

Teste de transformação linfocitária no estudo da hipersensibilidade a fármacos

Lymphocyte transformation test in drug hypersensitivity

Data de receção / Received in: 24/10/2016

Data de aceitação / Accepted for publication in: 20/12/2016

Rev Port Imunoalergologia 2017; 25 (3): 173-179

Sofia Farinha, Bárbara Cardoso, Regina Viseu, Elza Tomaz, Filipe Inácio

Serviço de Imunoalergologia, Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal

Prémio SPAIC-Diater 2016 (ex-aequo)

RESUMO

Fundamentos: O teste de transformação linfocitária (TTL) tem vindo a ser utilizado nas últimas décadas no estudo de reações alérgicas a fármacos. Baseia-se na deteção de uma resposta proliferativa das células T quando expostas ao fármaco suspeito e alguns grupos têm relatado uma sensibilidade e especificidade elevadas neste contexto. A sua validação necessita, contudo, de estudos mais alargados e melhor controlados. **Objetivos:** Avaliar o desempenho do TTL na identificação dos fármacos responsáveis por reações alérgicas e aferir os seus critérios de positividade, diferenciando os vários grupos farmacológicos e as reações observadas. **Métodos:** Foram avaliados os resultados de 95 testes de TTL, realizados em 73 doentes estudados por alergia medicamentosa e com um diagnóstico estabelecido com elevado grau de certeza pela clínica e testes cutâneos. Analisamos os resultados dos testes considerando os vários grupos de fármacos, as reações observadas e o tempo de demora entre a reação e a execução do TTL. **Resultados:** Os resultados analisados por grupos de fármacos evidenciaram sensibilidade / especificidade de 76,1 % / 57,1 % para os beta-lactâmicos, de 83,3 % / 55,5 % para os anti-inflamatórios não esteroides, de 88,9% / 100% para os anti-convulsivantes e de 46,1 % / 66,7 % para os antibióticos não beta-lactâmicos. **Conclusões:** A sensibilidade do TTL foi boa, exceto para os antibióticos não beta-lactâmicos. Os resultados não foram tão bons para a especificidade, baixa para os anti-inflamatórios não esteroides, o que era expectável, mas foi abaixo da descrita por outros grupos

para os antibióticos beta-lactâmicos. Apesar disso, o TTL evidenciou um poder discriminativo de 70,6 % e permitiu confirmar a alergia a um fármaco em 36 casos, 58,1 % dos casos de alergia da amostra, cujos testes cutâneos eram negativos ou impossíveis de realizar. Justifica-se, assim, a sua utilização no estudo da alergia a fármacos, ainda que não permitindo dispensar uma cuidada análise da história clínica e a execução de testes cutâneos.

Palavras-chave: Células T, hipersensibilidade a fármacos, teste de transformação linfocitária.

ABSTRACT

Background: The lymphocyte transformation test (LTT) has been used in the study of drug allergy for the last 3 decades. It bases on the detection of a proliferative T cell response in the presence of the drug to be tested and some groups present good results in identifying a culprit drug, sensitivity and specificity differing with the drug, the reaction and other factors. Validation of LTT depends, however, on larger and better controlled studies. **Aims:** To evaluate the LTT performance in identifying culprit drugs in allergic reactions and analyse positivity criteria regarding different pharmacological groups and observed reactions. **Methods:** We analysed the results of 95 LTT tests, performed in 73 patients submitted to a drug allergy evaluation who were diagnosed with a high level of certainty by clinic and skin tests. Drug classes, type of allergic reactions and time between those and test execution were taken into account. **Results:** Results by drug classes showed sensitivity/specificity of 76,1% / 57,1% for beta-lactams, 83,3% / 55,5% for non steroidal anti-inflammatory drugs, 88,9% / 100% for anticonvulsivants and 46,1% / 66,7% for non beta-lactam antibiotics. **Conclusions:** LTT sensitivity may be considered good, except for non beta-lactam antibiotics. As expected, specificity was low for non steroidal anti-inflammatory drugs, but was lower than generally described for beta-lactams. Nevertheless, LTT showed a discriminative power of 70,6% in this study and allowed to confirm a drug allergy diagnosis in 36 cases, 58,1% of allergy sample cases, where skin tests were negative or impossible to perform. So, its use in drug allergy is completely justified, although a careful clinical history and skin tests whenever possible must not be forgotten.

