ja totesi HMT:n puhdistuksen poistavan histamiinin ja muut metyyli transferaasit preparaattista. Optimoimalla analyysiolosuhteita REA:n sensitiivisyys on todettu parantuvan. Harvima ym. (1984b) suoritti REA:n TRIS-glysiinipuskuriliuoksessa pH:ssa 8.3 ja lämpötilassa 20 °C käyttämällä ³H-AdoMet:ia ja 90 minuutin inkubaatioaikaa. Näissä olosuhteissa histamiini-REA:n sensitiivisyys viisinkertaistui verrattuna tavanomaisesti käytettyihin olosuhteisiin (fosfaattipuskuriliuos, pH 7.4, lämpötila 37 °C).

2 TUTKIMUSTEHTÄVÄ

Opinnäytetyön tavoitteena oli käydä läpi jälkikäteen potilasaineisto, johon kuului 51 potilaista, joille oli tehty lymfosyyttistimulaatiotesti Kuopion yliopistollisen sairaalan ihotautien klinikassa v. 1998–2013. Tutkimuksen tavoitteena oli vertailla lymfosyyttistimulaatiotestien tuloksia muihin potilaalle tehtyihin allergiakokeisiin ja pohtia tulosten välistä riippuvuutta. Tulosten pohjalta oli

tarkoitus pohtia lymfosyyttistimulaatiotestin luotettavuutta ja käyttökelpoisuutta lääkeaineallergian diagnostiikassa.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Tutkimuspaikka ja –ajankohta

Lymfosyyttistimulaatiotestit suoritettiin Kuopion yliopistollisessa sairaalassa ihotautien klinikan laboratoriossa v. 1998–2013. Lymfosyyttistimulaatiotestejä ei tehty vuosina 2003–2007. Laborantti Katja Dufva suoritti testien käytännön toteutuksen. Potilaan hoitava lääkäri kirjasi lymfosyyttistimulaatiotestin tuloksen potilaan sairauskertomukseen. Lymfosyyttistimulaatiotestin tulos kirjattiin olevan joko positiivinen, negatiivinen tai epävarma. Aineiston tiedot on kerätty potilaiden sairauskertomusteksteistä jälkeinpäin v. 2010 ja 2014–2015.

2.2. Potilaiden ikä- ja sukupuolijakauma

Potilaat ja tulokset on jaettu kahteen ryhmään: ryhmä 1 (1998–2002) ja ryhmä 2 (2008–2013). Jako tehtiin sen vuoksi, että v. 2003–2007 lymfosyyttistimulaatiotestejä ei tehty. Lisäksi ryhmien välillä oli tiettyjä eroja tutkituissa lääkeaineissa: ensimmäisinä vuosina oli tehty useita testejä lääkekullalle, jälkimmäisinä vuosina oli taas tutkittu antibiootti-allergioita. Ryhmästä 1 eroteltiin vielä tulosten käsittelyvaiheessa erikseen potilaat, joilla oli tutkittu nikkeli- ja vehnä- ja ohra-allergiaa, koska opinnäytetyön tavoitteena oli perehtyä lääkeallergioihin.

Ryhmässä 1 oli potilaita yhteensä 23 kpl (19 kpl naisia, 4 kpl miehiä) ja ryhmän iän keskiarvo oli 51 vuotta, iän mediaani 50 ja iän moodi 48,65,71. Ryhmässä 2 oli potilaita yhteensä 28 kpl (22 kpl naisia, 6 kpl miehiä) ja ryhmän iän keskiarvo oli 56 vuotta, iän mediaani 56,5 ja iän moodi 53. Tarkasteltuna molempia ryhmiä yhdessä oli koko tutkimusaineistossa yhteensä 51 potilasta (41 kpl naisia, 10 kpl miehiä), joiden iän keskiarvo oli 53,5 vuotta. Nuorin potilas oli 10-vuotias ja vanhin potilas oli 85-vuotias.

2.3 Aineiston keräys

Potilaiden sairauskertomusteksteistä kerättiin seuraavat tiedot: potilaan diagnoosi/kliininen kuva, mille aineelle lymfosyyttistimulaatiotesti toteutettiin, tehdyt allergeitit ja niiden tulokset. Tuloksista muodostettiin taulukot, joihin kirjattiin seuraavat asiat: lääkeaineen geneerinen nimi, $n =$

kyseiselle lääkeaineelle tehtyjen lymfosyyttistimulaatiotestien määrä, diagnoosi/kliininen kuva, lymfosyyttistimulaatio (testitulos), spesifinen IgE (testitulos), epikutaanikoe (testitulos), prick-koe (testitulos), altistus (testitulos) ja allergia testiaineelle.

Jos potilaalle ei ollut annettu tarkkaa diagnoosia ja/tai diagnoosikoodia, on taulukkoon kirjattu hoitavan lääkärin sairauskertomustekstissä käyttämä kliininen kuvaus ihottumasta. Allergiakokeiden tulokset on kirjattu olemaan joko positiivinen, negatiivinen tai epävarma. Yksittäisissä tapauksissa se oli myös heikko positiivinen. ”Allergia testiaineelle” –sarakkeen tiedot on koottu altistustestien tulosten perusteella. Jos altistus oli positiivinen, on sarakkeeseen kirjattu ”varmistettu”; jos negatiivinen, on kirjattu ”poissuljettu”; jos altistusta ei tehty, on kirjattu ”epäselvä”. Varmistettu tarkoittaa sitä, että allergia on lääkealtistuksella saatu varmistettua eli potilas on allerginen tutkitulle lääkeaineelle. Poissuljettu tarkoittaa sitä, että lääkealtistuksessa tutkittu lääkeaine ei ole aiheuttanut oireita eli potilas ei ole allerginen kyseiselle lääkeaineelle. Epäselvä tarkoittaa sitä, että lääkealtistusta ei tehty ja allergiaa ei ole voitu varmistaa tai poissulkea muiden tehtyjen testien perusteella eli reaktion aiheuttaja on jäänyt epäselväksi. Yksittäisissä tapauksissa, joissa potilas oli saanut vaikean ihoreaktion (esim. Stevens-Johnsonin syndrooma) ja altistusta ei toteutettu, on sarakkeeseen kirjattu ”epäselvä”. Käytännössä, jos esitiedot viittaisivat tarkasti lääkeainereaktioon ja kyseessä olisi ollut vaikea ihoreaktio, lääkäri kieltäisi potilaalta kyseisen lääkkeen käytön ja lääkeallergiaa pidettäisiin hyvin todennäköisenä. Päädyin kuitenkin laatimaan sarakkeen tiedot perustuen vain tehtyjen altistustestien tuloksiin.

Nikkeliallergiaepäilyissä allergia testiaineelle varmistettiin epikutaanikokeella vastaavasti kuin altistuskokeella lääkeaineallergioiden yhteydessä.

2.4 Lymfosyyttistimulaatiotestin laboratoriotekniikka

Liitteenä (Liite 1-3) on tarkat laboratorio-ohjeet LST:n suorittamiselle. Tämän aineiston tutkimukset tehtiin näitä ohjeita noudattaen. Lyhyesti tiivistettynä laboratoriomenetelmä (välivaiheita puuttuu): Verinäyte ja hepariini-RPMI sekoitetaan 50 ml:n näyteputkessa suhteessa 1:1. Pipetoidaan 10 ml Ficoll-Paque’ia ja päälle 10 ml puoleen laimennettua verta niin, että kerrokset eivät sekoitu toisiinsa. Näyte sentrifugoidaan, jolloin erottuvat plasmakerros, pääasiassa lymfosyyttejä sisältävä kerros Ficoll-Paque’n päällä, Ficoll-Paque-kerros ja sen alla punasolu-granulosyyttikerros. Plasmakerros ja lymfosyyttirikas kerros otetaan erikseen talteen. Solujen pesun ja sentrifugoinnin jälkeen lisätään 10 ml liuosta (RPMI tai PBS). Sekoitetaan solususpensio näyteputkessa kristalliviolettiliuoksen kanssa. Solut lasketaan Bürker-kammiolla, vähintään 3 kenttää (kenttien keskiarvo jaettuna 10:llä ja kerrottuna solususpension tilavuudella millilitroina on

solumäärä miljoonissa). Sentrifugoinnin jälkeen solujen päälle 40 % laimentunutta plasmaa ja loput 60 % hepariini-RPMI:tä siten, että lopullinen solumäärä on miljoona solua/ml. Kuoppalevyn kuoppiin tehdään kuusi rinnakkaista kuoppaa ei-stimuloituihin kontrollikuoppiin ja kolme rinnakkaista antigeenillä stimuloituihin kuoppiin ja pyritään tekemään kaksi eri viljelyaikaa. Vuorokausi ennen viljelyn päättymistä lisätään solujen päälle tritioitua tymidiiniä 25 µl/kuoppa. Näytteet siirretään suodatinpaperikiekon kautta tuikeputkiin, lisätään 3,5 ml tuikeliuosta ja mitataan radioaktiivisuus nestetuikelaskimella. Lasketaan rinnakkaisten keskiarvot ja stimulaatioindeksit = dpm stimuloitussa viljelmässä/dpm 0-viljelmässä. Stimulaatioindeksejä > 2-3 pidetään positiivisena tuloksena.

