



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FABRÍCIA MARTINS TEIXEIRA

**MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE SUAS
CITOCINAS COMO FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS NA
HIPERSENSIBILIDADE ALÉRGICA A FÁRMACOS**

FORTALEZA

2012

FABRÍCIA MARTINS TEIXEIRA

**MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE SUAS
CITOCINAS COMO FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS NA
HIPERSENSIBILIDADE ALÉRGICA A FÁRMACOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Linha de Pesquisa: Bioprocessos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

T266m Teixeira, Fabrícia Martins
 Marcadores de ativação de linfócitos T e de suas citocinas como ferramentas diagnósticas na
hipersensibilidade alérgica a fármacos/ Fabrícia Martins Teixeira. – 2012.
 110 f. : il

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Fortaleza, 2012.

 Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

 Orientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias

 1. Hipersensibilidade a Drogas 2. Ativação Linfocitária 3. Citocinas I. Título.

CDD 615.1

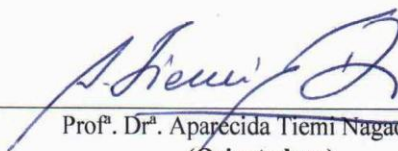
FABRÍCIA MARTINS TEIXEIRA

MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE SUAS
CITOCINAS COMO FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS NA
HIPERSENSIBILIDADE ALÉRGICA A FÁRMACOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Rede Nordeste de
Biotecnologia – RENORBIO, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Data da aprovação: 29/02/2012

BANCA EXAMINADORA

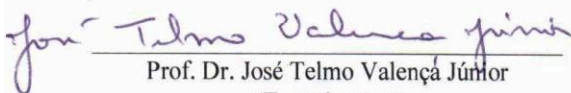


Prof.ª. Dr.ª. Aparecida Tiemi Nagao-Dias
(Orientadora)
RENORBIO – Universidade Federal do Ceará



Prof.ª. Dr.ª. Maria Isabel de Moraes Pinto
(Examinadora)
Universidade Federal de São Paulo

Prof.ª. Dr.ª. Silvia Helena Barem Rabenhorst
(Examinadora)
RENORBIO – Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior
(Examinador)
Universidade Federal do Ceará



Prof.ª. Dr.ª. Lília Maria Carneiro Câmara
(Examinadora)
Universidade Federal do Ceará

A Deus, por ter me guiado nessa jornada cercada de inúmeros desafios e por ter me fortalecido para superá-los.

Aos meus pais, **José Teixeira de Carvalho Neto** e **Maria Zilmar Martins Teixeira**, que se doaram por inteiros na minha formação pessoal e profissional, sendo os dois grandes “Mestres” da minha vida. A vocês, toda minha gratidão pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo, **Juliano Queiroz de Carvalho**, fonte de amor, compreensão e extrema paciência. Obrigada por ter compartilhado comigo cada momento de alegria e dificuldade e, sobretudo, não medir esforços em me ajudar e apoiar.

Aos meus irmãos **Fabiano Martins Teixeira** e **Rejane Martins Teixeira**, que ao longo de nossas vidas sempre me fizeram acreditar no meu sucesso profissional, e principalmente, por me proporcionarem inúmeros momentos de alegria!

Às minhas queridas tias **Rivanda Teixeira** e **Francineide Teixeira**: pelo apoio, torcida, incentivo, admiração e muitas orações.

Às minhas sobrinhas **Letícia**, **Rebeca** e **Larissa**: fontes de amor e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos especiais a minha orientadora, professora Dr^a. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, pela transmissão de seus conhecimentos imprescindíveis ao meu crescimento profissional e pelo exemplo não somente de Pesquisadora, mas, também de Ser humano. Sou eternamente grata pelo voto de confiança, pela oportunidade concedida, por toda força e incentivo.

À Dr^a. Thereza Lúcia Prata de Almeida, pois este trabalho só se tornou possível devido a sua competência e dedicação. Toda minha gratidão pelo esforço desmedido durante a seleção de pacientes, através de incansáveis consultas médicas, e inúmeras revisões de casos clínicos.

À professora Dr^a. Lília Câmara Carneiro, pela sua acolhida no Laboratório de Imunologia Médica da Universidade Federal do Ceará (UFC), possibilitando a realização de meus experimentos em seu laboratório. Meus estimados agradecimentos pelos ensinamentos e por toda atenção que você dispensou sobre mim e o meu trabalho.

À Dr^a. Julieta Genre da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), pela inestimável colaboração no desenvolvimento experimental e pela amizade conquistada.

Aos amigos do curso de Doutorado, pelos conhecimentos compartilhados e adquiridos durante esta trajetória, em especial: Suiany Rodrigues Câmara, José Maciel Andrade, Rita de Cássia Barbosa e Célio Lima de Melo.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), por todos os momentos de alegrias e de desesperos compartilhados, em especial: João Carlos, Paula, Thially, Luciana, Tatiane, Fernanda, Alba, Evandro, Natália, Raphael, Milena.

Aos amigos João Carlos, Paula Brito, Camila Fernandes, Alba Fabiola, Elizabeth Yokobatake, Thially Braga, Renata Sousa e Mariana Queiroz, por me escutarem pacientemente nos momentos de desabafo, pelas risadas, pelos conselhos e apoio que obtive de todos vocês.

À Tatiane Araújo e Luciana Mabel, pelas incontáveis horas de trabalho, de dedicação e auxílio prestados durante toda a trajetória deste doutorado. Sou muito grata a vocês!

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia Médica (LIME), Socorrinha e Eliane, pelo apoio e carinho com que sempre me receberam.

Aos colegas Hemerson Iury e Emmerson Ramalho, por compartilharem suas experiências e por todo auxílio prestado.

À Prof^a. Dr^a. Alice Martins e seus orientandos, em especial Alba Fabiola e Ticiane, a minha gratidão por permitirem o uso do Laboratório de Cultivo Celular.

À Prof^a. Dr^a. Zirlane, pela atenção e pelos conhecimentos compartilhados, o meu carinho e admiração.

A TODOS os professores, residentes, estudantes e funcionários do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC/ UFC), pela seriedade, atenção, empenho e apoio ao desenvolvimento do nosso projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Análise Clínicas e Toxicológicas (LACT/ UFC), por estarem sempre dispostos a ajudar e pelo carinho com que sempre atendiam às minhas solicitações, em especial Glautembergue e Hilvânia.

Aos coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) ponto focal do Ceará: Prof. Dr. José Ferreira Nunes, Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues, Prof^a. Dr^a. Paula Lenz Costa Lima, Karine Ribeiro Rodrigues, Paulo Wanderson e Patrícia pela atenção e pelos serviços prestados.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido (bolsa) durante minha vida acadêmica no Doutorado.

A todos aqueles que me acompanharam de perto (ou mesmo de longe), e que deixaram uma marca neste trabalho, a minha eterna gratidão!

“E depois de um tempo você aprende...
E você aprende que realmente pode suportar...
Que realmente é forte e pode ir muito mais longe...
Depois de pensar que já não podia mais...”

William Shakespeare

RESUMO

As reações alérgicas a fármacos representam um terço das reações adversas a medicamentos, e embora sejam pouco freqüentes, apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, revelando um importante problema de saúde pública. Os principais desafios relacionados com a hipersensibilidade a fármacos decorrem do fato de sua imprevisibilidade, de que não existe um modelo animal para pesquisa e devido à variabilidade individual no que diz respeito ao metabolismo do fármaco. As reações alérgicas a medicamentos são difíceis de serem diagnosticadas, uma vez que há carência de métodos laboratoriais para sua investigação. O presente estudo teve como objetivo estabelecer alguns métodos imunológicos *in vitro* para o diagnóstico de alergia a fármacos. Vinte pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, com manifestações muco-cutâneas e sistêmicas decorrentes de hipersensibilidade a fármacos foram investigados através de história clínica, exames laboratoriais *in vivo* e *in vitro*. Foram avaliados os marcadores de ativação de linfócitos CD25 e CD69 através de citometria de fluxo, em células mononucleares do sangue periférico previamente incubadas com diferentes concentrações do fármaco suspeito, e análise das citocinas interferon γ e interleucina 5 no sobrenadante da cultura através de teste imunoenzimático. Dezoito pacientes foram submetidos aos testes cutâneos, sendo que nove mostraram resultados positivos a um ou mais fármacos. Quinze pacientes apresentaram positividade para pelo menos um dos marcadores de ativação em resposta ao fármaco suspeito. Os marcadores CD69 e/ou CD25 foram expressos pelas células T CD4⁺ e CD8⁺, tanto em reações imediatas como nas não-imediatas. A comparação dos índices de estimulação desses marcadores entre pacientes e indivíduos saudáveis não alérgicos, resultou em diferença significativa para CD4⁺CD69⁺ nas três concentrações do fármaco suspeito e para CD4⁺CD25⁺ apenas na menor concentração do fármaco suspeito. Nenhuma diferença significativa para as citocinas IFN- γ e IL-5 foi observada entre os pacientes e os indivíduos controles. A detecção de ambos os marcadores de ativação CD69 e CD25 aumentou a sensibilidade diagnóstica do teste. O uso combinado dos marcadores representa uma ferramenta promissora no diagnóstico laboratorial das reações alérgicas a medicamentos. Não obstante, essa hipótese deve ser confirmada com um número maior de pacientes e controles.

Palavras-chave: Hipersensibilidade a fármacos. Marcadores de ativação linfocitária. Citocinas.

ABSTRACT

Drug allergy reactions represent one third of adverse drug reactions, and although they are infrequent, they present high rates of morbidity and mortality, revealing a major public health problem. The main challenges related to drug hypersensitivity result from its unpredictability, no animal model for research and individual variability with regard to drug metabolism. Drug allergy reactions are difficult to be diagnosed once there is a lack of laboratorial tests for their investigation. The present study aimed to establish some immunological in vitro methods for diagnosing drug allergy. Patients (n=20) attending a dermatology outpatient clinic, Hospital Universitario Walter Cantídio, Universidade Federal Ceara, with mucocutaneous and systemic manifestations due to drug hypersensitivity were investigated by clinical history, laboratory findings, and in vivo and in vitro tests. The lymphocyte activation markers, CD25 and CD69, were evaluated by flow cytometry on the peripheral blood mononuclear cells previously incubated with different concentrations of the suspected drug, and analysis of interferon γ and interleukin 5 was done in the culture supernatant by enzyme immunoassay. Eighteen patients were tested by skin tests; nine patients showed positive results to one or more drugs. Fifteen patients showed positivity for at least one of activation markers in response to the suspected drug. The markers CD69 and/or CD25 were expressed by T cells CD4⁺ and CD8⁺, both in immediate and delayed reactions. Comparing stimulation index of the markers between patients and healthy no allergic individuals, it was observed a significant difference for CD4⁺CD69⁺ in the three suspected drug concentrations and CD4⁺CD25⁺ only in the lower drug concentration. No significant differences were found for the cytokines IFN- γ and IL-5 between patients and healthy individuals. The detection of both activation markers CD69 and CD25 increased the diagnostic sensitivity of the test. The use of both markers represents a promising tool in drug allergy diagnosis. Nonetheless, this hypothesis needs to be confirmed with a greater number of patients and controls.