Keywords: Hypersensitivity drug reaction, lymphocyte transformation test, T cells.

INTRODUÇÃO

As reações de hipersensibilidade a fármacos (DHR) constituem 15 % de todas as reações adversas a fármacos, afetando mais de 7 % da população em geral, constituindo um grave problema de saúde pública¹. Estas podem ser alérgicas ou não alérgicas, sendo as DHR mediadas imunologicamente denominadas reações alérgicas a fármacos¹. São tipicamente imprevisíveis e podem ser fatais, implicando assim alterações de terapêutica. Os quadros clínicos das reações a fármacos po-

dem ser muito diversos: as reações imediatas podem manifestar-se como urticária, angioedema, conjuntivite, rinite, broncospasmo, sintomas gastrintestinais, choque anafilático; nas reações não imediatas surgem mais frequentemente os exantemas maculopapulares, mas também reações cutâneo-mucosas de vários tipos, com ou sem compromisso sistémico, ou ainda lesões de órgãos ou sistemas sem atingimento cutâneo. De notar que um mesmo fármaco pode levar a manifestações de hipersensibilidade diferentes, na dependência de diferentes mecanismos imunopatológicos. Um diagnóstico definitivo,

de forma a permitir opções terapêuticas medidas preventivas adequadas requer habitualmente um estudo completo de alergia a fármacos. No entanto, uma abordagem sistemática estandardizada para o diagnóstico e orientação das DHR é ainda um desafio.

O teste de transformação linfocitária (TTL) tem vindo a contribuir para uma melhor compreensão da hipersensibilidade a fármacos, tendo um elevado potencial diagnóstico nesta situação, dado basear-se na deteção de uma resposta proliferativa de células T usando como estímulo o fármaco suspeito, sabendo-se que esse tipo de resposta está presente em quase todas as reações alérgicas a fármacos, do tipo I ao tipo IV². Desempenha um papel particularmente importante no estudo das reações tardias graves, nomeadamente na síndrome Stevens-Johnson (SJS), necrólise epidérmica tóxica ou síndrome de Lyell e na *drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms* (DRESS), onde o estudo alergológico *in vivo* é limitado pela gravidade das reações.

O TTL tem vindo a ser utilizado há mais de três décadas, com sensibilidades variáveis, na ordem dos 60-70 % e especificidades rondando os 85 %³. Estes parâmetros são, contudo, variáveis e dependentes de fatores como o fármaco estudado, sendo descritas geralmente como superiores nos beta-lactâmicos (grupo mais estudado) e nos anticonvulsivantes³. Dependem também da manifestação clínica em causa, sendo apontados como mais associados a positividade no TTL o exantema maculopapular, o eritema fixo, a eosinofilia, a síndrome de DRESS, as reações alérgicas “de órgão”, como as hepatites, a urticária e a anafilaxia². De referir que alguns fármacos, como a vancomicina, os anti-inflamatórios não esteroides (AINE) e os meios de contraste podem aumentar a proliferação mesmo em doentes não sensibilizados³, levando a resultados falsos positivos do TTL.

Segundo alguns autores, a fiabilidade da resposta do TTL será fortemente influenciada pelo momento da sua realização em termos de tempo decorrido desde a reação^{3,4} (Kano *et al.*) definem tempos ótimos para a realização do TTL, que seriam a primeira semana após o aparecimento da erupção cutânea em doentes com exan-

tema maculopapulares, SJS e síndrome de Lyell e as 5-8 semanas em casos de síndrome de DRESS⁴.

Ainda assim, o Grupo de Interesse de “Alergia Medicamentosa” da Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica, considerou que uma recomendação de grau elevado para a realização do TTL estará ainda dependente da sua validação, que implicará a realização de estudos mais amplos e melhor controlados⁵.