4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

4.1 Koko aineisto

Koko aineistossa oli potilaita yhteensä 51 kpl, ottaen huomioon vain lääkeaineallergiaepäilyt 44 kpl. Koko aineistossa lymfosyyttistimulaatioita tehtiin yhteensä 69 kpl, joista 60 kpl lääkeaineille, 5 kpl nikkelille, 2 kpl vehnälle ja 2 kpl ohralle. Testattuihin lääkeaineisiin kuului yhteensä 38 eri lääkeainetta. Yksittäisen potilaan kohdalla tutkittavia lääkeaineita oli 1–3. Ryhmässä 1 yhden potilaan kohdalla tutkittiin kolmea eri lääkeainetta, viiden potilaan kohdalla kahta eri lääkeainetta, muiden kohdalla epäiltyjä lääkeaineita oli 1 kpl. Ryhmässä 2 kuuden potilaan kohdalla tutkittiin kahta eri lääkeainetta ja muiden kohdalla epäiltyjä lääkeaineita oli 1 kpl.

Jos tarkastellaan vain lääkeaineille tehtyjä testejä, joita tehtiin 44 potilaalle yhteensä 60 kpl, oli LST positiivinen kuudessa tapauksessa eli 10 %:ssa lääkeaineille tehdyissä testeissä. LST oli epävarma neljässä tapauksessa eli 7 %:ssa ja negatiivinen 50 tapauksessa eli 83 %:ssa tehdyistä testeistä. Altistuskokeella 44 potilaan joukosta allergia varmistettiin viiden potilaan kohdalla (11 % potilaista) ja poissuljettiin 15 potilaan kohdalla (34 % potilaista). Siten allergia jäi epäselväksi 24 potilaalla eli 55 %:lla potilaista.

TAULUKKO 1. Lääkeaineille suoritettujen lymfosyyttistimulaatiotestien tulos ja lukumäärä, altistusten tulos

Lymfosyyttistimulaatiotesti	Altistus	<i>n</i> , ryhmä 1+2	<i>n</i> , ryhmä 1	<i>n</i> , ryhmä 2
positiivinen	ei tehty	6	6	0
positiivinen	positiivinen	0	0	0
positiivinen	negatiivinen	0	0	0
negatiivinen	ei tehty	32	14	18
negatiivinen	positiivinen	5	2	3

negatiivinen	negatiivinen	13	2	11
epävarma	ei tehty	4	2	2
		yht. 60	yht. 26	yht. 34

4.2 Tulokset ryhmälle 1

Taulukossa 2 (Liite 4, s. 43–4) on tutkimustulokset ryhmälle 1 v. 1998–2002. Lymfosyyttistimulaatiotestejä tehtiin 20:lle eri lääkkeelle yhteensä 26 kpl. Testejä tehtiin 4 kpl kulta-natriumtiosulfaatile, 4 kpl natrium-aurotiomalaatile ja lopuille 16 lääkeaineelle 1 kpl/lääkeaine. Lisäksi ryhmään 1 kuului viisi potilasta, joilla epäiltiin nikkeli-allergiaa (Taulukko 3) ja kaksi potilasta, joilla tutkittiin allergiaa vehnälle ja ohralle (Taulukko 4). Yhteensä lymfosyyttistimulaatiotestejä tehtiin tässä ryhmässä 35 kpl. Nikkeli-, vehnä- ja ohra-allergia käsitellään omassa kappaleessaan (4.4, s. 28).

Taulukosta 2 nähdään, että 26:sta lääkeaineelle tehdystä lymfosyyttistimulaatiotestistä (LST) saatiin positiivinen tulos kuudessa tapauksessa (23 % tapauksista), epävarma tulos kahdessa tapauksessa (8 % tapauksista) ja negatiivinen tulos lopuissa eli 17 tapauksessa (71 % tapauksista). LST:n positiiviset tulokset on koottu myös taulukkoon 5, jossa on näkyvillä myös potilaan diagnoosi ja altistuksen tulos. Yhdelle testipotilaista testattiin sekä insuliinivalmiste (Humulin NPH), joka sisältää protamiinia että insuliinivalmiste (Actrapid), joka ei sisällä protamiinia ja erikseen protamiini-valmiste. Protamiinia sisältävä ihmisinsuliinivalmiste ja protamiini antoivat positiivisen tuloksen LST:ssa.

TAULUKKO 5. Positiiviset testitulokset lymfosyyttistimulaatiotestissä.

Lymfosyyttistimulaatio: testitulos positiivinen	Kliininen diagnoosi	Altistuksen tulos
Kulta-natriumtiosulfaatti	L30.9 Dermatitis NUD (kulta-dermatiitti-epäily)	nd
Kulta-natriumtiosulfaatti	Alkuun selkeä flush-oire kultainjektioon liittyen, nyt pistoksen yhteydessä voimakas kohtaus (anafylaksia-tyyppinen)	nd
Ihmisinsuliini, sis. protamiinia	Urtikariapaukamointi pistokohtaan	nd
Protamiini	Urtikariapaukamointi pistokohtaan	nd
Karbidopa	L30.9 Erythrodermia NAS	nd
Nabumetoni	L51.5 Syndroma Stevens-Johnson	nd

nd = not done, ei tehty

Taulukosta 2 nähdään, että epikutaanikokeita oli suoritettu 8 potilaalle eli 30 %:lle potilaista. Näissä seitsemässä sekä LST että epikutaanikoe olivat negatiivisia, yhdessä tapauksessa LST oli positiivinen ja epikutaanikoe negatiivinen. Tässä yksittäisessä tapauksessa potilaan diagnoosi oli Stevens-Johnsonin syndrooma ja tutkittavana lääkkeenä nabumetoni. Nabumetonin aiheuttama lääkereaktio vaati tehohoitoa ja tilanne ei mahdollistanut lääkeainealtistuksen tekoa. Altistuskoe tehtiin näissä 8 tapauksessa kahdelle potilaalle, joilla epäiltiin allergiaa sulfasalatsiinille ja natrium-aurotiomalaatille. Sulfasalatsiinille altistus jäi negatiiviseksi ja natriumtiomalaatille saatiin positiivinen tulos. Molemmissa tapauksissa sekä LST että epikutaanikoe olivat antaneet negatiivisen tuloksen.

Prick-kokeita tehtiin yhteensä 4 kpl eli vain 12 %:ssa tapauksista. Prick-kokeiden tulokset olivat erilaisia LST:n tulosten kanssa: kulta-natriumtiosulfaatin ja protamiinia sisältävän ihmisinsuliini- valmisteiden (molempia 1 kpl) yhteydessä LST todettiin positiiviseksi, mutta Prick-koe negatiiviseksi. Protamiinia sisältävän insuliinin yhteydessä tutkittiin myös spesifinen IgE ja intrakutaanitesti, jotka molemmat jäivät negatiivisiksi. Vain kahdella potilaalla LST ja Prick-koe antoivat saman tulokset (negatiivinen), näitä olivat lisproinsuliini ja natrium-aurotiomalaatti. Lisproinsuliinin yhteydessä tutkittiin myös intrakutaanitesti, joka jäi negatiiviseksi. Altistusta ei yhdessäkään näissä neljässä tapauksessa tehty, joten allergia testiaineelle jäi epäselväksi.

Insuliinihoitoa käyttävä potilas voi allergisoitua lääkevalmisteiden insuliinille tai valmisteiden muille komponenteille. Pitkävaikutteisissa insuliini- valmisteissa käytetään protamiinia insuliiniin yhdistettynä (Räsänen ym. 1994). Tutkimuspotilaalla, jolla tutkittiin sekä ihmisinsuliinia, lisproinsuliinia että protamiinia, oli testin tekohetkellä käytössä Humulin NPH (ihmisinsuliini) ja Humalog (lisproinsuliini). Aiemmin potilaalla oli ollut käytössä Protaphane (ihmisinsuliini) ja Actrapid (ihmisinsuliini) ja oireilu (urtikariapaukammat ja punoittelu pistokohdassa) oli alkanut jo näiden valmisteiden käyttöaikana. Potilaalla tutkittiin protamiini- ja humaani-insuliini RAST:t, jotka olivat negatiiviset. Prick-testinä testattiin Protaphane, Actrapid ja Humutard (kaikki sis. ihmisinsuliinia), nämä olivat negatiiviset. Samat insuliinit testattiin myös intrakutaanitestinä 1:100, 1:10 ja laimentamattomana, testit olivat negatiiviset. Testattiin Novo Nordisk Farma Oy:n insuliinitestisarja Prick-testinä, lisäksi Humulin NPH ja Humalog laimentamattomana Prick-testinä, kaikki testit jäivät negatiivisiksi. Tehtiin myös intrakutaanitestit Novo Nordiskin insuliinitestisarjalla laimentamattomana ja omilla insuliineilla Humalog ja Humulin NPH 1:100, 1:10 ja laimentamattomana. Protamiinille saatiin ic-testissä epävarmaksi positiiviseksi tulkittava reaktio. Lymfosyyttistimulaatiotesti oli tehty Humalogille, Actrapidille, Humulin NPH:lle ja

protamiinille, näissä protamiinille ja Humulin NPH:lle (voi sis. protamiinia) positiivinen reaktio, sen sijaan Humalog ja Actrapid negatiiviset.