Key words: Drug hypersensitivity. Lymphocyte activation markers. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Algoritmo da abordagem clínica de paciente com suspeita de hipersensibilidade a fármacos (BIRCHER, 2007)..... 33
- FIGURA 2. Curva de titulação para CD69 empregando a fitohemaglutinina. As percentagens de células positivas para o marcador CD69 foram 15,6% para 3µl de anticorpo (A), 23,8% para 5µl (B) e 25,5% para 7µl (C). A média de intensidade de fluorescência para CD69 foi respectivamente, 13, 17 e 19..... 51

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1. Informações essenciais na investigação de pacientes com alergia a fármacos (MIRAKIAN et al., 2009; SCHNYDER, 2009, 2010; KHAN; SOLENSKY, 2010)..... 32
- QUADRO 2. Testes diagnósticos conforme o tipo de reação de hipersensibilidade a fármacos (LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009; ROMANO et al., 2011)..... 35
- QUADRO 3. Classificação de probabilidade para reação alérgica a fármacos (NYFELER; PICHLER, 1997)..... 46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	: Células apresentadoras de antígeno
AGEP	: <i>Acute generalized exanthematous pustulosis</i> (Pustulose exantemática aguda generalizada)
AINES	: Anti-inflamatórios não esteroidais
BAT	: Teste de ativação de basófilos
CAP-FEIA	: <i>Fluorescent enzyme immunoassay</i>
CCDA	: Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
CD	: <i>Cluster of differentiation</i>
DRESS	: <i>Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms</i> (Erupção cutânea a fármaco associada à eosinofilia e sintomas sistêmicos)
EBV	: Vírus Epstein-Barr
ELISA	: <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático ligado à fase sólida)
FAS-L	: FAS ligante
GM-CSF	: Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HIV	: Vírus da imunodeficiência humana
HLA	: Antígeno leucocitário humano
HSV	: Vírus herpes simples
HUWC	: Hospital Universitário Walter Cantídio
ICDRG	: <i>International Contact Research Group</i>
IFN- γ	: Interferon gama
Ig	: Imunoglobulina
IL	: Interleucina
IL-2R	: Receptor de interleucina-2
LTT	: Teste de transformação linfocitária
MHC	: Complexo principal de histocompatibilidade
NET	: Necrólise epidérmica tóxica
NK	: Células <i>Natural killer</i>
NMFI	: <i>Normalized mean fluorescence intensity</i> (Média normalizada de intensidade de fluorescência)

OMS	: Organização Mundial de Saúde
PBMC	: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares de sangue periférico)
PBS	: Salina tamponada com fosfato
PHA	: Fitohemaglutinina
p-i	: <i>Pharmacological interactions of drugs with antigen-specific immune receptors</i> (Conceito p-i)
RA	: Reação alérgica a fármacos
RAM	: Reação adversa a medicamentos
RAST	: <i>Radioallergosorbent test</i>
SI	: <i>Stimulation index</i> (Índice de estimulação)
SMX-NO	: Sulfametoxazol-nitroso
SSJ	: Síndrome de Stevens-Johnson
TCR	: Receptor de células T
TNF	: Fator de necrose tumoral
Treg	: Células T reguladoras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Epidemiologia das reações adversas a medicamentos.....	17
2.2 Epidemiologia das reações de hipersensibilidade a fármacos.....	18
2.3 Fatores de risco.....	19
2.4 Mecanismos imunopatogênicos.....	22
2.5 Classificação das reações de hipersensibilidade a fármacos.....	27
2.6 Aspectos clínicos.....	31
2.7 Diagnóstico clínico.....	32
2.8 Diagnóstico laboratorial.....	34
2.9 Novas perspectivas diagnósticas.....	39
3 JUSTIFICATIVA	42
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	43
5 OBJETIVOS	44
5.1 Objetivo geral.....	44
5.2 Objetivos específicos.....	44
6 MATERIAIS E MÉTODOS	45
6.1 Aspectos éticos.....	45
6.2 Casuística.....	45
6.3 Testes <i>in vivo</i>	47
6.4 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico com os fármacos suspeitos.....	48
6.5 Imunofenotipagem e ativação linfocitária.....	49
6.6 Titulação dos conjugados de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos....	50
6.7 Análise de citocinas.....	51
6.8 Análise estatística.....	52
7 CAPÍTULO 1: Diagnosing immune-mediated reactions to drugs	53
9 CAPÍTULO 2: Rifamycin-associated postoperative allergic contact dermatitis in a 70-year old patient	61
10 CAPÍTULO 3: Detection of CD69 and CD25 in immediate and delayed drug hypersensitivities	69

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXOS.....	99
ANEXO A – Secondary leprosy infection in a patient with psoriasis during treatment with infliximab	99
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	103
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de adesão ao estudo.....	104
ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para realização dos testes cutâneos.....	105
ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para realização dos testes epicutâneos.....	106
ANEXO F - Questionário de investigação de hipersensibilidade a fármacos.....	107

1 INTRODUÇÃO

O tratamento medicamentoso é considerado a intervenção terapêutica mais frequente na Medicina. No entanto, o resultado dessa terapia pode proporcionar além dos efeitos benéficos desejados, potenciais riscos, os quais devem ser bem avaliados antes de uma decisão terapêutica.

As reações adversas a medicamentos (RAMs) são eventos frequentes na prática médica que podem ocasionar graves problemas de saúde, sendo consideradas causa significativa de morbidade e mortalidade (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011; THONG; TAN, 2011). Assim, constituem uma grande ameaça para a farmacoterapia e revelam-se como um importante problema de saúde pública.

Reações alérgicas a fármacos (RAs) são classificadas de acordo com o período entre a exposição aos mesmos e sintomatologia em reações de hipersensibilidade do tipo imediata (mediadas por IgE) e não-imediata, cujo maior representante são as reações desencadeadas pelas células T (THONG; TAN, 2011). As RAs estão enquadradas nas reações adversas do tipo B e manifestam-se através de uma variedade de sintomas clínicos e enfermidades, alguns dos quais muito graves e até mesmo fatais. A pele é o órgão mais afetado, e geralmente as reações apresentam-se apenas com manifestações cutâneas.

As reações alérgicas são difíceis de serem diagnosticadas, uma vez que múltiplos e complexos mecanismos estão envolvidos e, portanto, há carência de acompanhamento laboratorial adequado que auxilie na identificação bem como na classificação das mesmas, para que se possa tomar uma conduta terapêutica mais adequada (DEMOLY; BOUSQUET, 2001).

Os testes cutâneos carecem de sensibilidade e os testes de provocação oferecem o risco de reproduzirem reações graves. Os testes *in vitro* são de grande interesse, pois garantem segurança para o paciente e permitem avaliação simultânea a múltiplos fármacos. Apesar disso, muitos desses testes não estão padronizados, são aplicados apenas em pesquisas, e apresentam boa especificidade, mas relativamente baixa sensibilidade (BEELER; PICHLER, 2007; POREBSKI; GSCHWEND-ZAWODNIAK; PICHLER, 2011).

Considera-se, então, o diagnóstico das reações alérgicas a fármacos um problema na prática clínica devido à carência de métodos laboratoriais para sua investigação. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar instrumentos com potencial utilidade no diagnóstico dessas reações, empregando os testes de avaliação da imunofenotipagem linfocitária através da expressão dos marcadores de ativação CD25 e CD69, e da análise da secreção de citocinas. O bioprocesso aqui apresentado é inovador em nosso meio e corrobora outros estudos realizados na área de farmacovigilância em outros países como a Suíça, Espanha, Portugal, Japão e Estados Unidos. Além disso, poucos trabalhos fazem referência a essas técnicas e, portanto, um maior número de pesquisas nessa área pode favorecer sua validação e conseqüentemente aplicação na rotina diagnóstica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia das Reações adversas a medicamentos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as reações adversas a medicamentos (RAMs) são definidas como qualquer efeito nocivo, não intencional e indesejável ao fármaco, que ocorre em doses normalmente usadas para prevenção, diagnóstico ou tratamento (KHAN; SOLENSKY, 2010).

As RAMs são problemas frequentes que se caracterizam por afetar a qualidade de vida e prolongar o tratamento e/ou hospitalização do paciente, resultando em considerável morbidade ou mesmo mortalidade (MIRAKIAN et al., 2009). Essas reações afetam 7% da população em geral, são responsáveis por aproximadamente 3 a 6% de todas as admissões hospitalares e acometem 10% a 20% dos pacientes internados (SCHNYDER, 2010; THONG; TAN, 2011).

As RAMs são divididas em dois grandes grupos: tipo A e tipo B. As reações do tipo A são consideradas comuns, compreendendo aproximadamente 80% de todas as RAMs, previsíveis e inerentes à ação farmacológica ou tóxica do fármaco (SCHNYDER; PICHLER, 2009; ADAM; PICHLER; YERLY, 2011). São usualmente dependentes da dose, podendo acometer qualquer indivíduo, e resultam de efeitos colaterais e secundários, de interações farmacológicas entre diferentes medicamentos ou do efeito tóxico. Este último pode ser devido a uma superdosagem ou a uma excreção reduzida dos metabólitos (MIRAKIAN et al., 2009; KHAN; SOLENSKY, 2010).

As reações do tipo B são incomuns, abrangendo cerca de 15-20% de todas as RAMs, imprevisíveis e não estão relacionadas com a ação farmacológica do medicamento. Logo, são dose independentes e ocorrem apenas em indivíduos susceptíveis às mesmas (SCHNYDER, 2010; THONG; TAN, 2011). Este grupo compreende as reações idiossincrásicas, de intolerância ou de hipersensibilidade. As reações alérgicas ou de hipersensibilidade a fármacos são desencadeadas por um ou mais mecanismos imunológicos associados ao fármaco e/ou a seus metabólitos; as reações de hipersensibilidade não-alérgicas ou anafilactóides ocorrem na ausência de especificidade imunológica, mas apresentam

manifestações semelhantes às de uma reação alérgica (POSADAS; PICHLER, 2007; KHAN; SOLENSKY, 2010).

2.2 Epidemiologia das Reações de hipersensibilidade a fármacos

As reações de hipersensibilidade a fármacos estão enquadradas nas reações do tipo B, representando 15% de todas as RAMs (LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009). São responsáveis por aproximadamente 14% dos pacientes hospitalizados e 3% de todas as lesões incapacitantes durante a internação (MARTIN; HUI, 2008; SCHNYDER, 2010).

A maioria dos estudos epidemiológicos disponíveis tem realizado mais estimativas a respeito das RAMs do que especificamente das reações alérgicas a medicamentos (RAs). Além disso, as pesquisas relacionadas às RAs são limitadas a determinados centros de especialidades, grupos de pacientes ou tipos de manifestações, prejudicando o conhecimento da real incidência e prevalência dessas reações na população geral (THONG; TAN, 2011).

Um estudo prospectivo com notificação de pacientes admitidos em um hospital geral na Singapura reportou uma incidência de 4,2 por 1000 internações para as RAs, sendo que 0,09 por 1000 hospitalizações resultaram em óbito. As manifestações cutâneas foram as mais frequentes (95,7%) e os grupos farmacológicos mais envolvidos nas reações foram os antimicrobianos e os antiepilépticos (THONG; TAN, 2011).