Neste contexto, este estudo tem por objetivo avaliar o desempenho do TTL na identificação dos fármacos responsáveis por reações alérgicas e aferir os seus critérios de positividade, diferenciando os vários grupos farmacológicos e as reações observadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os processos clínicos de 95 doentes estudados em consulta de Imunoalergologia num período de 5 anos por reações de hipersensibilidade a fármacos em que foi possível estabelecer um diagnóstico com um elevado grau de probabilidade.

Foram registados o sexo, a idade dos doentes, o tipo de reação, os fármacos suspeitos, os resultados dos testes cutâneos e das provas de provocação, os resultados do TTL e o tempo decorrido entre a reação e realização dos testes.

Os testes cutâneos e as provas de provocação dos fármacos foram realizados de acordo com o manual de boas práticas de Imunoalergologia⁶.

Nos testes cutâneos foram utilizadas concentrações comprovadamente não irritativas⁷. As leituras foram feitas aos 20 minutos e às 48 horas. Os testes cutâneos por picada foram considerados positivos se a correspondente pápula atingia um diâmetro médio superior em 3 mm ao controlo negativo e tinha um eritema circundante. Para os testes intradérmicos, realizados só quando existia formulação parentérica do fármaco, o critério de positividade consistiu no aumento de 3 mm do diâmetro médio da pápula de inoculação, com eritema circundante. Relativa-

mente aos testes epicutâneos, as leituras foram realizadas às 48 e às 96 horas, pelo menos 20 minutos após a sua remoção, sendo considerados positivos quando induziram a formação de eritema, pápula, vesículas ou bolhas.

Nas provas de provocação foi utilizado um protocolo aberto e consideradas positivas se levaram ao desencadear de sinais e sintomas objetiváveis, reproduzindo a clínica da reação em estudo. Foi administrado o fármaco a testar, iniciando numa dose provavelmente não indutora de reação, prosseguindo-se com doses entre duplas e triplas da dose anterior, com intervalos nunca inferiores a 20 minutos. A prova era interrompida no caso de se verificar uma reação, ou quando a dose cumulativa atingia o valor da dose média de toma do fármaco em questão para o doente. O período de vigilância de eventual reação estendia-se 10 dias. Os doentes, em geral, foram instruídos para não tomar anti-histamínicos ou antidepressivos nos 5 dias, nem corticosteroides nos 7 dias anteriores à prova⁸. Para todas as provas foi obtido o consentimento informado do doente ou do seu representante.

O TTL tem, neste caso, a finalidade de detetar uma resposta mediada por células T a um fármaco. Esse tipo de resposta está presente em quase todas as reações alérgicas a fármacos, do tipo I ao tipo IV, o que confere ao método um elevado potencial diagnóstico. Realiza-se uma cultura de células mononucleadas do sangue periférico na presença de várias concentrações do fármaco em estudo e a sua proliferação é medida pela incorporação de H-timidina. O índice de estimulação (IE) é calculado por comparação da proliferação medida nessa cultura e a medida numa cultura de controlo, realizada sem a presença do fármaco. Desde há alguns anos, assumindo que os clones específicos T não estarão homogeneamente distribuídos e no sentido de otimizar resultados, o nosso grupo passou a realizar a cultura utilizando 24 réplicas, em vez das 3 réplicas utilizadas pela maioria dos autores⁹ e o cálculo do IE baseia-se nos valores *outlier*, ao invés de uma razão entre as médias⁹. Um IE ≥ 3 foi considerado positivo, critério semelhante ao utilizado habitualmente por outros autores².

Foi avaliada a adequação do *cut-off* e o poder discriminativo do TTL por curva ROC (Característica de operação do recetor). Foram calculadas a sensibilidade e especificidade para vários grupos farmacológicos e comparados os tempos decorridos entre a reação e a execução do teste (teste T).

O programa utilizado foi o SPSS Statistics versão 21.

RESULTADOS

Foram realizados 95 TTL em 73 doentes, 53 do sexo feminino e 20 do masculino, com idades entre os 4 e 88 anos, média de $47,1 \pm 21,9$.