Altistus toteutettiin 24 potilaasta ainoastaan neljälle (17 % tapauksista). Tutkittavina lääkeaineina olivat natrium-aurotiomalaatti (2 kpl), sulfasalatsiini ja valproiinihappo. LST antoi kaikille negatiivisen tuloksen. Altistus oli negatiivinen sulfasalatsiinille ja valproiinihapolle. Kaiken kaikkiaan 50%:ssa tapauksista LST ja altistus antoivat saman tulokset.

Nivelreuman hoitoon käytettyä lääkekultaa oli tutkittu kuudella tutkimuspotilaalla. LST oli tehty joko kulta-natriumtiosulfaatile tai natrium-aurotiomalaatille, molemmille 4 kpl testejä. Kulta-allergiaepäilyn vuoksi kahdella naispotilaalla oli testattu sekä kulta-natriumtiosulfaatti (Au-Na-tiosulfaatti) ja natrium-aurotiomalaatti (Na-Au-tiomalaatti). Diagnoosi/kliininen kuva oli ensimmäisessä tapauksessa ”L30.9 Dermatitis NUD (kulta-dermatiitti-epäily)” ja toisessa ”Alkuun selkeä flush-oire kultainjektioon liittyen, nyt pistoksen yhteydessä voimakas kohtausta (anafylaksia-tyyppinen)”. Molemmissa tapauksissa LST antoi positiivisen tuloksen Au-Na-tiosulfaatile, mutta negatiivisen Na-Au-tiomalaatille. Altistusta ei näille kahdelle potilaalle tehty. Ensimmäisellä potilaalla (taulukko 2, Au-Na-tiosulfaatti, 1. potilas ja Na-Au-tiomalaatti, 3. potilas) olivat epikutaanikokeet negatiiviset. Toisella potilaalla (taulukko 2, Au-Na-tiosulfaatti ja Na-Au-tiomalaatti, 4. potilas) oli Prick-koe negatiivinen molemmille kultayhdisteille. Natrium-aurotiomalaattia oli testattu myös kahdelle muulle potilaalle ja LST antoi negatiivisen tuloksen, kun taas altistus oli positiivinen. Epikutaanikokeet oli toteutettu toiselle potilaista ja tulos oli negatiivinen.

4.3 Tulokset ryhmälle 2

Ryhmässä 2 tehtiin lymfosyyttistimulaatiotestejä yhteensä 34 kpl, joista tehtiin kefaleksiinille 7 kpl, amoksisilliinille 4 kpl, fenoksimetyylipenisilliinille 4 kpl, bentsyyliipenisilliinille 3 kpl, hydroksiklorokiinille ja klindamysiinille 2 kpl ja lisäksi 12 muulle lääkeaineelle 1 kpl/lääkeaine. Tulokset ovat koottuna taulukkoon 6 (Liite 5, s. 45–7).

Taulukon 6 tuloksista voidaan laskea, että LST antoi negatiivisen tuloksen 32 tapauksessa (94 % tapauksista) ja epävarman tuloksen kahdessa tapauksessa (6 % tapauksista). Positiivisia LST:n tuloksia ei ollut. LST:n tulokset on koottu myös Taulukkoon 6, jossa on vertailtu altistustuloksia LST:n tulosten kanssa. Altistuskokeita tehtiin 16 kpl, näistä kolme olivat positiivisia (19 %) ja 13 kpl negatiivisia (81 %). Siten kaikista ryhmän tapauksista 9 %:ssa allergia varmistettiin, 41 %:ssa tapauksista se poissuljettiin ja 50 %:ssa tapauksista allergia jäi epäselväksi.

Tapauksia, joissa altistus ja LST olivat molemmat negatiivisia, oli yhteensä 11 kpl (32 % tapauksista). Näistä viisi oli kefaleksiinille, kaksi bentsyyliipenisilliinille, kolme fenoksimetyyliipenisilliinille ja yksi asetyylisalisyylihapolle. Kefaleksiinille altistuksia tehtiin kuudessa tapauksessa seitsemästä ja näissä kaikissa altistus oli negatiivinen. LST oli viidessä tapauksessa negatiivinen ja yhdessä epävarma. Kaiken kaikkiaan viidessä tapauksessa kuudesta (83 %:ssa tapauksista) LST antoi saman tuloksen kefaleksiinille kuin altistus. Bentsyyliipenisilliini-allergiaepäilyitä oli 3 kpl, joista fenoksimetyyliipenisilliini-altistus tehtiin kaikille ja se oli negatiivinen. LST bentsyyliipenisilliinille oli epävarma yhdessä tapauksesta kolmesta ja negatiivinen kahdessa. Siten 67 %:ssa tapauksista bentsyyliipenisilliinille LST ja altistus antoivat saman tuloksen. Fenoksimetyyliipenisilliinille altistus tehtiin kolmelle potilaalle neljästä ja näissä kaikissa tulos oli negatiivinen. Samoin LST:n tulos oli negatiivinen, joten 100 %:ssa tapauksista LST ja altistus antoivat saman tuloksen. Asetyylisalisyylihapolle altistettiin yksi potilas ja tulokseksi saatiin sekä negatiivinen altistus että negatiivinen LST.

Kolmessa tapauksessa altistus oli positiivinen ja LST negatiivinen. Tutkittuja lääkkeitä olivat amoksisilliini, klindamysiini ja valasikloviiri. Amoksisilliinin tapauksessa sekä amoksisilliini-IgE että Prick-koe olivat negatiiviset. Klindamysiinin kohdalla tehtiin ainoastaan LST ja altistus. Valasikloviirin tapauksessa LST:n lisäksi oli tehty epikutaanikoe, joka oli myös negatiivinen. Amoksisilliinin kohdalla voi todeta, että pistokoe, spesifisen IgE:n määrittäminen ja LST antoivat viitteitä siitä, että potilaalla ei olisi amoksisilliini-allergiaa. Altistus kuitenkin varmisti allergian ja siten tulokset ovat keskenään ristiriitaisia. Valasikloviirin kohdalla taas sekä epikutaanikoe että LST tulos antoivat eri tuloksen kuin altistus.

Lymfosyyttistimulaatio oli 18 tapauksessa negatiivinen ja altistusta ei tehty. Näissä 16:ssa ei potilaalle tehty muita allergiatutkimuksia kuin LST. Kahdessa tapauksessa, jossa tutkittiin molemmissa amoksisilliini-allergiaa, oli LST:n lisäksi tehty muita tutkimuksia. Ensimmäisessä oli tehty Prick-koe, joka antoi myös negatiivisen tuloksen. Potilaan diagnoosina oli urtikaria-epäily. Toisessa tapauksessa tutkittiin sekä G- ja V-Pen-IgE että amoksisilliini-IgE, jotka olivat negatiiviset ja Prick-koe ja G-Pen-intrakutaanitesti, jotka olivat myös negatiiviset. Potilaan diagnoosina oli dermatitis pustulosa. Molemmissa tapauksissa LST oli siten antanut samat tulokset kuin muut allergiatestit.

Tarkastellaan tapauksia, joissa allergia oli poissuljettu altistuksella ja LST:n lisäksi oli tehty muita allergiatutkimuksia. LST:n lisäksi oli tehty sekä spesifisen IgE:n määrittäminen ja/tai Prick-koe. Tällaisia tapauksia oli yhteensä 11 kpl. Näissä vain kahdessa LST:n tulos oli epävarma. Ensimmäisessä

tapauksessa Prick-kokeella saatiin negatiivinen tulos ja toisessa sekä G- ja V-Pen-IgE että Prick-koe olivat negatiiviset. Lopuissa yhdeksässä tapauksessa LST oli negatiivinen. Näissä tapauksista neljästä oli tehty lisäksi Prick-koe, jonka tulos oli kaikissa negatiivinen. Lopuissa viidessä tapauksessa oli tehty Prick-koe, spesifinen IgE ja kahdessa tapauksessa lisäksi myös intrakutaanikoe. Kaikissa tapauksissa kaikki edellä mainitut testit antoivat saman tuloksen kuin LST eli negatiivinen.

4.4 Tulokset nikkeli-allergian ja vehnä- ja ohra-allergiaepäilyn yhteydessä

Nikkeli-allergiaa tutkittiin viidellä tutkimuspotilaalla v. 1998 (Taulukko 3). Heille suoritettiin sekä LST että epikutaanikoe. Epikutaanikoe antoi jokaisessa tapauksessa positiivisen testituloksen kun taas LST oli vain yhdessä tapauksista positiivinen ja muissa negatiivinen. Nikkeli-allergia todettiin varmistetuksi kaikilla potilailla, pohjautuen positiiviseen tulokseen epikutaanikokeessa.

TAULUKKO 3. Lymfosyyttistimulaatiotestit nikkeli-allergian yhteydessä.