Enquanto as reações verdadeiramente alérgicas estão associadas à exposição anterior ou sensibilização prévia do indivíduo a um determinado fármaco e/ou a seus metabólitos, as reações de hipersensibilidade não-alérgica ou anafilactóides são provenientes da liberação direta de mediadores inflamatórios presentes nos grânulos dos mastócitos e basófilos. Esses mediadores são liberados através de mecanismos independentes dos anticorpos IgE ou por exarcebação das vias dos leucotriênios, como é frequente ocorrer com os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (NAGAO-DIAS et al., 2004; SCHNYDER, 2010).

Reações a quimioterápicos e imunobiológicos também têm sido cada vez frequentes (ROMANO et al., 2011). Ainda, um mesmo medicamento pode induzir ambas as formas alérgicas e anafilactóides.

O risco de uma substância ocasionar uma sensibilização e a gravidade dos possíveis sintomas clínicos depende principalmente do estado de ativação imunológica do paciente, da dose, da frequência de exposição, da via de administração, da duração do tratamento, do sexo (mais prevalentes no feminino) e da predisposição genética (PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011).

Devido aos sinais e sintomas de muitas reações serem verificados apenas na fase efetora da resposta imunológica, tem-se postulado que as RAs são observadas apenas na reexposição ou alguns dias após o último contato com o medicamento (SCHNYDER; PICHLER, 2009). Entretanto, acredita-se que reações cruzadas entre fármacos envolvidos e outros compostos químicos ou xenobióticos podem resultar em alergia mesmo em um indivíduo não sensibilizado ao medicamento e/ou a seus metabólitos propriamente ditos (SCHNYDER; PICHLER, 2009).

O fato de muitas pessoas não desenvolverem reações imunológicas frente a um determinado fármaco se deve, sobretudo, aos mecanismos regulatórios. Entretanto, pouco se conhece sobre o papel das células T reguladoras (Treg), indutoras de tolerância imunológica nas reações de hipersensibilidade a medicamentos (PICHLER et al., 2010; PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011).

2.3 Fatores de risco

2.3.1 Fatores relacionados ao paciente

Alguns fatores individuais como idade, sexo, estado imunológico, predisposição genética e co-morbidades estão associados ao maior risco de um fármaco e/ou de seus metabólitos levarem a uma sensibilização do paciente.

Vários estudos indicam que as mulheres podem estar mais propensas a desenvolverem RAs, uma vez que a incidência entre elas é geralmente maior do que no sexo masculino (THONG; TAN, 2011). Essa predisposição do sexo feminino pode decorrer de influência hormonal no metabolismo dos fármacos (DEMOLY et al., 2007).

Considerando os grupos etários, adultos jovens podem ser mais afetados do que crianças e idosos (MIRAKIAN et al., 2009). As crianças estão geralmente menos expostas a sucessivos tratamentos farmacológicos. No entanto, o aumento de prescrição de determinados medicamentos, tais como antibióticos, pode terminar sensibilizando esse grupo etário. Os sintomas causados pelas RAs são semelhantes entre não-idosos e idosos. Destaca-se, contudo, que dentre os dois grupos, os idosos, embora mais expostos a uma variedade de farmacoterápicos, são menos acometidos por reações graves (THONG; TAN, 2011).

Co-morbidades predis põem o paciente ao desenvolvimento das RAs através de alterações metabólicas e imunológicas, como, por exemplo, o fornecimento do segundo sinal de ativação (sinal de perigo), importante na estimulação de uma resposta imune (SCHERER; BIRCHER, 2010). Polimorfismos nos genes responsáveis pela geração de metabólitos dos fármacos podem induzir RAs e contribuir para a gravidade de tais reações (GHOSH et al., 2011).

Certos vírus, como Epstein-Barr (EBV), vírus herpes simples (HSV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV), elevam em mais de 50% o surgimento de reações cutâneas a fármacos em pacientes infectados, sem que haja necessidade de predisposição genética (POSADAS; PICHLER, 2007). Isso ocorre devido à interação dos vírus no metabolismo dos medicamentos, no processo de maturação das células dendríticas, na apresentação do complexo antigênico aos linfócitos e na produção de citocinas e quimiocinas (TORRES; MAYORGA; BLANCA, 2009).

Pacientes com fibrose cística são constantemente expostos a antibióticos para tratamento de infecções recorrentes do trato respiratório. Devido a isso, desenvolvem cerca de 25 a 50% de reações de hipersensibilidade a fármacos, comparativamente a 1- 10% na população geral. Os fatores de risco associados, como mencionado anteriormente, podem ser decorrentes da forma de tratamento (via de administração, dose, frequência e duração da exposição) e principalmente, de características individuais como o estado imunológico, o qual

é influenciado positivamente pelos agentes infecciosos (PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011).

Uma vez já instalada uma RA, ela mesma pode representar um fator de risco para ocorrência de futuros fenômenos alérgicos (SCHERER; BIRCHER, 2010), pois os fatores desencadeantes, como anticorpos e linfócitos específicos ao fármaco, já estão presentes, o que potencializa a rápida recorrência da reação, tanto na exposição à mesma substância, como a outras estruturas similares (SCHERER; BIRCHER, 2010).

Embora a atopia seja definida como uma predisposição genética associada com uma resposta aumentada de IgE frente a proteínas inócuas inaladas ou ingeridas, isto normalmente não a associa ao maior risco de um indivíduo desenvolver reação alérgica. Entretanto, essa predisposição pode prolongar a persistência de IgE específica no soro e também agravar os sintomas de uma resposta inflamatória já instalada (PICHLER, 2007).

O crescente progresso na compreensão dos fatores de risco envolvidos nas RAs tem revelado forte associação de determinadas reações graves com alelos do antígeno leucocitário humano, especificamente HLA-B. Supostamente esses alelos contribuem da forma mais adequada para a apresentação dos medicamentos quando comparados a outros alelos (PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011). Dessa forma, atualmente é possível impedir algumas RAs graves antes do tratamento ser instalado, por meio de testes que detectam a presença de alelos dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), estreitamente relacionados a essas reações (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011). Contudo, muitos questionamentos concentram-se em como apenas alguns dos portadores dessa predisposição genética apresentam RAs. Estudos demonstram que além da estreita associação com os alelos HLA, existem outros fatores desencadeantes, como o fenótipo do receptor de células T (TCR) (PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011).

2.3.2 Fatores relacionados ao fármaco

O potencial imunogênico de um medicamento constitui fator de risco para o desenvolvimento das RAs (POSADAS; PICHLER, 2007). Qualquer fármaco é capaz de provocar uma resposta de hipersensibilidade, desde que possua reatividade química (hapteno e pró-hapteno) e/ou capacidade de se ajustar de forma lábil entre as moléculas receptor de

células T (TCR) e MHC (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011). Uma molécula é considerada imunogênica quando possui peso molecular acima de 1000 Da em seu estado nativo. Quando possui baixo peso molecular, ela passa a atuar como hapteno, necessitando de sua conjugação ou a de seus metabólitos com proteínas carreadoras para se tornar imunogênica.

Alterações no metabolismo e na eliminação dos fármacos reativos ou de seus metabólitos tóxicos podem ser provocadas por enfermidades hepáticas e renais, que resultariam em exposição prolongada aos mesmos e conseqüente indução de resposta imune (SCHERER; BIRCHER, 2010).

O tratamento intermitente e recorrente causa mais sensibilização do que quando o mesmo é contínuo (DEMOLY et al., 2007). A dose influencia no mecanismo imunológico de resposta, visto que altas concentrações de fármacos estimulam melhor as células T e induzem reações imunes tardias (POSADAS; PICHLER, 2007). Acrescido a este fato, o aumento na dose de um fármaco pode induzir reações a medicamentos previamente bem tolerados pelo organismo (SCHERER; BIRCHER, 2010).

Outro fator de risco relevante é o tratamento com múltiplos fármacos, apesar do seu mecanismo não ser compreendido (SCHERER; BIRCHER, 2010).

Medicamentos administrados através de via tópica possuem maior capacidade de sensibilizar o indivíduo (SCHERER; BIRCHER, 2010), seguidos dos administrados por via endovenosa, a qual parece ser mais imunogênica que a via oral (THONG; TAN, 2011).

2.4 Mecanismos imunopatogênicos

Uma das questões mais intrigantes a ser respondida é como um medicamento pode ativar o sistema imune. Landsteiner (1946) primeiramente propôs que o antígeno deveria ser apresentado em uma forma estável e multivalente, de forma a ser capaz de ativar os mecanismos imunológicos. Alguns agentes terapêuticos como anticorpos, devido à sua forma macromolecular e por conter múltiplos epítomos, possuem essa capacidade imunogênica intrínseca. No entanto, a grande maioria dos medicamentos são estruturas moleculares pequenas que não se enquadram em tal teoria. Atualmente, existem três hipóteses que tentam

elucidar os mecanismos pelos quais pequenas moléculas como os fármacos são capazes de ativar o sistema imune.

2.4.1 Conceito hapteno

Segundo este conceito, compostos químicos muito pequenos naturalmente reativos são denominados de haptenos. Eles rapidamente conjugam de forma covalente com proteínas endógenas (PICHLER et al., 2010). Dessa forma, o complexo pode ser capturado, processado e apresentado por células apresentadoras de antígeno (APC) aos linfócitos T através de receptores específicos (POSADAS; PICHLER, 2007).

As moléculas carreadoras podem ser proteínas, tais como albumina, integrinas e algumas enzimas (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011). Essas proteínas, muitas delas essenciais à célula, ao se conjugarem com o hapteno sofrem alterações que possivelmente resultam em uma toxicidade celular crucial na indução da resposta imune (PICHLER et al., 2010). Tal toxicidade representa um sinal de perigo que pode estimular as APC e, estas, uma vez ativas, secretariam citocinas e expressariam moléculas co-estimuladoras (CD40) (PICHLER et al., 2010). Existem evidências de que as células dendríticas apresentam crescente nível de expressão do marcador CD40 após exposição ao sulfametoxazol e a seus metabólitos; adicionalmente, essas células podem sofrer maturação por fatores não relacionados aos fármacos, como estresse, trauma, entre outros (PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011).

A penicilina, por exemplo, comporta-se como um hapteno, pois no interior do organismo, o anel beta-lactâmico rapidamente se abre, permitindo uma conjugação espontânea e estável com outras moléculas, particularmente resíduos de lisina na albumina (POSADAS; PICHLER, 2007; ADAM; PICHLER; YERLY, 2011).

2.4.2 Conceito pró-hapteno

Pró-haptenos são substâncias inertes que requerem metabolização ou bioativação para se tornarem quimicamente reativos (SCHNYDER; PICHLER, 2009).

O metabolismo dos fármacos ocorre principalmente nos hepatócitos, através da ação das enzimas do citocromo P450, as quais desempenham reações de fase 1 (oxidação, hidrólise, redução). Alguns dos produtos gerados são quimicamente instáveis e reativos, prontos para se acoplarem às proteínas e modificá-las podendo originar uma resposta imune; outros são diretamente tóxicos para as células, o que exige uma detoxificação pelos processos de conjugação enzimática (fase 2) (FRIEDMANN et al., 2003). Uma alteração ou saturação nas reservas enzimáticas da fase 2 de detoxificação leva ao acúmulo de metabólitos no organismo, de forma a induzir reações alérgicas (CERNY; BERTOLI, 2007). Dentre as prováveis condições que contribuem para a redução de tais estoques enzimáticos estão as infecções causadas por HIV, EBV ou HSV (FRIEDMANN et al., 2003).