Os fármacos suspeitos foram antibióticos beta-lactâmicos em 46 casos (48,4 %), outros antibióticos em 16 (16,8 %), AINE em 15 (15,5 %), anticonvulsivantes em 9 (9,5 %) e “outros fármacos” em 9 (9,5 %), encontrando-se discriminados no Quadro 1. Das reações alérgicas verificadas (Quadro 2) salienta-se o exantema maculopapular em 60 % dos casos, a urticária em 10,5 % e o eritema fixo em 9,5 %.

Foram estabelecidos 62 diagnósticos de alergia a um fármaco com base na história clínica e em 18 deles na positividade de testes cutâneos, por picada e/ou intradérmicos e/ou epicutâneos. Foi excluído o diagnóstico de alergia em 33 casos, em 25 deles por prova de provocação negativa.

Considerando a globalidade dos resultados, a análise dos valores dos IE obtidos no TTL por curva ROC demonstrou um poder discriminativo do teste de 70,6 % (área abaixo da curva), correspondendo ao valor de 3,25 uma sensibilidade de 72,6 % e uma especificidade de 60,6 % (Figura 1).

Os resultados dos TTL para os antibióticos beta-lactâmicos estão descritos no Quadro 3. Obteve-se neste grupo uma sensibilidade de 76 % e uma especificidade de 57,1 %. Cinco dos 9 falsos positivos verificaram-se para a amoxicilina+ácido clavulânico. O Quadro 3 resume os resultados do TTL para os AINE, grupo em que se obteve uma sensibilidade de 83,3 % e uma especificidade de 55,5 %. Os resultados para os antibióticos não beta-lactâmicos (Quadro 3) mostram uma sensibilidade de 46,1 % e uma

Quadro 1. Fármacos suspeitos

Classe	Fármaco	N
Beta-lactâmico	Amoxicilina + Ácido clavulânico	28
	Penicilina	4
	Flucloxacilina	4
	Piperacilina/Tazobactam	3
	Amoxicilina	2
	Ampicilina	2
	Cefuroxime	2
	Meropenem	1
AINE	Ibuprofeno	8
	Diclofenac	2
	Etoricoxib	2
	Metamizol	2
	Paracetamol	1
Anticonvulsivante	Carbamazepina	3
	Lamotrigina	3
	Fenitoína	2
	Levetiracetam	1
ABNBL	Cotrimoxazol	10
	Ciprofloxacina	3
	Claritromicina	1
	Clindamicina	1
	Levofloxacina	1
Outros	Alopurinol	2
	Fluconazol	2
	Irbesartan	1
	Cetoconazol	1
	Clotrimazol	1
	Esomeprazol	1
	Febuxostat	1

especificidade de 66,7%; dos 7 falsos negativos encontrados, 6 verificaram-se com o cotrimoxazol, tendo 3 destes valores de índice de estimulação entre 2 e 3. No grupo dos anticonvulsivantes não se verificaram falsos positivos e houve apenas um falso negativo para a lamotrigina. Resultados semelhantes obtiveram-se no grupo de outros fármacos, sendo o falso positivo, neste caso, com o fluconazol.

Quadro 2. Tipos de reações alérgicas e resultados do TTL

Reação	Reação		Classificação do TTL			
	N	%	VN	FP	FN	VP
EMP	57	60,0%	8	8	12	29
Urticária	10	10,5%	4	3	0	3
Eritema fixo	9	9,5%	3	1	1	4
SDRIFE	4	4,2%	1	0	1	2
Lyell	3	3,2%	0	1	0	2
Stevens Jonhson	2	2,1%	0	0	1	1
Anafilaxia	2	2,1%	0	1	0	1
Dermatite bolhosa	2	2,1%	1	0	0	1
DRESS	2	2,1%	0	0	1	1
Hepatite	1	1,1%	0	0	0	1
SWEET	1	1,1%	0	0	0	1
Conjuntivite	1	1,1%	1	0	0	0
Descamação palmar	1	1,1%	1	0	0	0