Nro	Ikä	Sukupuoli (M/N)	Testiaine	Lymfosyyttistimulaatio	Epikutaanikoe	Allergia testiaineelle
1	75	N	nikkeli	posit.	posit. (+)	varmistettu
2	30	N	nikkeli	neg.	posit. (+)	varmistettu
3	39	N	nikkeli	neg.	posit.	varmistettu
4	51	N	nikkeli	neg.	posit. (+)	varmistettu
5	49	N	nikkeli	neg.	posit.	varmistettu

neg. = negatiivinen, posit. = positiivinen

Lisäksi LST oli suoritettu kahdelle potilaalle, joilla epäiltiin allergiaa vehnälle ja ohralle (taulukko 4). Testit tehtiin v. 1998 ja 2000. Ensimmäisessä tapauksessa diagnoosina oli krooninen ekseema. Vehnäallergia oli poissuljettu altistuksella ja LST oli negatiivinen. Samoin Prick-testi (viljat 1 -sarja) ja histamiiniliberaatio oli negatiivinen. Toisessa tapauksessa diagnoosina oli urtikaria. LST oli ohralle positiivinen ja epikutaanikokeissa oli reaktio ohralle positiivinen. Prick-testi (viljat 1 -sarja) oli kuitenkin negatiivinen, samoin spesifinen IgE ohralle ja vehnälle negatiivinen. Tällöin kyseessä oli viivästynyt reaktio ohralle.

TAULUKKO 4. Lymfosyyttistimulaatiotestit vehnä- ja ohra-allergiaepäilyissä.

Nro	Ikä	M/N	Diagnoosi	Testiaine	Lymfosyytti-stimulaatio	Muut testit	Allergiatestien tulkinta
-----	-----	-----	-----------	-----------	-------------------------	-------------	--------------------------

1	29	M	Eczema chronicum manus et pedis psoriasiformis	vehnä, ohra	neg.	Prick-testit: neg., histamiiniliberaatiot neg., altistus vehnälle neg.	allergia poissuljettu
2	48	N	Urticaria residivans	vehnä, ohra	posit.	Epikutaanit: ohra +, Prick: neg., vehnä- ja ohra-IgE: neg.	viivästynyt reaktio ohralle

neg. = negatiivinen, posit. = positiivinen

5 POHDINTA

Lymfosyyttistimulaatiotestin käytännön toteuttamisesta on kokemusta ihotautien yksikön laboratoriossa, joten LST:n tuloksia voitiin pitää luotettavina. Tässä tutkimuksessa SI-arvo 2-3 kirjattiin positiiviseksi. Kuten kappaleessa ”1.4.1 Lymfosyyttistimulaatiotesti” mainittiin, muut tutkimusryhmät ovat voineet määrittää SI-arvon eri tavoin esim. beetalaktaameille. Loppujen lopuksi koko tutkimusaineistossa positiivisia LST:n tuloksia oli vain 6 kpl (10 % kaikista lääkeaine-tapauksista).

Aineisto sisälsi hyvin erilaisia lääkkeitä. Testejä tehtiin useimmille lääkkeitä varten vain yksi kappale ja tuloksista on siten hyvin vaikeaa tehdä päätelmiä. Lääkeryhmittäin tarkasteltuna testejä tehtiin eniten beetalaktaameille (penisilliini, 1. polven kefalosporiinit) ja niiden tuloksista saatiin siten toistoa. Tulokset olivat samansuuntaisia kuin mitä Nyfeler ja Pichler (1997) saivat tutkiessaan allergiaa beetalaktaameille.

Lymfosyyttistimulaatiotestin suoritusajankohta suhteessa lääke-reaktioon oli vaihteleva. Osalle potilaista testi toteutettiin pian ihottuman rauhoituttua, toisille vasta useiden vuosien kuluttua altistuksesta. Tässä tutkimuksessa en kerännyt rutiinisti ylös sairauskertomuksista testin suoritusajankohtaa. Tämä tieto olisi voinut tuoda lisäarvoa erityisesti tilanteissa, jossa LST oli positiivinen tai joissa LST ja altistus antoivat saman tuloksen. Pichler ja Tilch (2004) tekevät testin 4–8 viikon kuluttua reaktiosta ja suosittelevat sitä tehtäväksi 2–3 vuoden sisällä altistuksesta. Joka tapauksessa testiajankohdan vakioiminen toisi säännöllisyyttä LST:ä koskevaan tutkimukseen ja lisäksi luotettavuutta testituloksissa. Pichler ja Tilch (2004) tarkkailevat myös immunosuppressiivisten lääkkeiden aiheuttamaa lymfopeniaa ennen testin suorittamista. Tässä tutkimusaineistossa potilasteksteihin ei ollut erikseen kirjattu, että potilaan valkosolutaso olisi

kontrolloitu ennen testin tekoa, joten niin ei todennäköisesti tehty. Kortikosteroidien ja muiden immunosuppressiivisten lääkkeiden tauottamista ennen testin tekoa en seurannut rutiinisti.

Esitiedot ja kliininen kuva olivat potilailla hyvin vaihtelevia. Esimerkiksi nabumetonin yhteydessä potilaan ihottumalla oli selvä yhteys lääkeaineen käyttöön. Kuitenkin monissa tapauksissa lääkeaine oli saattanut aiheuttaa potilaalle iho-oireita jo vuosia sitten, jonka vuoksi esim. antibioottien käyttöä oli rajoitettu. Ihotautilääkärin tekemä diagnoosi perustui siten potilaan omaan kertomukseen ja allergiatestit haluttiin suorittaa poissulkumielessä. Muutamilla potilailla oli kyseinen lääkeaine ollut käytössä jo vuosia ongelmitta, jonka jälkeen iho-oireilu alkanut. Tällaisissa tilanteissa myös mahdollisten muiden ihottumaa laukaisevien tekijöiden huomioonottaminen on tärkeää.

Tutkimustulosten arviointia vaikeutti se, että potilaat olivat hyvin heterogeeninen joukko sen suhteen, mitä allergiatestejä heille oli toteutettu. LST:n vertailu muiden tutkimustulosten kanssa oli osassa tapauksista mahdotonta, koska niitä ei ollut. Ainoa potilaita yhdistävä tekijä oli se, että kaikille oli tehty lymfosyyttistimulaatiotesti ja epäiltiin lääkeallergiaa. Nikkeliallergian yhteydessä, jossa diagnoosi perustuu rutiinisti epikutaanikokeen tulokseen, oli vertailu yksinkertaista, koska kaikille tutkimuspotilaille oli tehty sekä epikutaanikoe että LST. Samoin lääkeaineiden kohdalla: jos altistus oli tehty, voitiin sen tulosta verrata LST:n tulokseen ja luoda päätelmiä LST:n luotettavuudesta. Kuitenkin tässä aineistossa useammille potilaille ei tehty altistusta ja allergia jäi epäselväksi. Useassa tapauksessa LST oli ainoa allergiatesti, joka potilaalle oli suoritettu. Tällöin vertailua esim. spesifisen IgE:n määrittämisen, epikutaani- tai Prick-kokeen kanssa ei voitu suorittaa. Lymfosyyttistimulaatiota koskevan tutkimuksen suhteen tuloksia olisi parantanut se seikka, että muut allergiatutkimukset olisi mahdollisuuksien mukaan tehty rutiinisti kaikille potilaille.

Kaiken kaikkiaan, tutkimuksen lähtökohtana oli seurata ja arvioida LST:n käyttökelpoisuutta lääkeallergian diagnostiikassa ja tämä tutkielma toimii siten pilottitutkimuksena. Kuitenkin olisin tehnyt testiasetelman alkuvaiheessa muutamia systemaattisia muutoksia, jotta tulokset olisivat yhteneviä aiemmin kansainvälisesti julkaistujen LST:ta käsittelevien tutkimusten kanssa. Alkuasetelmassa olisin muuttanut ensimmäisenä sen, että potilaat olisi jaettu ryhmiin esitietojen mukaan sen suhteen kuinka todennäköinen allergia oli. Toiseksi, olisin keskittänyt lymfosyyttistimulaatiotestit vain tietyille lääkeryhmille ja kasvattanut aineistoa mahdollisuuksien mukaan ottamalla tutkimukseen enemmän potilaita. Toiseksi, olisin vakioinut testin suoritusajankohdan koskemaan kaikkia potilaita käyttämällä esim. Pichlerin ja Tilchin (2004) tapaa tehdä testi 4–8 viikon kuluttua reaktiosta. Tämä tieto ei ollut olemassa tämän potilastutkimuksen aloitusvaiheessa. Kolmanneksi, olisin päättänyt esitietojen ja kliinisen tilanteen mukaan ne

allergiatestit, joiden tulokset haluan ja olisin teettänyt samat testit kaikille tutkimuspotilaille. Lisäksi, olisin kiinnittänyt huomiota potilaan käytössä oleviin lääkityksiin ja varmistanut, ettei potilaalla ole lymfopeniaa aiheuttavaa immunosuppressiivista lääkitystä käytössä.