Embora o trato gastrointestinal e o fígado sejam considerados os maiores alvos para as RAs devido à exposição a grandes quantidades de haptenos e de pró-haptenos, tais órgãos são raramente afetados (SCHNYDER; PICHLER, 2009). Isso pode ser decorrente de mecanismos regulatórios presente nesses órgãos, nos quais as enzimas da fase 2 impedem a formação de produtos tóxicos (CERNY; BERTOLI, 2007; PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011).

Desse modo, uma reação de hipersensibilidade ocorre quando há quebra do mecanismo de tolerância (CERNY; BERTOLI, 2007) ou quando a substância reativa escapa do ambiente de tolerância dos hepatócitos, podendo ser metabolizada em outros locais (POSADAS; PICHLER, 2007). Dentre os sítios de metabolização extra-hepática destacam-se os fibroblastos dérmicos e queratinócitos, pelo fato de conterem muitas enzimas metabólicas e contribuírem para a produção de haptenos e pró-haptenos (POSADAS; PICHLER, 2007). Este mecanismo explicaria como um medicamento de uso tópico pode causar RAs e como as reações sistêmicas podem apresentar-se com manifestações cutâneas (FRIEDMANN et al., 2003). Outras células que também exercem atividade metabólica são as células dendríticas, os monócitos/ macrófagos e os neutrófilos, através da enzima mieloperoxidase (POSADAS; PICHLER, 2007).

O sulfametoxazol é um protótipo da hipótese do pró-hapteno, pois ao sofrer metabolismo intracelular a sulfametoxazol-nitroso (SMX-NO) no fígado adquire reatividade e facilmente modifica as proteínas celulares e séricas que contêm o grupamento tiol, formando potentes determinantes antigênicos hábeis para induzir diferentes manifestações, tais como

exantema, anafilaxia, hepatite, síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011).

2.4.3 Conceito p-i

Recentes evidências clínicas, imunológicas e bioquímicas têm apontado que os fármacos quimicamente inertes podem induzir reações de hipersensibilidade (PICHLER et al., 2006; ADAM; PICHLER; YERLY, 2011). Pichler (2002a) propôs essa nova possibilidade de estimulação das células T, visto que os fármacos não somente atuam nos seus alvos terapêuticos como também podem interagir com receptores imunes, de forma semelhante à ligação com outros receptores não-imunológicos. Esse fenômeno é designado de conceito p-i (*pharmacological-interactions of drugs with antigen-specific immune receptors*).

De acordo com esta hipótese, as substâncias não reativas associam-se diretamente ao TCR ou às moléculas MHC de forma não covalente ou reversível. Assim, fornecem sinais que podem ativar os linfócitos T resultando na proliferação dessas células específicas ao antígeno, síntese de citocinas e citotoxicidade (POSADAS; PICHLER, 2007; SCHNYDER; PICHLER, 2009). Para ocorrer essa interação, o fármaco não precisa sofrer qualquer biotransformação, nem se conjugar a proteínas ou peptídeos, mas deve essencialmente ter regular afinidade pelos inúmeros e polimórficos TCR ou MHC (PICHLER et al., 2010; GHOSH et al., 2011).

Somente certas medicações ajustam-se entre o TCR e MHC, e podem ativar exclusivamente a resposta imune celular diferentemente do conceito do hapteno que também engloba a resposta imune humoral (POSADAS; PICHLER, 2007). As células T envolvidas no processo p-i provavelmente são dos tipos efetores e de memória, visto que ambas são pré-ativadas por peptídeos e reagem ao menor sinal de estimulação, como a lábil ligação do fármaco ao TCR (SCHNYDER; PICHLER, 2009). Tais células T possuem adicional especificidade a peptídeos (PICHLER et al., 2010). Uma completa estimulação das células T é obtida por interação complementar entre TCR e MHC na célula apresentadora de antígeno (GHOSH et al., 2011).

Até o momento, o mecanismo exato de interação farmacológica do fármaco ao TCR não foi totalmente elucidado (SCHNYDER; PICHLER, 2009). Portanto, não se sabe se

o medicamento se associa inicialmente ao MHC, alterando sua estrutura e conduzindo à ativação específica do TCR, ou se o medicamento se acopla diretamente ao TCR específico, com complementar interação ao MHC (PICHLER et al., 2010).

Pesquisas experimentais com as células T CD4⁺ indicam que o fármaco inicialmente se une ao TCR, já que modificações ou remoções no peptídeo associado ao MHC de classe II não afetaram a ativação dessas células e adicionalmente se ligam ao MHC independente de sua origem. Por outro lado, estudos com células T CD8⁺ sugerem que os medicamentos associam-se inicialmente às moléculas MHC de classe I (especificamente a alelos do HLA-B), modificando-as e induzindo resposta imune, independentemente da presença de peptídeos (PICHLER; NAISBITT; PARK, 2011).

Com o avanço nessa área, atualmente seria possível impedir algumas RAs graves antes do tratamento ser instalado, através de testes que detectam a presença de alguns alelos do gene MHC que estariam estreitamente envolvidos nessas reações (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011).

Estudos têm demonstrado o mecanismo p-i nas RAs induzidas por muitos fármacos (sulfametoxazol, carbamazepina, ciprofloxacino, lidocaína, entre outros) e seus metabólitos (PICHLER et al., 2010; ADAM; PICHLER; YERLY, 2011).

Muitas RAs são desenvolvidas conforme a hipótese p-i. Exemplos disso são o exantema maculopapuloso, eritema multiforme, pustulose exantemática aguda generalizada (AGEP- *acute generalized exanthematous pustulosis*), erupção cutânea a fármaco associada à eosinofilia e sintomas sistêmicos (DRESS- *drug rash with eosinofilia and systemic symptoms*), síndrome de Stevens-Johnson (SSJ), necrólise epidérmica tóxica (NET), dentre outras (POSADAS; PICHLER, 2007).

A pele é frequentemente alvo de tais reações, pois pode apresentar numerosas células dendríticas que expressam moléculas MHC e células T efetoras e de memória, além de ser local no qual pode ocorrer metabolismo dos fármacos (queratinócitos) (SCHNYDER; PICHLER, 2009). Algumas características clínicas revelam que alguns fármacos podem agir pela hipótese p-i, pois muitas vezes a manifestação clínica pode ocorrer em um indivíduo não-sensibilizado (POSADAS; PICHLER, 2007; PICHLER et al., 2010).

Aliado a esses dados clínicos, muitas substâncias inertes causam positividade aos testes cutâneos apresentando um infiltrado leucocitário, mas sem sofrerem metabolismo cutâneo (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011).

2.5 Classificação das reações de hipersensibilidade a fármacos

As reações de hipersensibilidade a fármacos envolvem variados tipos de mecanismos imunopatológicos, que conduzem a características clínicas heterogêneas. Desta forma, com o intuito de auxiliar na rotina clínica e de elucidar nas decisões terapêuticas, tais reações têm sido classificadas de acordo com Gell & Coombs em quatro diferentes tipos (PICHLER, 2007).

2.5.1 Reações de hipersensibilidade do tipo I

As reações do tipo I ou imediatas são mediadas por anticorpos IgE específicos associados com alta afinidade a receptores Fcε presentes em mastócitos e basófilos, os quais degranulam após a ligação do fármaco. Há liberação pelas células de mediadores pré-formados (histamina, serotonina, triptase) responsáveis pela resposta imediata e mediadores neoformados (mediadores lipídicos, citocinas como interleucina (IL)-4, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e IL-5), responsáveis pela fase tardia da resposta imediata (NAGAO-DIAS et al., 2004).

As reações mediadas por IgE normalmente ocorrem em menos de uma hora depois da administração do fármaco e causam sintomas que variam de leves a graves ou mesmo letais. Dentre eles, podemos abordar o prurido local e eritema como sinais de alerta, que podem evoluir para angioedema, broncoespasmo, urticária generalizada, e/ou até para reação mais complexa e grave como anafilaxia (PICHLER, 2007).

A penicilina se destaca entre os medicamentos que causam reações imediatas, sendo um dos antibióticos amplamente usados para infecções comuns e ainda é considerado o

tratamento de escolha para muitas infecções. Outros antimicrobianos, AINES e relaxantes musculares também estão envolvidos em tais reações (ROMANO et al., 2011).

A maioria das reações do tipo I apresentam menor gravidade, e apesar disso, qualquer medicamento oferece potencial ameaça à vida, pois os sintomas leves podem ser devidos a uma baixa dose, mas a magnitude da resposta pode aumentar em contato posterior com o mesmo fármaco (PICHLER, 2007; PICHLER et al., 2010).

2.5.2 Reações de hipersensibilidade do tipo II

Ambas as reações dos tipos II e III são mediadas por anticorpos IgG (IgG1 e IgG3) ou IgM competentes para ativar o sistema complemento. São reações que dependem da formação de imunocomplexos e consequente interação com complemento e/ou com receptores Fc presentes em macrófagos, neutrófilos, células NK (células *Natural killer*), granulócitos e plaquetas. No entanto, diferem quanto as suas estruturas alvo e nos efeitos fisiopatológicos gerados (PICHLER, 2007; PICHLER et al., 2010).

Nas reações do tipo II ou citotóxicas, fármacos e/ou seus metabólitos aderem-se a superfície de células (PICHLER, 2007). A consequência dessa resposta é a lise celular proveniente da ativação do sistema complemento e/ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos (CCDA). No primeiro caso, a lise osmótica é provocada pelo complexo de ataque a membrana da célula. No segundo, a apoptose das células-alvo é promovida pelas células NK que se ligam pela porção Fc dos anticorpos, tornando-se ativadas, e, dessa forma, liberam perforinas e granzimas sobre a célula-alvo (KISHIYAMA; TEVRIZIAN; ÁVILA, 2001). Há ainda a possibilidade do fármaco e/ou de seus metabólitos interagirem com estruturas celulares, levando a modificação das mesmas, de forma a gerar neoantígenos e, com isso, produção de auto-anticorpos (PICHLER, 2007).

A anemia hemolítica imune, o pênfigo e a trombocitopenia são manifestações clínicas do tipo II de hipersensibilidade e podem ter início insidioso ou ainda apresentar duas possibilidades, ocorrendo após 5 a 8 dias da administração do medicamento ou após uma única exposição em pacientes já sensibilizados à mesma substância (PICHLER et al., 2010).

2.5.3 Reações de hipersensibilidade do tipo III

A hipersensibilidade do tipo III ou “doença do soro” resulta de deposição de complexos imunes em tecidos e vasos sanguíneos, ativação do sistema do complemento, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de polimorfonucleares que liberam enzimas proteolíticas, originando dano tissular (KISHIYAMA; TEVRIZIAN; ÁVILA, 2001; KOUTKIA et al., 2001). Adicionalmente, anafilatoxinas (C3a e C5a) oriundas da cascata do complemento também contribuem para um maior acúmulo de neutrófilos.

