



Diagnostic biologique des toxidermies In vitro diagnosis of delayed drug allergies

A. Rozieres^{a,c,*}, A. Hennino^a, K. Rodet^{a,c}, M.C. Gutowski^c, F. Berard^{a,b},
G. Cozon^c, J. Bienvenu^c, J.F. Nicolas^{a,b}

^aINSERM U851, IFR 128, 69375 Lyon cedex 07, France

^bUF immunoallergologie clinique, centre hospitalier Lyon Sud, France

^cLaboratoire d'immunologie, centre hospitalier Lyon Sud, France

Résumé

Les réactions d'allergie retardée aux pénicillines sont fréquentes et sont associées à la présence de LT spécifiques du médicament dans le sang circulant. Le diagnostic de l'hypersensibilité retardée aux médicaments repose essentiellement sur la démonstration de la présence de ces LT dans la peau et le sang. Le diagnostic de l'allergie retardée se fondait jusqu'ici sur une analyse in vitro, de la prolifération cellulaire par le test de transformation lymphocytaire (LTT), basé sur la prolifération des PBMCs en réponse aux médicaments. Dans cette étude, nous avons analysé la fréquence des LT spécifiques d'amoxicilline chez 22 patients allergiques à l'amoxicilline par *enzyme-linked immunospot* (ELISPOT) IFN- γ . Vingt sur 22 patients testés ont eu un nombre significatif des cellules T spécifiques d'amoxicilline sécrétrices d'IFN- γ , aucune cellule spécifique n'a été mise en évidence chez les 46 sujets témoins. De plus, l'analyse des LT spécifiques du médicament chez un sujet allergique à la ticarcilline montre la présence de LT sécrétrices d'IFN- γ suite à la restimulation par la ticarcilline ainsi qu'à d'autres β -lactamines suggérant ainsi que l'ELISPOT IFN- γ est capable de détecter les réactivités croisées entre différentes molécules chimiques. En conclusion, le TTT apparaît moins sensible que l'ELISPOT pour la détection des LT spécifiques d'amoxicilline ainsi que pour l'identification des réactivités croisées. Ces données montrent que l'ELISPOT IFN- γ est une nouvelle méthode qui permet d'améliorer le diagnostic de l'allergie aux β -lactames et peut aider au choix d'un traitement antibiotique alternatif.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Allergic reactions to penicillin/-lactam antibiotics are associated with the presence of circulating drug specific T cells. Diagnosis of delayed drug allergy so far relies on an in vitro assay, the lymphocyte transformation test (LTT), based on the proliferation of PBMC in response to the drug. In the present study, we analyzed the frequency of circulating drug-specific T cells in 22 amoxicillin allergic patients using the highly sensitive IFN- γ -ELISPOT assay. Twenty out of 22 patients tested had significant numbers of amoxicillin-specific IFN- γ -producing T cells in blood. Amox-specific IFN- γ -producing T cells were undetectable in 46 control patients including 15 patients with IgE-mediated allergy to amoxicillin, in 11 patients with a history of drug-induced MPE but tolerant to amoxicillin and in 20 normal individuals. Furthermore, analysis of drug-specific T cells in one patient allergic to ticarcillin (a penicillin antibiotic different from amoxicillin) revealed the presence of IFN- γ -producing T cells reactive to ticarcillin and several other -lactam antibiotics, suggesting that the IFN- γ -ELISPOT assay is able to detect T cell cross-reactivity against chemically related drugs. Finally, LTT appeared less sensitive than the ELISPOT assay, both for detection of amoxicillin-specific T cells in allergic patient and for identification of potential cross-reactivities to various -lactams. These findings demonstrate that drug-specific IFN- γ ELISPOT assay represents a novel sensitive assay that may serve to improve diagnosis of -lactam allergy and may help to adapt alternative antibiotic treatment.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Toxidermies ; Allergie aux pénicillines ; Hypersensibilité retardée ; Exanthème maculo-papuleux

Keywords: Allergic reactions to penicillin; Delayed hypersensitivity; Maculo-papular exanthema

1. Introduction

Les réactions d'allergie aux médicaments sont fréquentes.
Les réactions retardées appelées hypersensibilité retardée

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : rozieres@cervi-lyon.inserm.fr (A. Rozieres).