Beetalaktamaasiherkille penisilliineille (bentsyylipenisilliini, fenoksimetyylipenisilliini) ja ensimmäisen polven kefalosporiineille (kefaleksiini) saatiin hyviä tuloksia. Viidessä tapauksessa, jossa tutkittiin kefaleksiini-allergiaa, antoivat LST ja altistus negatiivisen tuloksen. Kefaleksiinille altistettuja potilaita oli yhteensä kuusi, joista yhdessä tapauksessa LST antoi epäselvän tuloksen. Kaiken kaikkiaan LST:n spesifisyydeksi kefaleksiinille saatiin 83 %. Bentsyylipenisilliinille LST:n spesifisyydeksi saatiin 66 %. Bentsyylipenisilliinille altistettuja potilaita oli vain kolme, joissa kaikissa altistus antoi negatiivisen tuloksen. Näistä tapauksista LST oli kahdessa tapauksista negatiivinen ja yhdessä epävarma. Fenoksimetyylipenisilliini-allergiaepäilyn vuoksi tehtiin altistus kolmelle potilaalle. Kaikissa kolmessa tapauksista sekä LST että altistus olivat negatiiviset, joten LST:n spesifisyys oli fenoksimetyylipenisilliinille 100 %. Kaiken kaikkiaan yksittäisten antibioottien kohdalla aineisto oli pieni ja siten tuloksista ei voi tehdä laajempia päätelmiä. Ne kuitenkin tukevat Nyfeler ja Pichler (1997) havaintoa siitä, että LST olisi hyödyllinen testi beetalaktaami- allergioiden yhteydessä. He tutkivat penisilliini-allergiaa 78 tutkimuspotilaalla ja saivat LST:n sensitiivisyydeksi 74 % ja spesifisyydeksi 85 %.

Nabumetoni aiheutti tutkimuspotilaalle vakavan ihoreaktion, Stevens-Johnsonin syndrooman. Esitietojen perusteella lääkkeen käytön ja ihoreaktion välillä oli selvä yhteys. Altistus oli vasta-aiheinen lääkkeen aiheuttaman voimakkaan reaktion vuoksi. Potilaalle suoritettiin allergiatesteistä vain LST, joka antoi positiivisen tuloksen. Täten voidaan olettaa, että LST voisi tuoda lisäinformaatiota allergian diagnostiikkaan tilanteissa, joissa vakavan ihoreaktion tai muun vasta-aiheen vuoksi altistusta ei voida suorittaa.

Asetyyylisalisyylihapon, sulfasalatsiinin ja valproiinihapon aiheuttamissa allergiaepäilyissä LST näytti toimivan hyvin. Potilaille oli tehty sekä altistus että LST, joten tulosten vertailu oli helppoa. Asetyyylisalisyylihappoa käytetään sekä kipulääkkeenä että anti-fibrinolyttisenä lääkeaineena, sulfasalatsiinia nivelreuman ja koliittien ja valproiinihappoa epilepsian hoidossa. Asetyyylisalisyylihappoa, sulfasalatsiinia ja valproiinihappoa tutkittiin vain yksittäisillä tutkimuspotilailla ja heillä tulos oli negatiivinen sekä altistuksella että LST:lla. LST:n spesifisyys oli tällöin 100 %. Aineisto oli kuitenkin hyvin pieni.

Nivelreuman hoitoon käytettyä kultaa oli tutkittu kuudella tutkimuspotilaalla. Kahdelle potilaalle tehtiin LST sekä kulta-natriumtiosulfaatille ja natrium-kultatiomalaatille. Kummallekin potilaalle

LST antoi positiivisen tuloksen Au-Na-tiosulfaatille, mutta negatiivisen Na-Au-tiomalaatille. Toisessa tapauksista oli lisäksi Prick-koe negatiivinen Myocrisinille eli Na-Au-tiomalaatille. Na-Au-tiomalaatille LST antoi kaikissa neljässä tapauksessa negatiivisen tuloksen, kun altistus oli tehty kahdelle potilaalle ja oli positiivinen. Epikutaanikoe ja Prick-koe antoivat näissä tapauksissa myös negatiivisia tuloksia. Tämän aineiston perusteella LST:n soveltuvuus lääkekullan allergiadiagnostiikkaan jää epäselväksi. Kuitenkin verrattuna epikutaani- ja Prick-kokeisiin, olisi LST:n käyttökelpoisuus kulta-allergian diagnostiikassa ainakin yhtä hyvä.

Yhdelle testipotilaista testattiin sekä insuliinivalmiste (Humulin NPH), joka sisältää protamiinia että insuliinivalmiste (Actrapid), joka ei sisällä protamiinia ja pelkkä protamiini-valmiste. Protamiinia sisältävä ihmisinsuliinivalmiste ja protamiini antoivat positiivisen tuloksen LST:ssa. Toisaalta potilaalla oli LST:n tekohetkellä käytössä Humulin NPH. Prick- ja RAST-testeissä saatiin kyseisille insuliinivalmisteille vain negatiivisia tuloksia. Intrakutaanitestissä protamiinille tuli epäselvä positiivinen reaktio. LST:n perusteella protamiini on todennäköisempi reaktion aiheuttaja kuin ihmisinsuliini.

Lisäksi yksittäinen positiivinen LST-tulos saatiin karbidopalle. Potilaan diagnoosina oli erythrodermia NAS. Potilaalla testattiin samanaikaisesti hydroklooritiatsidia, jonka tulos oli epävarma. Potilaalla oli kuitenkin käytössä hydroklooritiatsidi testin tekohetkellä ja karbidopa oli potilaalla säännöllisenä lääkkeenä, mutta esitietojen mukaan karbidopan käyttö oli ollut ilmeisesti epä säännöllistä. Muita allergiatutkimuksia ei potilaalle suoritettu ja allergia jäi epäselväksi.

Nikkeli-allergian yhteydessä LST ei vaikuttanut olevan hyödyllinen. Nikkeli-allergian diagnostiikkaan käytetään rutiinisti epikutaanikoetta, joka oli jokaisen viiden tutkimuspotilaan kohdalla positiivinen. LST oli positiivinen vain yhdessä tapauksessa, muissa negatiivinen. Lisäksi LST on epikutaanikoetta työläämpi suorittaa. Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että LST ei tuo lisäinformaatiota nikkeli-allergian diagnostiikkaan.

Lisäksi LST oli suoritettu kahdelle potilaalle, joilla epäiltiin allergiaa ohralle ja vehnälle. Ensimmäisessä tapauksessa LST:n tulokset olivat suoraviivaisia muiden tulosten kanssa. Toisessa tapauksessa allergian aiheuttajaksi epäiltiin muitakin aiheuttajia kuin viljoja. Epikutaanikokeen tulos ohralle oli yhtenevä LST:n kanssa. Tuloksista ei kuitenkaan voida tehdä johtopäätöksiä LST:n käyttökelpoisuudesta kotimaisten viljojen yhteydessä, koska aineisto oli hyvin pieni.

6 YHTEENVETO

Beetalaktaameille (kefaleksiinille ja bentsyyli- ja fenoksimetyylipenisilliinille) saatiin lymfosyyttistimulaatiotestillä hyviä tuloksia. Tulosten arviointia helpotti se, että altistus ja muita allergiatestejä oli tehty ja toistojen määrä ei rajoittunut ainoastaan yhteen tai kahteen tapaukseen. Aineiston koko jäi kuitenkin niin pieneksi, että tuloksista ei voida tehdä laajempia johtopäätöksiä. Yksittäisissä tapauksissa myös sulfasalatsiinin, valproiinihapon ja asetyylisalisylihapon yhteydessä saatiin yhteneviä tuloksia LST:n ja altistuksen välillä. Nikkeli-allergian diagnostiikkaan LST ei vaikuttaisi sopivan tämän aineiston viiden potilaan tulosten pohjalta.

Aineiston koon suurentaminen, esitietojen tarkentaminen, testiajankohdan vakiointi ja mahdollisuuksien mukaan allergian varmistaminen tai poissulkeminen lääkealtistuksella antaisi lisäinformaatiota lymfosyyttistimulaatitestiä koskevaan tutkimukseen. Myös muut allergiatestit, kuten Prick- ja epikutaanikoheet ja spesifisen IgE:n määrittäminen, tulisi suorittaa tutkimuspotilaille rutiinisti. Toisaalta LST mittaa viivästyneitä allergioita, kun Prick-testit ja IgE mittaavat välittömiä reaktioita, joten voikin odottaa erilaisia tuloksia näiden välillä. Tässä tutkimuksessa hyvin suurelle osalle potilaista altistusta ei tehty, joten allergia-epäily jäi lopulta varmistamatta. Myös muiden tehtyjen allergiatestien määrä ja jakauma potilaiden välillä oli hyvin vaihteleva. Kuitenkin on otettava huomioon, että käytännössä allergiatestien tekoon vaikuttaa mm. potilaiden oma halukkuus osallistua tutkimuksiin ja osastolla tehtävän lääkealtistuksen kohdalla myös osaston potilastilanne.