O desenvolvimento de complexos imunes é um evento comum da resposta imune e normalmente não origina problemas, pois os mesmos são rapidamente removidos da circulação pelas células reticuloendoteliais. Porém, algumas condições levam ao acúmulo desses complexos, favorecendo seus depósitos em paredes vasculares, por exemplo, o que leva à ativação de complemento e ao recrutamento de neutrófilos (PICHLER et al., 2010).

Os sintomas clínicos de uma reação do tipo III incluem vasculite, artrite e glomerulonefrite (PICHLER, 2007).

Com uma incidência de 10 a 30 casos/ milhão de pessoas ao ano, a vasculite manifesta-se principalmente na pele como púrpura palpável, e as lesões localizadas nas pernas coalescem formando placas que podem ulcerar. Esse quadro é agravado quando há o envolvimento de órgãos internos como trato gastrointestinal, rins e articulações (PICHLER, 2007).

2.5.4 Reações do tipo IV

Reações do tipo IV ou tardias são mediadas por linfócitos T específicos. Sugeriu-se sua classificação em quatro subtipos baseado na complexidade dos mecanismos imunes envolvidos (PICHLER et al., 2002b). Assim, dependendo do padrão de citocinas produzidas, as quais conduzem a diferentes tipos de resposta imune, e da ativação de determinadas células imunes efetoras como monócitos, eosinófilos ou neutrófilos, as reações tardias são subclassificadas em tipos IVa a IVd (BELLÓN; BLANCA, 2011).

As reações IVa envolvem o perfil Th1 de resposta imune, com ativação e recrutamento de macrófagos/ monócitos através da secreção de interferon gama (IFN- γ), além

de posterior produção de isotipos de anticorpos capazes de fixar complemento e que estão envolvidos nas reações dos tipos II e III (IgG1, IgG3); da atuação como fator coestimulador para uma resposta pró-inflamatória mediada pelas citocinas TNF e IL-12, e para uma resposta de células T CD8. Como resultado dessa ativação de monócitos, podemos citar os testes cutâneos tardios (*epicutaneous tests*), teste tuberculínico, dermatite de contato e granuloma da tuberculose (POSADAS; PICHLER, 2007).

O subtipo IVb corresponde ao perfil Th2 de resposta imune, com secreção das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5, que induzem a formação dos isotipos de imunoglobulinas IgE e IgG4 pelas células B, e da estimulação de mastócitos e eosinófilos (PICHLER, 2007). Altos níveis de IL-5 resultam em uma inflamação eosinofílica, característica presente em muitas manifestações alérgicas como no exantema maculopapuloso, no exantema bolhoso e DRESS (TORRES; MAYORGA; BLANCA, 2009). Essas reações compartilham com as reações imediatas o mesmo mecanismo de produção de IgE.

Nas reações IVc as células T efectoras migram para o local de inflamação e podem levar células tissulares à morte, como hepatócitos ou queratinócitos. Essa atividade citotóxica dos linfócitos T é dependente da molécula Fas ligante (FasL) e das enzimas perforinas/granzimas B, e pode ser oriunda de ambos os subtipos CD4 e CD8. Apesar disso, a citotoxicidade proveniente dos linfócitos T CD8 é mais grave que a provocada pelos linfócitos T CD4, visto que todas as células nucleadas expressam moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e, conseqüentemente, são reconhecidas como alvo para essa população de linfócitos (POSADAS; PICHLER, 2007).

Em geral, as reações IVc possuem um espectro que varia do exantema maculopapuloso, no qual há predomínio de linfócitos T CD4 citotóxico a manifestações mais graves, bolhosas. As reações bolhosas, como SSJ e NET, caracterizam-se por apoptose massiva de queratinócitos decorrente da ação de linfócitos T CD8 (ADAM; PICHLER; YERLY, 2011).

Finalmente, nas reações do tipo IVd, as células T promovem, através da secreção da quimiocina CXCL-8, um infiltrado estéril de neutrófilos na pele característico da AGEF. Apoptose dos granulócitos é impedida pela secreção de fatores estimuladores de crescimento (GM-CSF) secretados pelos linfócitos (PICHLER, 2007).

2.6 Aspectos clínicos

Comumente conhecida como “grande imitadora de doenças”, a reação alérgica mimetiza uma variedade de enfermidades, tais como exantema induzido por vírus, doenças do colágeno, neoplasias, infecções bacterianas e psoríase (SCHNYDER, 2010). Com isso, o diagnóstico diferencial dessas condições cutâneas representa um desafio e é de fundamental importância.

As reações alérgicas a fármacos afetam um ou múltiplos órgãos e resultam em diferentes padrões clínicos. O acometimento desses órgãos pode desencadear hepatite, nefrite, cardite, pneumonia (PICHLER et al., 2010), linfadenopatia, artralgias e distúrbios hematológicos (KHAN; SOLENSKY, 2010). No entanto, as manifestações mais comuns envolvem a pele, seja de forma isolada ou como resultado de um comprometimento sistêmico (GHOSH et al., 2011).

Dentre as manifestações cutâneas de hipersensibilidade a fármacos, aquelas mais frequentes e brandas são a erupção maculopapulosa ou exantema generalizado, a urticária e o angioedema. Entre as formas de manifestações cutâneas de maior gravidade, destacam-se a SSJ, a NET, a DRESS e a AGEP (KHAN; SOLENSKY, 2010; SCHNYDER, 2010).

A anafilaxia é uma reação grave que envolve múltiplos órgãos, cuja apresentação clínica é variável e seus sintomas típicos são prurido palmar e/ou plantar, urticária e angioedema. Sintomas adicionais incluem náusea, dor abdominal, vômitos, diarreia, obstrução respiratória, eventos cardiovasculares, estado mental alterado e síncope (SCHNYDER, 2010).

A SSJ e a NET são caracterizadas pelo desenvolvimento de bolhas subepidérmicas e posterior destacamento de grandes extensões da epiderme, com taxa de mortalidade oscilando entre 10 e 50%. A DRESS, também conhecida como síndrome de hipersensibilidade, é caracterizada por *rash* com envolvimento de órgãos, alterações hematológicas e reativação do vírus herpes (BELLÓN; BLANCA, 2011).

2.7 Diagnóstico clínico

A investigação clínica das reações de hipersensibilidade a medicamentos baseia-se na correlação temporal da exposição ao mesmo, nas características clínicas apresentadas, no mecanismo de ação da substância envolvida e na história prévia de reação alérgica (Quadro 1) (SCHNYDER, 2010). De maneira geral, estas informações não definem o caso, sendo de extrema valia a abordagem laboratorial para conclusão do diagnóstico.

Quadro 1. Informações essenciais na investigação de pacientes com alergia a fármacos.

- Lista detalhada de todas as medicações utilizadas (prescritas e não prescritas)
Identificação, dose, intervalo da dose, duração de tratamento
Indicação médica ou doença subjacente
- Relação temporal dos sintomas com a administração de cada fármaco
- Descrição detalhada da reação
Cronologia do surgimento dos sintomas, duração e curso
Órgãos ou sistemas (cutâneo, respiratório, gastrointestinal) envolvidos
Natureza e características da reação
- Conduta terapêutica utilizada
- História prévia pessoal
Reações alérgicas a fármacos e resolução do quadro após descontinuação do tratamento
Contato com os fármacos suspeitos e outros quimicamente relacionados
Presença de co-morbidades (infecções virais, desordens hepáticas ou renais)
Sintomas semelhantes à da reação na ausência de farmacoterapia
- História familiar de reação alérgica
- Reexposição ao fármaco suspeito ou compostos similares

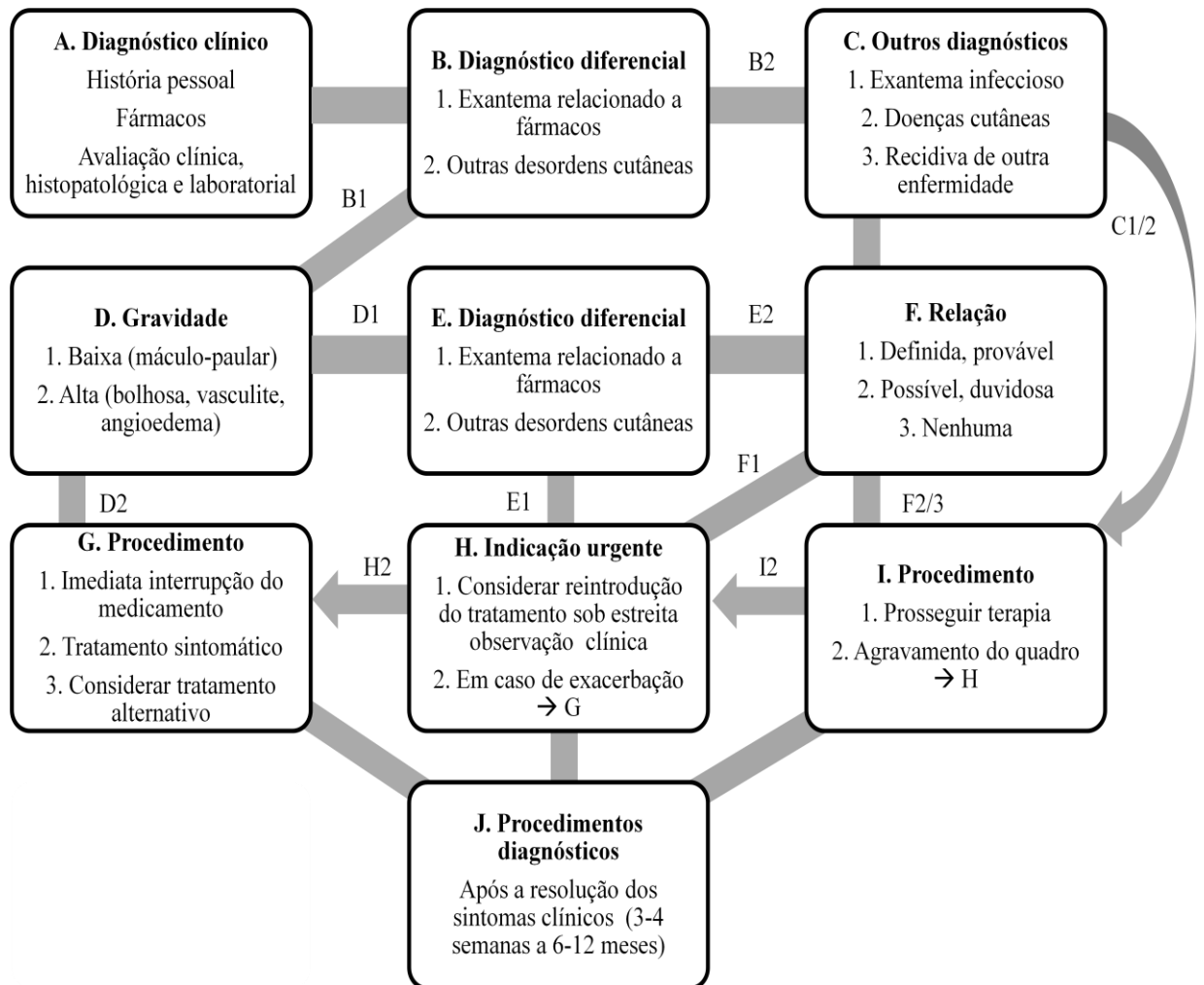
Fontes: MIRAKIAN et al., 2009; SCHNYDER, 2009, 2010; KHAN; SOLENSKY, 2010.