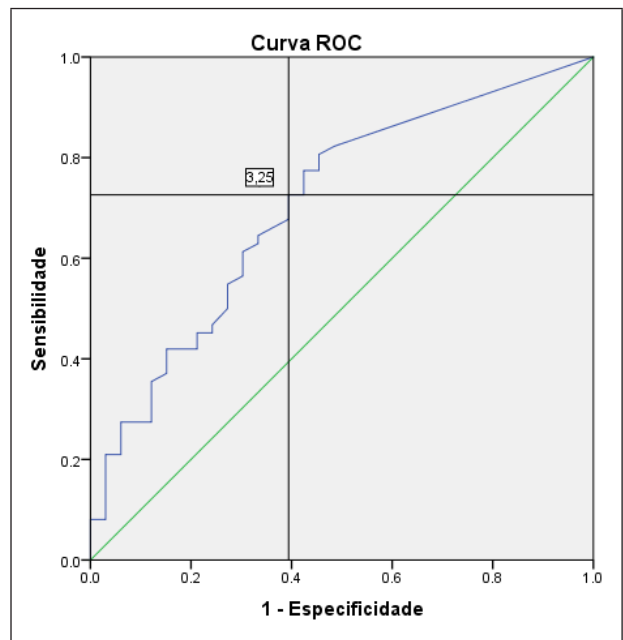


Figura 1. TTL – Curva ROC

O Quadro 2 resume os resultados do TTL em função da reação alérgica verificada. Verifica-se que a maioria das positivities foram observadas no exantema macu-

Quadro 3. Resultados dos TTL – beta-lactâmicos, AINE e antibióticos não beta-lactâmicos

Classificação TTL	Beta-lactâmicos		AINE		Antibióticos não beta-lactâmicos	
	N	%	N	%	N	%
VN	12	26,1	5	33,3	2	12,5
FP	9	19,6	4	26,7	1	6,3
FN	6	13,0	1	6,7	7	43,8
VP	19	41,3	5	33,3	6	37,5
Total	46	100,0	15	100,0	16	100,0

lopapular, mas também que 75 % dos falsos negativos e mais de metade dos falsos positivos correspondem a quadros de exantema maculopapular.

As médias do tempo decorrido desde a reação até à execução do TTL, em meses, foram de $12,8 \pm 41,9$ no grupo com testes negativos e de $29,8 \pm 96,2$ no grupo com TTL positivos, não havendo diferença significativa entre elas.

Considerando a totalidade da amostra estudada, o TTL foi positivo em 25 casos de alergia em que os testes cutâneos foram negativos e em 11 em que não puderam ser realizados. Por outro lado, foi negativo em 7 doentes com testes cutâneos positivos.

DISCUSSÃO

Antes do mais há que salientar que o diagnóstico final de alergia, que está na base da análise dos resultados do TTL, comporta um apreciável grau de incerteza em todos os estudos publicados. Este facto é inevitável pela impossibilidade de fazer provas de provocação em muitos dos casos. Os critérios para o diagnóstico de alergia neste trabalho foram semelhantes aos utilizados em geral nas publicações sobre este assunto².

O poder de discriminação que o TTL evidenciou na nossa amostra em geral é razoável e o *cut-off* de 3 para

o índice de estimulação utilizado neste trabalho, como aliás pela generalidade dos autores², é suportado pela relação entre os valores de sensibilidade e especificidade da curva ROC.

Numa primeira análise verifica-se que a baixa especificidade foi um ponto fraco do TTL. As razões para este resultado poderão, por um lado, estar relacionadas com um eventual mecanismo de imunidade heteróloga, isto é, com a existência de recetores das células T poliespecíficas¹⁰, mecanismo que foi proposto como interveniente na imunopatogénese das reações alérgicas a fármacos, provavelmente coexistindo com os modelos descritos¹⁰. Por outro lado, a utilização de fármacos nos TTL, que não estão na forma de substância pura, como alguns autores aconselham³, poderá ser outro fator da baixa especificidade observada. Esta baixa especificidade era, de qualquer forma, esperada para o grupo dos AINE, dado que a ocorrência de falsos positivos com estes fármacos tem sido referida na literatura³. Já a especificidade verificada para os antibióticos beta-lactâmicos está francamente abaixo da referida por Pichler *et al*³. O facto de uma parte importante dos falsos positivos se ter verificado com a utilização da amoxicilina+ácido clavulânico sugere a hipótese e um efeito estimulante inespecífico do clavulanato.