Lymfosyyttistimulaatiotesti on hyvä diagnostiikan apuväline, jos potilaan ihoreaktio on ollut vaikea ja tämän vuoksi altistusta ei ole voitu toteuttaa. Jos epäiltyjä lääkkeitä on useita, LST voi auttaa oikean lääkkeen jäljille ja sillä on siten painoarvoa diagnostiikassa. Negatiivisella testituloksella ei kuitenkaan voida poissulkea allergiaa. Yksi mahdollisuus voisi olla käyttää LST-analyysissä maksasoluviljelymallia, jolloin voidaan tutkia ainakin teoriassa lääkkeiden metaboliittien mahdollisia allergisia reaktioita ja siten ”oikeita” allergioita. Kaiken kaikkiaan lääkeallergian diagnoosin tulee perustua sekä tarkkoihin esitietoihin että suoritettuihin allergiatutkimuksiin. Yksittäiselle lääkeaineelle allergiat ovat harvinaisia. Lisää systemaattista tutkimusta tarvittaisiin, jotta lymfosyyttistimulaatiotestin luotettavuus lääkeaineallergian diagnostiikassa voitaisiin varmentaa.

7 LÄHDELUETTELO

- Alanko K. Lääkeainealtistus. Kirjassa: Hannuksela M, Peltonen S, Reunala T, Suhonen R toim. Ihotaudit, 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2011, s. 100.
- Alanko K. Taudinkuvat. Kirjassa: Hannuksela M, Peltonen S, Reunala T, Suhonen R toim. Ihotaudit, 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2011, s. 96–9.
- Beaven MA: Radioenzymatic Assays in Biological Fluids. Kirjassa: Uvnäs B, toim. Histamine and Histamine Antagonists. Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 97. Berlin, Heidelberg: Spinger-Verlag, 1991, s. 39.
- Brooks GD, Bush RK. RAST inhibition assay. Kirjassa: Grammer L C, Greenberger P A, toim. Patterson's Allergic Diseases, 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2009, s. 78.
- Caron GA, Sarkany I. Lymphoblast transformation in sulphamide sensitivity. Br J Dermatol 1965;77:556–60.
- Centner J, de Weck AL. The four basic types of immuno-allergic reactions. Kirjassa: Atlas of Immuno-Allergology. An Illustrated Primer for Health Care Professionals. 3rd edition. Seattle: Hogerete & Huber Publishers, 1995, s. 75–87.
- Granus G. Determination by High-Performance Liquid Chromatography. Kirjassa: Uvnäs B, toim. Histamine and Histamine Antagonists. Handbook of Experimental Pharmacology, Volume 97. Berlin, Heidelberg: Spinger-Verlag, 1991, s. 49–58.
- Granus G, Wass U. Urinary excretion of histamine, methylhistamine (1-MeHi) and methylimidazoleacetic acid (MelmAA) in mastocytosis: comparison of new HPLC method with other present methods. Agents actions, 1984;14:314–45.
- Haahtela T, Hannuksela M, Terho EO. Ihon testit. Kirjassa: Haahtela T, Hannuksela M, Terho E O toim. Allergologia, 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 1999, s. 107–17.
- Haahtela T, Hannuksela M. Lääkeyliherkkyyden tutkimukset. Allergia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. (päivitetty 20.11.2009)
www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti/%5C%5Cwww.ktl.fi/http://www.duodecim.fi/%5C%5Cwww.sci.utu.fi/aerobiologia/http://www.ktl.fi/tk.koti?p_artikkeli=alg00257&p_teos=dlk&p_osio=&p_selaus=8025
- Halonen T. Kromatografisten menetelmien periaatteet. Kirjassa: Penttilä I, toim. Kliiniset laboratoriotutkimukset, 1. painos. Helsinki: WSOY, 2004, s. 100–6.
- Harsing L G Jr, Nagashima H, Duncalf D, Vizi E S, Goldiner P L. Determination of histamine concentrations in plasma by liquid chromatography/electrochemistry. Clin Chem 1986;32:1823–27.
- Harvima I. Lääkeainehottumat. Luentomateriaali, iho- ja sukupuolitautilien opintojakso. Kuopio, Itä-Suomen yliopisto, 28.8.2014.
- Harvima R. Histamine radio enzyme assay. Väitöskirja. Kuopion yliopisto 1989.
- Harvima RJ, Neittaanmäki H, Harvima IT, Kajander EO, Fräki JE (1984a) Histamine N-methyltransferase preparation used for histamine assay contains endogenous histamine. Clin Chim Acta 1984;143:337-41.

- Harvima RJ, Kajander EO, Harvima IT, Fraki JE (1984b) Purification and partial characterization of rat kidney histamine-N-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1985:841:42-9.
- Holland P, Mauer AM. Drug-induced in-vitro stimulation of peripheral lymphocytes. *Lancet* 1964:1(7347):1368-9.
- Houdi AA, Crooks PA, van Loon GR, Schubert CA. A simple and sensitive determination of histamine and N-tau-methylhistamine in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Pharm Sci* 1987;76:389-401.
- IBL Immuno-Biological Laboratories GmbH. Histamine Release in Heparinized Whole Blood. Instructions for the Supplementary Kit. Hamburg, 1999. (luettu 23.4.2015) www.idsplc.com/z_includes/z_assets/asset_file.php?id=7619
- Kalekivi J. Neljän *Lactobacillus amylovorus* –kannan probioottisten ominaisuuksien testaaminen. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu, 2012. (luettu 25.5.2015) www.theseus.fi/xmlui/bitstream/handle/10024/49860/kalekivi.pdf?sequence=1
- Jaarinen S, Niiranen J. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia. Kirjassa: Jaarinen S, Niiranen J, toim. Laboratorion analyysitekniikka, 5. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy, 2005, s. 153-4.
- Kramer DK. Radioimmunoassay (RIA). Atlanta, USA: antibodies-online Inc., 2013. (luettu 24.4.2015) www.antibodies-online.com/resources/17/1215/Radioimmunoassay+RIA/
- Kukkonen A, Pelkonen A, Mäkinen-Kiljunen S, Mäkelä M. Komponenttitutkimukset parantavat allergioiden diagnostiikkaa. *Suom Lääkäril 7/2015 vsk 70*, s. 407-11.
- Mandakolathur R. Murali. RAST inhibition test. Kirjassa: Kaliner M A, Frieri M, Kettelhut B, toim. *Clinical Allergy and Immunology. Food Hypersensitivity and Adverse Reactions. A Practical Guide for Diagnosis and Management*. New York, Marcel Dekker, 1999, s. 403.
- Mine K, Jacobson KA, Kirk KL, Kitajima Y, Linnoila M. Simultaneous determination of histamine and N-tau-methylhistamine with high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Anal Biochem*. 1986;152:127-35.
- Nyfelner B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 1997;27:175-81.
- Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004;59:809-20.
- Oishi R, Nishibori M, Saeki K. Regional differences in the turnover of neuronal histamine in the rat brain. *Life Sci*. 1984;34:691-99.
- Radioimmunoassay (RIA). Medical Discoveries. Advameg Inc. www.discoveriesinmedicine.com/Ni-Ra/Radioimmunoassay-RIA.html
- Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Ruoka-allergiat (päivitetty 11.11.2014). www.thl.fi/fi/web/elintavat-ja-ravitsemus/ravitsemus/ravitsemus-ja-terveys/ruoka-allergiat
- Räsänen L, Tuomi M-L, Lahtela J, Knip M. Herkistymisen protamiinia sisältäville insuliinivalmisteille. *Duodecim* 1995;111:914.

Savolainen J, Viander M, Terho E O, Hannuksela M. Immunologisen kudosaaurion mekanismit. Kirjassa: Haahtela T, Hannuksela M, Terho E O toim. Allergologia, 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 1999, s. 51–5.

Snyder SH, Baldessarini RJ, Axelrod J. A sensitive and specific enzymatic isotopic assay for tissue histamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1966;153(3):544–9.

Solensky R. Hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;24(3):201–20.

synlab Finland Oy. Molekyyliallergologia eli allergeenikomponentti-IgE-vasta-aineet ja niiden kliininen merkitys. Allergiatutkimukset. Laboratoriokäsikirja. (luettu 23.4.2015) www.synlab.fi/laboratoriokasikirja/tuotekuvaukset/allergiatutkimukset/molekyylialler/

synlab Finland Oy. Yksittäiset spesifiset IgE-tutkimukset (3836 S -AllIgE). Allergiatutkimukset. Laboratoriokäsikirja. (luettu 23.4.2015) http://synlab-fi.sn11.zone.eu/?page_id=5495

Thermo Fisher Scientific Inc. ImmunoCAP Specific IgE. Tuottaja: Phadia AB, Uppsala, Sweden. (luettu 23.4.2015) www.phadia.com/en-GB/5/Products/ImmunoCAP-Assays/1/

Tsuruta Y, Kohashi K, Ohkura Y. Simultaneous determination of histamine and N-tau-methylhistamine in human urine and rat brain by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1981;224:105–10.

Walker C, Kristensen F, Bettens F, deWeck AL. Lymphokine regulation of activated (G1)lymphocytes: I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J Immunol* 1983;130:1770–1773.

Weller R, Hunter J, Savin J, Dahl M. Drug eruptions. Kirjassa: *Clinical Dermatology*, 4th edition. Blackwell Publishing, 2008, s. 356–7.