Sob o ponto de vista clínico, as RAs são classificadas com base no intervalo de tempo entre a administração do fármaco e o início dos sintomas, em reações imediatas, aceleradas e tardias. De forma resumida, as reações imediatas são decorrentes da degranulação dos mastócitos e surgem em poucos minutos à uma hora; e as reações não-imediatas (principalmente mediadas pelas células T) abrangem as formas aceleradas e tardias, e ocorrem dentro de horas, dias ou semanas após exposição ao fármaco (TORRES;

MAYORGA; BLANCA, 2009). Essa classificação objetiva reduzir o leque de possíveis diagnósticos e ajudar no manejo terapêutico (SCHNYDER, 2010).

Uma história clínica detalhada é o primeiro passo na avaliação de pacientes com suspeita de hipersensibilidade a fármacos (Figura 1) (KHAN; SOLENSKY, 2010). A aplicação de um questionário padronizado facilita na completa investigação das fases aguda e remissiva das lesões, pois aborda aspectos clínicos e laboratoriais importantes (DEMOLY et al., 1999).

Figura 1. Algoritmo da abordagem clínica de paciente com suspeita de hipersensibilidade a fármacos.



O diagnóstico inicial da reação alérgica consiste em cuidadosa anamnese sobre a história de alergia, compreendendo detalhes da administração do fármaco, principalmente quando vários medicamentos podem estar envolvidos, do início e da resolução das manifestações (MIRAKIAN et al., 2009). Essa análise é realizada em conjunto com a investigação clínica durante a reação de sinais e sintomas como febre, linfadenopatia, icterícia e minucioso exame físico incluindo avaliação da morfologia, distribuição e evolução das lesões cutâneas e de membranas mucosas. Adicionalmente, parâmetros laboratoriais podem auxiliar no diagnóstico dessas reações, tais como eosinofilia, neutrofilia, presença de linfoblastos ou citopenia, enzimas hepáticas e bilirrubina alteradas, dosagem de creatinina, proteinúria, exame histopatológico, teste de Coombs no caso de suspeita de anemia hemolítica imune e determinação de frações do complemento (C3, C4) nas reações do tipo III como doença do soro (BIRCHER, 2007; SCHNYDER, 2009, 2010).

Com base nessas informações, é possível especificar o tipo de manifestação, diferenciando-a de outras desordens cutâneas, e ainda orientar o clínico na seleção de ferramentas diagnósticas apropriadas e capazes de apontar o agente causal. Os fármacos suspeitos devem ser imediatamente descontinuados, principalmente quando há sinais de perigo ou envolvimento de órgãos internos. Quando necessário, um tratamento sintomático deve ser iniciado (BIRCHER, 2007).

2.8 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo das reações de hipersensibilidade é referido como problema na rotina clínica. As inúmeras razões que justificam essa dificuldade são: tratamento com múltiplos fármacos, envolvimento de diferentes mecanismos imunopatogênicos, desconhecimento do epítopo implicado na resposta, limitações à aplicabilidade do teste referência, principalmente no caso de reações graves, e ainda a possibilidade de outros padrões de resposta frente a novos agentes terapêuticos (EBO et al., 2011).

Os testes diagnósticos têm como finalidade confirmar a suspeita de reação alérgica e identificar o agente causador (BEELER; PICHLER, 2007). Diante desses resultados, busca-se prevenir a recorrência das manifestações evitando o uso do próprio

fármaco implicado e de outros compostos quimicamente relacionados e fornecer alternativas seguras de tratamento para o paciente (EBO et al., 2011).

Considerando como responsáveis de uma reação o próprio fármaco, ou seu metabólito, ou ainda outros componentes da formulação, torna-se praticamente impossível a existência de testes diagnósticos padronizados para todos esses agentes suspeitos. Os testes disponíveis atualmente carecem de sensibilidade além de apresentarem outras limitações, como ausência de cofatores presentes no momento da reação e possibilidade de reações de hipersensibilidade não-alérgica (TORRES; MAYORGA; BLANCA, 2009). Portanto, pouquíssimos testes estão validados e disponíveis no mercado e, geralmente, permitem apenas a detecção de reações mediadas por IgE (PICHLER; TILCH, 2004).

A escolha do método laboratorial de diagnóstico das RAs é realizada conforme o tipo de resposta imune (Quadro 2). Nas reações imediatas, destacam-se os testes cutâneos, a determinação dos níveis séricos de IgE específica (RAST ou *radioallergosorbent test*) e o teste de ativação de basófilos (BAT). Nas reações do tipo IV, os testes epicutâneos (*patch test*) e intradérmicos de leitura tardia podem auxiliar na identificação de reações mediadas por células T.

Quadro 2. Testes diagnósticos conforme o tipo de reação de hipersensibilidade a fármacos.

Tipo de reação	Tipos de testes
Imediatas	<i>In vivo</i> Testes cutâneos Teste de provocação <i>In vitro</i> Pesquisa de IgE específica Teste de ativação de basófilos (BAT)
Não-imediatas	<i>In vivo</i> Testes intradérmicos de leitura tardia Testes epicutâneos Testes de provocação <i>In vitro</i> Teste de transformação linfocitária (LTT) Análise de marcadores de ativação celular Análise de citocinas secretadas Ensaio de citotoxicidade

Fontes: LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009; ROMANO et al., 2011.

2.8.1 Testes *in vivo*

Os testes *in vivo* incluem os testes cutâneos, que são divididos em teste de puntura (*prick test*), intradérmicos e epicutâneos (*patch test*), e os testes de provocação com o fármaco suspeito.

Os testes de provocação oral são considerados padrão-ouro no diagnóstico das RAs, porém não distinguem reações alérgicas de não-alérgicas, e seu uso é restrito devido à possibilidade de reproduzir reações graves (BEELER; PICHLER, 2007). Esses testes não estão padronizados para identificar reações não-imediatas, já que podem surgir após altas doses e extensos tratamentos (LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009). Um resultado negativo é importante porque permitirá o uso seguro do fármaco no futuro (MESSAAD et al., 2004).

Os testes cutâneos avaliam a sensibilidade a alguns fármacos de baixo peso molecular (penicilina, barbituratos e relaxantes musculares) que atuam como haptenos, conjugando-se a uma proteína carreadora para indução de resposta imune específica. Apesar de seu uso ser limitado para outros medicamentos devido ao desconhecimento dos determinantes antigênicos, este é o único teste validado na literatura para diagnóstico de reações do tipo I a penicilina (PARK; LI, 2005). O teste positivo para determinantes principais e secundários da penicilina apresenta um valor preditivo positivo de 50% e valor preditivo negativo de 96-99% (LIEBERMAN et al., 2005).

O teste de puntura, por ser mais seguro e de fácil execução, deve ser realizado inicialmente, e somente quando apresenta resultado negativo, o teste intradérmico deve ser realizado. Embora os testes intradérmicos sejam mais sensíveis que o teste de puntura, trazem maior risco de resultados falso-positivos e também de induzirem reações mais graves no paciente (BROCKOW et al., 2002).

Nas reações do tipo IV, os testes epicutâneos podem auxiliar na identificação de reações mediadas por células T. A limitação do teste epicutâneo decorre do envolvimento de diferentes populações de células T, do veículo, do local de aplicação, e dos fármacos disponibilizados (ADKINSON JR et al., 2002). Sua especificidade diagnóstica e seu valor preditivo negativo não foram determinados (BARBAUD, 2005).

O teste intradérmico de leitura tardia é geralmente mais sensível que o teste epicutâneo, porém não são recomendados para utilização em casos de SSJ, NET, DRESS e vasculite leucocitoclástica, uma vez que podem reproduzir tais reações (BARBAUD, 2009). O valor preditivo negativo do teste é geralmente baixo, de modo que um resultado negativo não exclui a hipótese de alergia medicamentosa (BROCKOW et al., 2002).

Em virtude do risco de se reproduzir uma nova reação e da baixa sensibilidade desses testes até em pacientes com história bem caracterizada de RA, recomenda-se a realização de testes *in vitro* (BEELER; PICHLER, 2007).

2.8.2 Testes *in vitro*

O teste *in vitro* tem a vantagem de ser um procedimento seguro para o paciente, evitando nova sensibilização ou risco de uma reação grave e ainda pode colaborar na compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos. No entanto, muitos desses testes não estão padronizados, são aplicados apenas em pesquisas e são úteis somente para alguns tipos de hipersensibilidade, como as reações imediatas e tardias (POREBSKI; GSCHWEND-ZAWODNIAK; PICHLER, 2011).

A dosagem da triptase, uma protease específica da ativação dos mastócitos, auxilia no diagnóstico da fase aguda das RAs, pois seu nível rapidamente se eleva indicando ambas as reações anafiláticas e anafilatóides, porém não identifica sua causa específica (MIRAKIAN et al., 2009).

A determinação dos níveis séricos de IgE específica ao fármaco é rotineiramente empregada no diagnóstico de reações imediatas. Os testes RAST (*radioallergosorbent test*) e seu variante CAP-FEIA (*fluorescent enzyme immunoassay*) são baseados na quantificação de anticorpos IgE específicos ligados ao conjugado hapteno-carreador fixado em uma fase sólida (MAYORGA et al., 2010). No entanto, tais testes apresentam algumas limitações, como disponibilidade para poucos fármacos, baixa sensibilidade, interferência de anticorpos IgG específicos, além de que a estrutura imunogênica de muitos medicamentos ainda é desconhecida. Novos métodos necessitam ser desenvolvidos para identificação de potenciais determinantes imunogênicos dos fármacos suspeitos de produzir reações mediadas por anticorpos IgE (ADKINSON JR et al., 2002).

O teste de ativação de basófilos (BAT) tem sido empregado para detecção de processos alérgicos mediados por IgE, principalmente a betalactâmicos, relaxantes musculares e AINES. Esta técnica é baseada no fato que basófilos sensibilizados com IgE degranulam após incubação com o fármaco implicado, expressando em sua superfície altos níveis de marcadores de ativação que podem ser medidos por citometria de fluxo. Dessa forma, os basófilos são identificados com anticorpos anti-IgE e avaliados quanto à ativação pelos anticorpos anti-CD63 (MAYORGA et al., 2010).

O BAT é mais sensível e específico que outros testes diagnósticos, sendo particularmente útil no diagnóstico de reações a fármacos que não são detectados por técnicas sorológicas (SANZ; GAMBOA; DE WECK, 2008). No entanto suas limitações decorrem da possibilidade de outros mecanismos de ativação de basófilos, como observado com produtos do sistema complemento; e do amplo uso de marcadores não exclusivos aos basófilos como os anticorpos IgE e a molécula CD63. Outros marcadores mais específicos têm sido sugeridos (CD203c), mas necessitam de extensos estudos de validação (DE WECK et al., 2008).