Nos resultados obtidos para os antibióticos não beta-lactâmicos, o resultado discordante da literatura² é a baixa sensibilidade do TTL ao cotrimoxazol. No entanto, se considerarmos os valores de índice de estimulação entre 2 e 3 como positivos, o que alguns autores propõem para fármacos não beta-lactâmicos, esta sensibilidade estaria mais de acordo com os resultados obtidos por outros grupos.

Os bons resultados obtidos com os anticonvulsivantes estão de acordo com os dados previamente publicados para este grupo de fármacos³.

Relativamente à relação entre as reações alérgicas e os resultados do TTL, o maior número de positividades associado ao exantema maculopapular está de acordo com os resultados de outros grupos, mas também não surpreende que os exantemas maculopapulares apareçam

associados à maioria dos falsos positivos e dos falsos negativos, dada a sua predominância na amostra analisada, que não permite dar significado a estes resultados.

Também o tempo decorrido entre a reação e a execução dos TTL no nosso grupo não permite comparações ou conclusões, dada a elevada dispersão dos tempos na amostra, óbvia pelos desvios-padrão das médias.

Apesar de todos os pontos fracos, o TTL permitiu confirmar a alergia a um fármaco em 36 casos cuja confirmação não foi possível por testes cutâneos, representando este número 58,1% dos casos de alergia da amostra estudada. Para além disso, evidenciou uma provável capacidade de identificar reatividade alérgica em vários grupos e fármacos.

CONCLUSÕES

O TTL revelou-se como um teste com razoável poder de discriminação na identificação de um fármaco como causa de reação alérgica. No entanto, o diagnóstico não poderá dispensar uma cuidada análise da história clínica e a execução de testes cutâneos, quando possível.

Deverão ser revistos alguns pormenores de execução técnica, como a forma do fármaco utilizada, no sentido de otimizar os resultados.

A interpretação dos índices de estimulação obtidos deverá ser revista e provavelmente ajustada de acordo com o fármaco estudado.

Serão necessários estudos mais alargados da sua utilização em vários grupos de fármacos.

Apesar dos seus pontos fracos, o facto de detetar um mecanismo envolvido na quase totalidade das reações alérgicas a fármacos, os seus resultados, a ausência de risco associado e a inexistência de técnicas *in vitro* alternativas com bons resultados, justificam amplamente a sua utilização no estudo da alergia a fármacos.

Financiamento: Nenhum

Declaração de conflitos de interesses: Nenhum

Contacto

Sofia Farinha

Centro Hospitalar de Setúbal, Hospital São Bernardo

Rua Camilo Castelo Branco

2910-446 Setúbal

REFERÊNCIAS

1. Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, et al. International consensus on drug allergy. *Allergy* 2014; 69: 420-37
2. Pichler WJ. Lymphocyte transformation test. In Hans-Werner Vohr (Ed.). *Encyclopedia of Immunotoxicology* (Online).
3. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004; 59: 809-20.
4. Kano Y, Hirahara K, Mitsuyama Y, Takahashi R, Shiohara T. Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption. *Allergy* 2007; 62: 1439-44.
5. Mayorga C, Celik G, Rouzair P, Whitaker P, Bonadonna P, Cernadas JR, et al, on behalf of In vitro tests for Drug Allergy Task Force of EAACI Drug Interest Group. In vitro tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy* 2016; 71: 1103-34.
6. Colégio de Imunoalergologia – Ordem dos Médicos. Manual de Boas Práticas – Procedimentos diagnóstico e tratamento em Imunoalergologia. Site da Ordem dos Médicos 2011.
7. Brockow K, Garvey LH, Aberer W, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, Bilo MB, et al. Skin test concentrations for systemically administered drugs – an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy* 2013;68:702-12.
8. Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*. 2003;58: 854-63.
9. Tomaz EMM, Viseu MR, Ferrão AF, Correia SH, Peres MJ, Reis RP, et al. Optimising the lymphocyte transformation test in drug allergy diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119, Suppl: S39.
10. White KD, Chung WH, Hung SI, Mallal S, Phillips EJ. Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136:219-34.