Yamatodani A, Hiroshi F, Hiroshi W. High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples: cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry. *J Chromatogr* 1985;344:115–23.

8 LIITTEET

Liite 1. Lymfosyyttistimulaatiotesti lääkeaineelle, laboratorio-ohje (1/2)

Näyte

3 x 9 ml laskimoverta verinäyteputkeen jossa hepariinia.

Reagenssit ja tarvikkeet

Ficoll Paque, cat. no. 17144002, GE Helthcare

RPMI 1640 kasvatusmediumi, cat. no.31870025, Gibco

Antibiotic-Antomycotic, cat. no.15240-062, Gibco

200 µM L-glutamiini, cat. no.25030-024, Gibco

Heparin-Natrium 5000 I.E/ 0,2 ml, cat. no. 5394.00.00, Ratiopharm GmbH

D-PBS, cat. no. BE17-512F, Lonza

Steriili aqua, B/Braun

Kristallivioletti, cat. no. C-3886, Sigma

väkevä etikkahappo, cat. no. 45731, Fluka

verinäyteputket, 9 ml LH lithium heparin putki, cat. no. 455084, Vacuette

25 ml kirkkaat sentrifuugimuoviputket, 364238, Universalcont

Methyl-³H-Thymidine, cat. no. NET 027Z, Perkin Elmer

Ultima Gold tuikeliuos, cat. no. 6013326, Perkin Elmer

Testattavat lääkeaineet puhtasaineina, esim. Sigma ja Fluka

muut lääkeaineet, joita ei ole saatavilla puhtasaineena, esim. Kys apteekki

steriilit muoviputket 15 ml, cat. no.352096 ja 50 ml cat. no.352070, BD Falcon

1,5 ml Eppendorf-putket, cat. no. 72.690.001, Sarsted

96 tasapohjakuoppalevy, yksittäispakatut, steriilit, cat. no.167008, Nunc

erikokoisia ruiskuja, BD Discardit

Millex-GV-kertakäyttösuodattimet 0,22 µm, cat. no. SLGVO33RS, Millex GV

muoviset 3 ml:n pasteuripipetit, tippakoko 50 µm, cat. no. VWR1612-2850, VWR International

steriilit kertakäyttöpipetit 5 ml, cat. no. 159625 ja 10 ml, cat. no. 159633, Falcon

Filteripaperi, W/ Binding, cat. no. 11738, PLD-Finland

Liite 1. Lymfosyyttistimulaatiotesti lääkeaineelle, laboratorio-ohje (2/2)**Välineet ja laitteet**

analyysivaaka, Sartorius

laminaarivirtauskaappi, Kojair

erikokoisia pipettejä välille 5 µl – 1000 µl, Thermo Scientific, Labsystems

kertakäytökärkiä edellisiin pipetteihin, Thermo Scientific, Labsystems

Bürker-laskukammio, Assistent, Tamro

mikroskooppi, Olympus

sentrifuugi, Megafuge 1.0, Hereus

pipettori, Pipetboy acu, Integra Biociences

hiilidioksidi-inkubaattori, Binder

soluharvesteri, Skatron, PLD-Finland

nestetuikelaskuri, Winspectral 1414, Wallac Oy

Liite 2. Lymfosyyttistimulaation suorittaminen laboratoriossa (1/2)

Esivalmistelut

- RPMI:hin lisätään antibiootti-antimykootti ja glutamiini siten, että molempia on 1 % RPMI:n tilavuudesta
- liuokset tai tarvikkeet, jotka joutuvat viljeltyjen solujen kanssa tekemisiin, steriloidaan, jos eivät ole alunperin steriilejä
- muovitavara steriloidaan höyrysterilointiohjelmalla
- antigeeneista tehdään RPMI:hin kantaliuoksia, jotka suodatinsteriloidaan ja säilytetään -20 °C:ssa
- solujen laskua varten kristalliviolettiliuos (100 mg kristalliviolettiä, 3 ml väkevää etikkahappoa, 100 ml vettä)
- hepariini-RPMI (hepariinin lopullinen pitoisuus 50 U/ml)
- tritioitu tymidiini laimennetaan RPMI:hin siten että pitoisuudeksi tulee 5 µCi/ml

Tutkimuksen suorittaminen

- verinäyteputket tyhjenetään 50 ml:n putkeen ja yhtä paljon päälle hepariini-RPMI:tä, sekoitetaan varovasti
- 30 ml:n putkiin n. 10 ml Ficoll-Paque'ia ja päälle 10 ml puoleen laimennettua verta kertakäyttöpasteurpipetillä niin, että kerrokset eivät sekoitu toisiinsa
- sentrifugointi 10 min 1000 x g, jolloin erottuvat plasmakerros, pääasiassa lymfosyyttejä sisältävä kerros Ficoll-Paque'n päällä, FicoII-Paque-kerros ja sen alla punasolu-granulosyyttikerros
- pasteurpipetillä plasmakerros talteen 30 ml:n putkeen ja samalla pipetillä lymfosyyttirikas-kerros talteen 30 ml:n putkeen
- solujen päälle pesuliuosta (RPMI tai PBS) n. 10 ml ja sentrifugointi 300 x g 10 min
- kaadetaan pesuliuos solujen päältä ja lisätään tarkasti 10 ml liuosta (RPMI tai PBS) steriilillä pipetillä käyttäen pipettoria
- sekoitus pasteurpipetillä ja solususpensiota 100 µl putkeen, jossa on 900 µl kristalliviolettiliuosta
- solujen lasku Bürker-kammiolla, vähintään 3 kenttää (kenttien keskiarvo jaettuna 10:llä ja kerrottuna solususpension tilavuudella millilitroina on solumäärä miljoonissa)
- sentrifugointi 10 min 200 x g
- pesuliuos kaadetaan pois, solujen päälle 40 % laimentunutta plasmata ja loput 60 % hepariini-RPMI:tä siten, että lopullinen solumäärä on miljoona solua/ml
- sekoitetaan pasteurpipetillä ja pipetoidaan 2 tippaa (100 µl)/kuoppalevyn kuoppa
- pyritään laittamaan 6 rinnakkaista kuoppaa ei-stimuloituihin kontrollikuoppiin ja 3 rinnakkaista antigeenilla stimuloituihin kuoppiin sekä tekemään 2 eri viljelyaikaa
- solujen päälle samoin 2 tippaa antigeenilaimennoksia RPMI:ssä ja 0-kuoppiin pelkkää RPMI:tä

Liite 2. Lymfosyyttistimulaation suorittaminen laboratoriossa (2/2)

Tutkimuksen suorittaminen (jatkuu)

- kuoppalevyn kanteen potilaan nimi, päivämäärä ja viljelyajat sekä kuoppalevyn pohjaan vielä potilaan
- työpäiväkirjaan myös henkilö- ja päivämäärätiedot sekä pipetointikaavio
- levyjä inkuboidaan hiilidioksidi-inkubaattorissa, hiilidioksidin pitoisuus 5 %
- vuorokausi ennen viljelyn loppumista lisätään solujen päälle tritioitua tymidiiniä 25 µl/kuoppa
- näytteet siirretään suodatinpaperikiekoille harvesterilla, joka imee rivin kerrallaan
- kiekot irrotetaan pinseteillä suodatinpaperista ja siirretään tuikeputkiin
- putkiin 3.5 ml tuikeluosta ja mittaus nestetuikelaskimella
- lasketaan rinnakkaisten keskiarvot ja stimulaatioindeksit = dpm stimuloidussa viljelmässä/dpm 0-viljelmässä
- stimulaatioindeksejä 2-3 pidetään positiivisena tuloksena

Muuta huomattavaa

- steriliteetistä huolehditaan käyttämällä steriilejä tarvikkeita ja elatusaineita, liekittämällä lasipullojen suut ja tekemällä solujen käsittely laminaarivirtauskaapissa
- inkubaattori puhdistetaan perusteellisesti kerran kuukaudessa

Liite 3. Tymidiini-inkorporaatio

Vuorokautta aikaisemmin ennen mittaamista soluille lisätään tritioitua tymidiiniä (stock 250 μCi , Perkin Elmer, NET 027Z250UC) joka on laimennettu solujen kasvatusmediumiin (RPMI) pitoisuuteen 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Tätä lisätään soluviljelmään 25 μl / 200 μl mediumia. Annetaan imeytyä solun tumaan 20 tuntia \pm 1 tunti. Pestään ylimääräinen radioaktiivisuus pois soluharvesterilla (Skatron Instrument) joka siirtää radioaktiiviset solut suodatinpaperille (FilterMAT, Skatron, 11731). Irroitetaan laitteen tekemät suodatinpaperikiekot joissa solut ja siirretään ne 0,5 ml Eppendorf-putkiin. Lisätään päälle tuikenestettä (Ultima Gold, Perkin Elmer, cat. no. 6013329) jokaiseen putkeen 1 ml. Mitataan nestetuikelaskurilla (Perkin Elmer) CPM1 (counts per minute) 15 min/ näyte. Vaimennuskuvaajasta (quench curve) cpm-arvot muutetaan DPM-arvoiksi (disintegrations per minute).