O teste de ativação de células T é utilizado apenas em pesquisas, e avalia a proliferação de linfócitos T na presença de concentrações não-tóxicas do fármaco suspeito em cultura. Diferentes métodos podem revelar a cascata de eventos que levam à completa ativação de células T de memória após o reconhecimento do antígeno. O mais comum é o teste de transformação linfocitária (LTT), que mede a incorporação de timidina tritiada durante a síntese de DNA no processo de divisão celular (PICHLER; TILCH, 2004). Os resultados são expressos como índice de estimulação (SI- *stimulation index*), que é calculado pela taxa de proliferação na presença do fármaco dividido pela taxa de proliferação na ausência do mesmo.

Atualmente existem marcadores não-radioativos que são utilizados nos testes linfoproliferativos, como o fluorocromo CFSE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster), o corante BrdU (bromodeoxiuridina) que pode ser analisado por imunohistoquímica ou seus análogos, como o fluorocromo EdU (etildeoxiuridina), e os indicadores de oxi-redução alamar blue e brometo de tetrazolium. No entanto, esses métodos não foram validados para diagnóstico das reações de hipersensibilidade a fármacos (EBO et al., 2011).

Devido ao envolvimento das células T na produção dos isotipos IgG e IgE, o LTT tem sido aplicado e é útil no diagnóstico de hipersensibilidade imediata e especialmente nas

reações mediadas por células T (LUQUE et al., 2001). Embora essa técnica seja capaz de determinar reações de diferentes mecanismos e de analisar a resposta a múltiplos fármacos, o seu resultado negativo não descarta RA e o seu resultado positivo não significa necessariamente que o paciente irá se tornar sensibilizado frente a uma nova exposição ao medicamento (PICHLER; TILCH, 2004; KANO et al., 2007).

2.9 Novas perspectivas diagnósticas

Nos últimos anos, novas técnicas têm surgido como aprimoramento dos ensaios de proliferação linfocitária, incluindo a análise do potencial citotóxico das células efectoras, avaliação de citocinas secretadas (IL-2, IL-5, IL-13 e IFN- γ) e a expressão de marcadores de ativação celular, como CD69.

2.9.1 Ensaios de citotoxicidade

Linfócitos citotóxicos (células T e NK) medeiam a morte de células-alvo através do contato célula a célula por mecanismos mediados pelo conteúdo de grânulos (granzimas/perforinas e granulinas) e por receptores (Fas-FasL), e finalmente, através das citocinas IFN- γ e TNF- α , que atuam mais distalmente. Embora os mecanismos citotóxicos estejam presentes em muitas reações tardias a fármacos, incluindo reações maculopapulosas, bolhosas e pustulosas, os testes que detectam essa função efectora das células T ainda são bastante limitados. Constituem-se, no entanto, como ferramentas promissoras para o diagnóstico das RAs, e representam uma alternativa ou complemento aos ensaios de proliferação (LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009; POREBSKI; GSCHWEND-ZAWODNIAK; PICHLER, 2011).

2.9.2 Análise de marcadores de ativação celular

Os linfócitos T possuem um papel central nas reações de hipersensibilidade a fármacos, pois estão envolvidos na patogênese de todos os seus tipos. As respostas imunes

reguladas por essas células iniciam-se com o reconhecimento específico pelo receptor de células T a antígenos acoplados ao MHC e levam a uma cascata de eventos que resultam na ativação dos linfócitos T, incluindo o recrutamento de moléculas coestimulatórias e de adesão, expressão de receptores de citocinas, e de outras moléculas de superfície celular, produção e secreção de citocinas (PICHLER; TILCH, 2004; LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009).

Diferentes moléculas de superfície são expressas em variados estágios de ativação das células T, tais como CD69, CD71, CD25, e HLA-DR. A molécula CD69 é um dos marcadores mais precoces de ativação, com baixa expressão basal nas células sanguíneas e que após estimulação do complexo TCR/CD3, é expresso de 2 a 4 horas principalmente nas células T, e também em células B, macrófagos (STARSKA et al., 2011) e células NK (LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009). O antígeno CD69 está envolvido na transmissão de sinais coestimulatórios, conduzindo à síntese de várias citocinas como IL-2, IFN- γ e o receptor de interleucina 2 (IL-2R). O marcador CD25 faz parte do IL-2R e está expresso constitutivamente nos subtipos de linfócitos, porém após ativação dessas células, apresentam sua densidade elevada (REDDY et al., 2004).

A análise desses antígenos por citometria de fluxo, a qual utiliza anticorpos marcados com fluorocromos, permite identificar linfócitos ativados especificamente pelos fármacos (EBO et al., 2011). No entanto, muitas pesquisas têm referido a detecção desses parâmetros após estimulação com vários mitógenos ou superantígenos e, até o momento, apenas um estudo investigou o emprego do marcador CD69 no diagnóstico das reações de hipersensibilidade tardia a fármacos (BEELER et al., 2008). Estes autores evidenciaram considerável expressão do antígeno CD69 nas amostras de células mononucleares de sangue periférico de todos os pacientes avaliados, e positivos ao LTT.

Uma melhor análise das células T positivas para CD69, Beeler et al. (2008) observaram que os fármacos estimulam reduzido número dessas células, apesar de sua elevada frequência. Essas células T específicas produzem citocinas capazes de ativar outras células, que por sua vez expressam CD69. Esta resposta amplificada aumentou a sensibilidade, sem prejuízo da especificidade desse ensaio. Além disso, o uso do marcador de ativação CD69 mostrou ser específico para os fármacos e proporcionou inúmeras vantagens sobre o LTT, como a redução do tempo de incubação das células de 7 dias para 48 h, a não

necessidade do uso de isótopos radioativos (timidina tritiada) ou de corantes, e sua possível aplicação em rotina diagnóstica.

2.9.3 Análise da produção de citocinas

Linfócitos ativados produzem várias citocinas que estão envolvidas na fase efetora da resposta imune e podem ser detectadas intracelularmente ou no sobrenadante de cultura de células.

Alguns estudos têm apontado um padrão misto (Th1/Th2) e heterogêneo (Th0) de citocinas nas reações alérgicas, dificultando a clássica correlação de reações tardias com a produção de citocinas do perfil Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) e de reações imediatas com as citocinas Th2 (IL-4 preferencialmente) (LOCHMATTER; ZAWODNIAK; PICHLER, 2009). Isso também dificulta a correlação de certo perfil de citocinas com seu fenótipo clínico (POREBSKI; GSCHWEND-ZAWODNIAK; PICHLER, 2011).

O IFN- γ e a IL-5 são citocinas predominantes nas RAs cutâneas e têm sido propostos como ferramentas úteis na identificação do fármaco responsável pelas reações tardias. A combinação entre essas citocinas e/ou com outras técnicas tem demonstrado melhoria na sensibilidade desses ensaios (POREBSKI; GSCHWEND-ZAWODNIAK; PICHLER, 2011). Recentes estudos verificaram maior sensibilidade de IL-5 e IFN- γ quando medidos em conjunto por ensaio imunoenzimático ligado à fase sólida (ELISA- *enzyme-linked immuno sorbent assay*) e citometria de fluxo (MARTIN et al., 2010).

Lochmatter et al. (2009) avaliaram um painel de 17 citocinas e quimiocinas na tentativa de identificar os melhores parâmetros para o diagnóstico de hipersensibilidade tardia a medicamentos. Quatro citocinas foram significativamente importantes, e destas, IL-2, IL-13 e IFN- γ mostraram ser mais sensíveis que IL-5, que por sua vez apresentou melhor especificidade. Dessa forma, a associação de um marcador específico (IL-5) com outro sensível (IL-2, IL-13 ou IFN- γ) fornece uma pesquisa promissora na detecção e caracterização do perfil das células T sensibilizadas a fármacos.

3 JUSTIFICATIVA

As reações de hipersensibilidade a fármacos representam importante problema de saúde pública com significativa percentual de morbidade e mortalidade. Os principais desafios dessas reações decorrem de sua imprevisibilidade, inexistência de modelo animal para seu estudo e da variabilidade individual quanto ao metabolismo do fármaco (ADKINSON et al., 2002).

O diagnóstico conclusivo das reações alérgicas com identificação do agente desencadeante e o fornecimento de alternativas de tratamento seguras para o paciente são fundamentais para evitar futuras exposições. No entanto, tais reações são difíceis de serem identificadas, uma vez que há carência de métodos laboratoriais para sua investigação.

Os testes *in vitro* são de grande interesse, pois garantem segurança para o paciente e permitem avaliação simultânea a múltiplos fármacos. Apesar disso, muitos desses testes não estão padronizados, são aplicados apenas em pesquisas, e apresentam boa especificidade, mas relativamente baixa sensibilidade.

Nos últimos anos, novas perspectivas diagnósticas têm surgido como aprimoramento dos ensaios de proliferação linfocitária, e constituem potentes instrumentos capazes de auxiliar no diagnóstico e na caracterização de reações de hipersensibilidade a fármacos.

Este tema é inovador em nosso país, visto que a realização da investigação de pacientes com suspeita de alergia a fármacos é ainda restrita a alguns pesquisadores.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A expressão de marcadores de ativação dos linfócitos T juntamente com a análise de citocinas secretadas no sobrenadante da cultura de células mononucleares de pacientes representam um instrumento de potencial utilidade no diagnóstico de alergia a fármacos.

A possível aplicação desses testes em rotina diagnóstica poderá representar um grande benefício ao paciente, caso seja provada sua utilidade, uma vez que permitirá a confirmação do diagnóstico de hipersensibilidade alérgica a fármacos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar marcadores de ativação de linfócitos T e de suas citocinas como ferramentas diagnósticas na hipersensibilidade alérgica a fármacos.

5.2 Objetivos específicos

- Investigar, através de testes cutâneos e epicutâneos, os pacientes com provável reação alérgica aos medicamentos acompanhados no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio;
- Desenvolver um teste de imunofenotipagem para detecção de CD69 e CD25 em células mononucleares do sangue periférico CD4 e CD8 positivas incubadas com diferentes concentrações do fármaco suspeito.
- Avaliar os índices de estimulação dos marcadores de ativação CD69 e CD25 em células CD4 e CD8 positivas, incubadas com diferentes concentrações do fármaco suspeito, de pacientes com hipersensibilidade a fármacos e em indivíduos não alérgicos saudáveis;
- Quantificar as citocinas IFN- γ e IL-5 no sobrenadante de cultura;
- Associar os dados laboratoriais com o tipo de manifestação clínica dos pacientes.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos

O presente projeto, sob o código 011.03.08, foi aprovado no dia 28 de abril de 2008 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Universidade Federal do Ceará (Anexo B). Todos os participantes assinaram os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos C, D e E), após devido esclarecimento sobre o projeto.

6.2 Casuística

Foram avaliados 53 pacientes adultos com manifestações muco-cutâneas e/ou sistêmicas decorrentes de reações de hipersensibilidade alérgica a fármacos atendidos no Ambulatório de Dermatologia do HUWC pela médica dermatologista Profa. Dra. Thereza Lúcia Prata de Almeida.