(HSR) sont dues à la présence de LT spécifiques du médicament [1]. L'expression clinique de ces réactions peut être variable allant des réactions d'exanthème maculo-papuleux (EMP) qui sont les plus fréquentes à des réactions moins fréquentes comme le syndrome DRESS ou le syndrome de Lyell. L'implication des LT dans le développement de ces réactions a bien été démontrée avec la présence de LT spécifiques du médicament dans le sang et la peau des patients [2–4].

Le diagnostic de l'hypersensibilité retardé aux médicaments repose essentiellement sur la démonstration de la présence de ces LT dans la peau et le sang. La réalisation de tests cutanés permet de reproduire la lésion cutanée sur le site d'application du médicament [5–7]. L'existence d'un test biologique pour le diagnostic de l'allergie retardée permettrait un accès à un bilan plus facile pour les patients et sans risque de sensibilisation vis-à-vis des molécules médicamenteuses. La détection in vitro des LT spécifiques du médicament est classiquement réalisée par l'utilisation du suivi de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée ou par le dosage de la sécrétion de cytokines par des méthodes ELISA [8,9].

Le *enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay* est une méthode décrite en 1998 pour la quantification de la sécrétion de cytokines notamment IFN- γ au niveau cellulaire [10,11]. L'IFN- γ est une cytokine clé du développement des réactions d'HSR aux médicaments s'exprimant par des manifestations cutanées. Le but de ce travail est d'étudier l'intérêt de l'ELISPOT dans la détection des LT spécifiques chez des patients allergiques. Notre modèle d'étude est l'allergie à l'amoxicilline.

2. Matériels et méthodes

2.1. Patients

Quarante-cinq patients ont été inclus dans cette étude. Les patients ont été classés en trois groupes :

Groupe A (amox-HSR) comprenant 22 patients ayant développé une toxidermie érythémateuse à l'amoxicilline avec une histoire clinique évocatrice et des patch-tests positifs à l'amoxicilline et négatifs au ceftriaxone.

Groupe B (amox-tolérant) comprenant 11 patients tolérant l'amoxicilline avec des patch-tests pour l'amoxicilline et le ceftriaxone négatifs.

Groupe C (amox-HSI) comprenant 15 patients avec une hypersensibilité immédiate à l'amoxicilline, des *prick* et IDR à lecture immédiate positifs mais des patch-tests et IDR à lecture retardée négatifs.

2.2. Patch-tests

Des tests cutanés ont été réalisés pour faire la preuve de la responsabilité de l'amoxicilline. Le ceftriaxone a été utilisé comme antibiotique contrôle dans les patch-tests et les tests biologiques (ELISPOT et LTT).

2.3. Test ELISPOT IFN- γ

Les PBMCs ont été extraits du sang périphérique de patients par gradient de Ficoll et des ELISPOT IFN- γ ont été réalisés après restimulation des cellules avec le médicament (amoxicilline) ou le médicament contrôle (ceftriaxone).

2.4. Lymphocyte transformation test (LTT)

Le suivi de la réponse proliférative en réponse à l'amoxicilline ou au ceftriaxone sur les PBMCs des patients a été réalisé par ajout de thymidine tritiée après cinq jours de culture.