Liite 4. Tutkimustulokset ryhmälle 1

TAULUKKO 2. Tutkimustulokset ryhmälle 1 ajalla 6.8.1998 - 9.1.2002.

Lääkeaineen geneerinen nimi	n	Diagnoosi/Kliininen kuva	Lymfosityytti-stimulaatio	Epikutaanikoe	Prick-koe	Altistus	Allergia testiaineelle
Kulta-natriumtiosulfaatti	4						
		L30.9 Dermatitis NUD (kulta-dermatiitti-epäily)	posit.	neg.	nd	nd	epäselvä
		Ei mainintaa	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
		L20.9 Constitutio atopica susp; Eczema psoriasiformis; St post eczema universalis	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
		Kultainjektioon liittyen flush-oire ja anafylaksian tapainen voimakas kohtaus	posit.	nd	Myocrisin (Na-Au-tiomalaatti) neg.	nd	epäselvä
Natrium-aurotiomalaatti	4						
		L27.0 Eruptio cutanea generalisata medicamentis (Myocrisin)	neg.	nd	nd	Au-Na-tiosulfaatti posit.	varmistettu
		L27.0 Y45 Reactio lichenoides et stomatitis ulcerativa (Myocrisin)	neg.	neg.	nd	posit.	varmistettu
		L30.9 Dermatitis NUD (kulta-dermatiitti-epäily)	neg.	neg.	nd	nd	epäselvä
		Kultainjektioon liittyen flush-oire ja anafylaksian tapainen voimakas kohtaus	neg.	nd	Myocrisin neg.	nd	epäselvä
Fenytoiini	1						
		L50.8 Urticaria	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
Hydroklooritiatsidi	1						
		L30.9 Erythrodermia NAS	epävarma	nd	nd	nd	epäselvä
Hydroksiklorokiini	1						
		L30.9 Dermatitis levis	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
Ihmisinsuliini, sis. protamiinia	1						
kts. myös protamiini		Urtikariapaukamointi pistoskohdassa	posit. (Humulin NPH)	nd	Novon insuliinitestisarja prick: neg.; Humulin prick as is; neg., Humulin ic-testi neg.	nd	epäselvä
Ihmisinsuliini, ei sis.	1						

protamiinia							
		Urtikariapaukamointi pistoskohdassa	neg. (Actrapid)	nd	Prick (Protaphan, Actrapid, Humutard): neg.; RAST (ihmisinsuliini): neg., ic-testi: neg.	nd	epäselvä
Karbamatsepiini	1						
		R21 Exanthema pustulosus acuta generalisata susp.	neg.	neg.	nd	nd	epäselvä
Karbidopa	1						
		L30.9 Erythrodermia NAS	posit.	nd	nd	nd	epäselvä
Klodronaatti	1						
		Diffuusi erythroderminen dermatiitti (L30.9 Dermatitis chronica NAS)	neg.	neg.	nd	nd	epäselvä
Lisproinsuliini	1						
		Urtikariapaukamointi pistoskohdassa	neg.	nd	ic-testi: neg., Novon insuliinitestisarja-Prick neg.; Humalog prick as is; neg.	nd	epäselvä
Nabumetoni	1						
		L51.1 Syndroma Stevens-Johnson	posit.	neg.	nd	nd	epäselvä
Nimesulidi	1						
		L30.9 Dermatitis levis	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
Simvastatiini	1						
		L26 Erythrodermia NAS	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
Sulfapyridiini	1						
		L30.3 Eczema infectiosum	epävarma	nd	nd	nd	epäselvä
Sulfasalatsiini	1						
		L30.3 Eczema infectiosum	neg.	neg.	nd	neg.	poissuljettu
Okskarbamatsiini	1						
		L50.8 Urticaria	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
Protamiini	1						
		Urtikariapaukamointi pistoskohdassa	posit.	nd	RAST: neg., ic-testi: epävarma posit.	nd	epäselvä
Valproiinihappo	1						
		L50.8 Urticaria	neg.	nd	nd	neg.	poissuljettu
5-aminosalisyli-happo	1						
		L30.3 Eczema infectiosum	neg.	nd	nd	nd	epäselvä

n = tehtyjen lymfositestien määrä; neg. = negatiivinen; nd = not done (ei tehty); posit. = positiivinen

Liite 5. Tutkimustulokset ryhmälle 2

TAULUKKO 6. Tutkimustulokset ryhmälle 2 ajalla 7.10.2008 – 11.12.2013.

Lääkeaineen geneerinen nimi	n	Diagnoosi/Kliininen kuva	Lymfosyytti-stimulaatio	IgE (RAST)	Prick/ic-testi	Altistus	Allergia testiaineelle
kefaleksiini	7						
		Pieniläiskäinen kutiseva ihottuma käsivarsissa	epävarma	nd	neg.	neg.	poissuljettu
		L27.0 Exanthema medicamentosum susp.	neg.	nd	nd	neg.	poissuljettu
		L50.9 Urtikaria susp.	neg.	nd	neg.	neg.	poissuljettu
		L50.8 St. post urticaria recidivans	neg.	nd	neg.	neg.	poissuljettu
		L27.1# Erythema fixum	neg.	nd	neg.	neg.	poissuljettu
		L50.9 Urtikaria susp.	neg.	G- ja V-Pen neg.	neg.	neg.	poissuljettu
		L30.9 Status post dermatitis (syndroma Steven Johnson susp)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
amoksisilliini	4						
		L50.9 Urtikaria susp.	neg.	nd	neg.	nd	epäselvä
		L27.0 Exanthema ex usu amoxicillin	neg.	amoksisilliini neg.	neg.	posit.	varmistettu
		L30.9 Dermatitis pustulosa	neg.	G- ja V-Pen neg, amoksisilliini neg.	neg., G-Penil-ic-testi: neg.	nd	epäselvä
		L27.0 Exanthema medicamentosum (amoksisilliini)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
fenoksimetyylipenisilliini	4						
		L27.1# Erythema fixum	neg.	G- ja V-Pen neg.	neg.	neg.	poissuljettu
		L50.8 St. post urticaria recidivans	neg.	G- ja V-Pen neg.	neg.	neg.	poissuljettu
		L30.9 Määrittämätön dermatiitti	neg.	G- ja V-Pen neg.	neg., ic-koe: epävarma positiivinen	neg.	poissuljettu
		Ei mainintaa	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
bentsyylipenisilliini	3						
		L30.9 Dermatitis regio colli cum purpura	epävarma	G- ja V-Pen neg.	neg.	V-Pen neg.	poissuljettu

		L30.9 Exanthema medicamentosa susp.	neg.	G- ja V-Pen neg.	nd	V-Pen neg.	poissuljettu
		Eksanteematyypinen punoittava leihahdus	neg.	G- ja V-Pen neg.	neg., ic-koe neg.	neg.	poissuljettu
hydroksiklorokiini	2						
		L51.5 Erythema multiforme bullosa	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
		L30.9 Dermatitis NAS (Erythema multiforme susp., Dermatitis psoriasiformis susp)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
klindamysiini	2						
		R21 Exanthema NAS (Dalacin)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
		L30.9 Exanthema urticarielli formis ex usu medicamentosa suspecta	neg.	nd	nd	posit.	varmistettu
asetyyლისისყილი	1						
		Punaläikkäinen ihottuma, jalkaturvotus	neg.	nd	nd	neg.	poissuljettu
asikloviiri	1						
		L30.9 Dermatitis NAS; erythema fixum susp.	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
doksorubisiini	1						
		L51.2 Necrolysis epidermalis toxica (st.p. Caelyx) L27.0 Exanthema NAS (medicamentosa susp)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
ketiapiini	1						
		L30.9 Dermatitis NAS (exanthema medicamentosum susp.)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
metotreksaatti	1						
		L30.9 Dermatitis NAS (reactio medicamentosa susp., Myocrisin/metotreksaatti)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
natrium-aurotiosulfaatti	1						
		L30.9 Dermatitis NAS (reactio medicamentosa susp., Myocrisin/metotreksaatti)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
parasetamolisulfaatti	1						
		L51.9 Erythema multiforme	neg.	nd	nd	nd	epäselvä

risperidoni	1						
		L30.9 Dermatitis NAS (exantema medicamentosum susp.)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
sulfadiatsiini	1						
		L30.9 Erythrodermia NAS (reactio allergica susp. ex usu Ditrin duplo)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
terbinafiini	1						
		L27.0 Lääkeaineen aiheuttama yleistynyt ihoreaktio susp. (erythema multiforme susp.)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
trimetopriimi	1						
		L30.9 Erythrodermia NAS (reactio allergica susp. ex usu Ditrin duplo)	neg.	nd	nd	nd	epäselvä
valasikloviiri	1						
		L30.9 Dermatitis NAS; erythema fixum susp.	neg.	nd	nd; Epikutaanitesti: neg.	posit.	varmistettu

n = tehtyjen lymfosyyttistimulaatiotestien määrä; neg. = negatiivinen; nd = not done (ei tehty); posit. = positiivinen