3. Résultats-discussion

La production non spécifique d'IFN- γ à la suite de la restimulation des PBMCs par l'amoxicilline a été analysée sur un groupe de 20 sujets sains non allergique aux médicaments, ce qui nous a permis de déterminer le bruit de fond du test ELISPOT qui correspond au seuil de positivité (30 spots/10⁶ PBMCs). Pour les 22 patients du groupe A ayant une allergie retardée à l'amoxicilline, la fréquence des LT spécifiques déterminée par la technique ELISPOT est comprise entre 20 et 130/10⁶ PBMCs (moyenne : 60 spots). Vingt des vingt-deux patients (91 %) ont un test ELISPOT IFN- γ positifs avec des valeurs supérieures au seuil de positivité de 30. Trois de ces patients présentent une faible réponse à notre antibiotique contrôle, le ceftriaxone, avec une fréquence comprise entre 28 et 30/10⁶. Ces résultats nous permettent de déterminer une sensibilité et une spécificité respectivement de 91 [79–100 %] et 95 % [82–98 %]. Avec le TTL, 15 des 22 patients ayant une HSR à l'amoxicilline ont un test positif (index de stimulation supérieur à 2,5). Aucun des patients ne réagit avec l'antibiotique contrôle. Le TTL est négatif pour les 11 patients du groupe B tolérant l'amoxicilline. Par contre, quatre des 15 patients du groupe C ayant une HSI à l'amoxicilline présentent une réponse proliférative faible. Ces résultats nous permettent de déterminer une sensibilité de 68 % et une spécificité de 85 %. L'analyse de la corrélation entre les résultats de l'ELISPOT et du TTL montre que les patients ayant un TTL élevé sont les patients pour lesquels la plus forte fréquence de LT sécréteurs d'IFN- γ a été retrouvée avec un coefficient de corrélation de 0,54 ($p < 0,05$).

4. Conclusion

Les résultats du TTL dans notre étude confirment qu'il permet de détecter chez les patients allergiques les LT spécifiques d'amoxicilline, avec une sensibilité de l'ordre de 70 % ce qui corrèle parfaitement avec les données de la littérature [12]. L'ELISPOT IFN- γ permet la détection et la quantification des LT spécifiques d'amoxicilline dans le sang périphérique des patients ayant une HSR avec une sensibilité meilleure que le TTL (91 %). De plus, l'intérêt de cette technique réside dans sa simplicité de mise en oeuvre, le nombre important de molécules médicamenteuses pouvant être testées simultanément et la rapidité d'obtention des résultats. Si

ces résultats se confirment, l'ELISPOT IFN- γ aux médicaments pourrait faire partie de la batterie des tests in-vitro d'exploration des hypersensibilités retardées.

Références

- [1] Gerber BO, Pichler WJ. Cellular mechanisms of T cell mediated drug hypersensitivity. *Curr Opin Immunol* 2004;16:732–7.
- [2] Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N Engl J Med* 1994;331:1272–85.
- [3] Naisbitt DJ, Britschgi M, Wong G, Farrell J, Depta JP, Chadwick DW, et al. Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones. *Mol Pharmacol* 2003;63:732–41.
- [4] Beeler A, Engler O, Gerber BO, Pichler WJ. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:455–62.
- [5] Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler W, Demoly P. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002;57:45–51.
- [6] Hug K, Yawalkar N, Helbling A, Pichler WJ. Scratch-patch and patch testing in drug allergy-an assessment of specificity. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2003;13:12–9.
- [7] Torres MJ, Sanchez-Sabate E, Alvarez J, Mayorga C, Fernandez J, Padial A, et al. Skin test evaluation in nonimmediate allergic reactions to penicillins. *Allergy* 2004;59:219–24.
- [8] Romano A, Blanca M, Torres MJ, Bircher A, Aberer W, Brockow K, et al. Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy* 2004;59:1153–60.
- [9] Yoshimura T, Hamaguchi E, Usami E, Nakashima K, Kawaguchi M, Suzuki N, et al. Increased in vitro release of interferon-gamma from ampicillin-stimulated peripheral blood mononuclear cells in Stevens–Johnson syndrome. *Biol Pharm Bull* 2004;27:929–31.
- [10] Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988;110:29–36.
- [11] Schmitt A, Keilholz U, Bauer S, Kuhne U, Stevanovic S, Thiel E, et al. Application of the IFN-gamma ELISPOT assay to quantify T cell responses against proteins. *J Immunol Methods* 2001;247:17–24.
- [12] Nyfeler B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 1997;27:175–81.