A investigação das reações alérgicas nos pacientes foi feita através de entrevista com um questionário (Anexo F) abordando a história clínica e familiar, dados referentes aos medicamentos utilizados (correlação temporal de exposição ao fármaco e as manifestações cutâneas, dose, via de administração), características clínicas e evolutivas das lesões, além de achados laboratoriais de rotina e exame histopatológico quando disponíveis. A seguir, as reações foram classificadas de acordo com os critérios de probabilidade (Quadro 3).

Critérios de inclusão: pacientes adultos com idade acima de 18 anos com quadro de hipersensibilidade relacionado a fármacos, os quais atenderam aos critérios abordados no questionário referentes à investigação clínica e laboratorial, e que foram classificados nas categorias A e B de probabilidade para reação alérgica a medicamentos.

Critérios de exclusão: pacientes com idade abaixo de 18 anos com quadro de hipersensibilidade não relacionado a fármacos, gestantes, ou aqueles que foram classificados nas categorias C e D de probabilidade para reação alérgica a medicamentos.

Quadro 3. Classificação de probabilidade para reação alérgica a fármacos.

Categoria	Critérios	Classificação
A	O teste de provocação oral com o fármaco induziu uma reação positiva, ou, O fármaco suspeito produziu as mesmas reações alérgicas quando utilizado novamente pelo paciente, ou, Clara história de relação do fármaco com a reação.	Definida
B	Evidente correlação temporal entre exposição ao fármaco e sintomas.	Provável
C	Anamnese confusa, pouco conhecimento sobre a relação do fármaco na reação.	Menos provável
D	Exposição tardia ao fármaco não produziu qualquer reação ou, Os sintomas corresponderam a uma reação não-imunológica.	Negativa

Fonte: Nyfeler; Pichler (1997).

Dentre os 53 pacientes avaliados, 20 preencheram os critérios de inclusão e dessa forma foram convidados a prosseguirem com a investigação de testes *in vivo* e *in vitro*.

Procurou-se selecionar como controle nos testes *in vitro* uma média de 4 amostras de sangue de voluntários clinicamente saudáveis e sem história prévia de alergia para cada medicamento avaliado.

A seguir descrevemos a metodologia dos testes empregados na investigação das reações alérgicas.

6.3 Testes *in vivo*

Os testes epicutâneos foram realizados pela farmacêutica Luciana Mabel Ferreira Vasconcelos no ambulatório de Dermatologia, através de protocolo descrito por Barbaud et al. (2001) e Brockow et al. (2002). Os testes cutâneos (puntura) foram realizados pela Dra. Thereza Lúcia Prata de Almeida, em uma sala de pulsoterapia do hospital, a qual contava com um serviço de suporte para atendimento de emergência.

A investigação *in vivo* foi realizada após a resolução dos sintomas clínicos de pelo menos três semanas após a interrupção de terapia corticóide ou imunossupressora.

Teste de puntura (prick test)

O teste de puntura foi utilizado na avaliação de hipersensibilidade imediata a fármacos. Os pacientes foram orientados a interromper o uso de anti-histamínicos pelo menos 5 dias antes da realização desse teste (BROCKOW et al., 2002).

O teste foi realizado na face anterior do antebraço, com diluições seriadas da forma comercial do medicamento ou quando possível, da própria substância pura. Os fármacos foram previamente diluídos e testados em diferentes concentrações (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} e puro). Salina a 0,9% e histamina (10 mg/mL, Immunotech) serviram como controles negativo e positivo respectivamente. O teste foi aplicado com uma lanceta posicionada a 90° e pressionada por 5 segundos sobre cada gota de solução. Após secagem com papel toalha e aguardados 20 minutos, efetuou-se a leitura. Quando houve a formação de um halo eritematoso de pelo menos 3 mm de diâmetro maior que o do controle negativo, a resposta foi considerada positiva e o teste foi encerrado. A leitura desse teste foi avaliada como positiva ou negativa, em base qualitativa.

Teste epicutâneo ou “patch” test

O teste epicutâneo, utilizado na avaliação de hipersensibilidade tardia a fármacos, foi realizado na pele intacta do dorso do paciente, com câmaras de alumínio (Finn Chambers)

montadas sobre fitas adesivas (Scanpor). As substâncias testadas foram adquiridas em sua forma pura e, quando não disponível, em sua forma comercial, e previamente à sua aplicação, foram diluídas em veículo adequado a concentrações estabelecidas segundo Barbaud (2009). Após 48h, o contensor foi retirado, e depois de 20 min, realizou-se a primeira leitura. Quando negativo, leituras posteriores foram efetuadas nos dias 3 e 7 após a data de aplicação do teste. Os resultados foram baseados nos critérios estabelecidos pelo International Contact Research Group (ICDRG), em reação negativa, reação duvidosa ou positiva (+, ++, +++) (LACHAPELLE; MAIBACH, 2009).

Dez voluntários saudáveis participaram do estudo, após consentimento. Os mesmos serviram como controle negativo, sendo testados para todos os fármacos suspeitos de causarem reações não-imediatas e nas mesmas condições aplicadas para os pacientes.

6.4 Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico com os fármacos suspeitos

O procedimento foi realizado conforme descrito por Pichler e Tilch (2004), somente com algumas modificações. Os pacientes estavam em estado de remissão clínica no momento da análise. Um volume de 10 ml de sangue periférico foi coletado com anticoagulante heparina de sódio (Sarstedt, Germany) por punção venosa dos controles sadios e dos pacientes. As amostras foram levadas para o Laboratório de Imunologia Médica onde as análises foram processadas sob supervisão e colaboração da Prof^a. Lília Maria Carneiro Câmara, do Departamento de Medicina Legal e de Patologia, Universidade Federal do Ceará.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC- *peripheral blood mononuclear cells*) foram separadas por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, USA) na proporção de 1:3 a 2000 rpm por 30 min a 21°C. O anel esbranquiçado contendo as células mononucleares foi retirado e após duas lavagens com salina estéril a 1500 rpm por 10 min a 5°C, tais células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com bicarbonato de sódio (2 g/L), l-glutamina (2,05 mM) (LGC Biotecnologia) e 10% de *pool* de soro AB inativado (preparado a partir de 50 amostras de soro AB obtidas no banco de sangue com sorologia negativa para HIV, Chagas, hepatites B e

C, vírus T-linfotrófico humano e sífilis). Um volume de 10 μL de suspensão de células diluídas a 1:100 em azul de Trypan a 0,4% foi aplicado em uma câmara de Neubauer e visualizado em aumento de 20x com auxílio de um microscópio invertido (Zeiss, Germany) para contagem do número de células. A concentração de células foi ajustada para uma concentração de 1×10^6 células/ mL. Em seguida, as mesmas foram incubadas (em duplicata) em microplacas de cultura de 24 poços (TPP, Switzerland) na presença de três concentrações distintas do fármaco suspeito (Sigma, USA), ou de salina tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS) e fitohemaglutinina (2,0 $\mu\text{g/mL}$, PHA, Sigma, USA) como controles negativo e positivo respectivamente, por 72 h a 37°C e 5% CO_2 .

6.5 Imunofenotipagem e ativação linfocitária

A detecção dos marcadores de ativação linfocitária foi baseada nos procedimentos de Beeler et al. (2008). Após incubação de 72h, um volume de 0,5 mL de solução foi retirado de cada poço e armazenado em tubos eppendorf a -80° C para posterior análise de citocinas. Quanto ao restante da suspensão contendo as células, um volume de 0,5 mL de solução de FACS {PBS, contendo azida 0,05% e soro fetal bovino 1% (Cultilab, Brasil)}, foi adicionado aos poços e, com auxílio de uma pipeta, as mesmas foram desprendidas das paredes e do fundo dos poços. Após transferência para tubos eppendorf, as células foram centrifugadas na velocidade de 1500 rpm por 10 min a 5°C. O sobrenadante foi desprezado e, ao sedimento, foram adicionados 250 μL de RPMI 1640 suplementado com bicarbonato de sódio (2 g/L), L-glutamina (2,05 mM) (LGC Biotecnologia, Brasil) e 5% de *pool* de soro AB inativado. As amostras de células, que foram inicialmente incubadas com os fármacos ou controles em duplicatas, foram, a partir desse momento, reunidas em um só tubo. Deste, volumes de 125 μL foram distribuídos em 4 tubos de citometria. A seguir, os conjugados de anticorpos monoclonais com fluorocromos foram adicionados aos tubos, segundo a ordem: tubo 1, sem adição de anticorpos; tubo 2, anti CD4-FITC; tubo 3, anti CD8-PerCP; tubo 4, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PerCP, anti-CD69-PE, anti-CD25-APC. O volume de cada anticorpo foi estabelecido conforme prévia titulação (item 6.6), sendo que para anti-CD4 e anti-CD8, aplicou-se o volume de 2 μL e para anti-CD69 e anti-CD25, de 5 μL . Após incubação durante 30 min em câmara escura a 4°C, foi realizada uma lavagem com tampão de FACS. O

sobrenadante foi descartado após centrifugação a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Ao sedimento final, foram adicionados 500 µL PBS contendo paraformaldeído 1% (Sigma, USA). Os tubos foram armazenados no escuro a 4°C até a leitura (máximo de 24 horas) em citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience, USA).

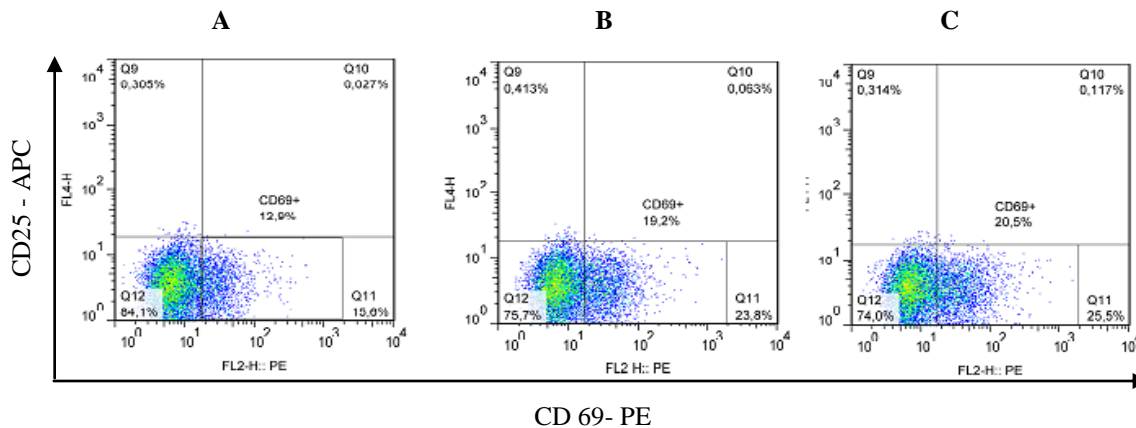
Os resultados foram expressos de acordo com Beeler et al. (2008), como média normalizada de intensidade de fluorescência (NMFI- *normalized mean fluorescence intensity*), na qual foi obtida por multiplicação da percentagem de linfócitos no quadrante duplamente positivo com a média de intensidade de fluorescência de CD69⁺ ou CD25⁺. Em seguida, o índice de estimulação (SI) foi calculado pela seguinte fórmula: NMFI do meio de cultura com antígeno dividida por NMFI do meio de cultura sem antígeno. O resultado de SI igual ou superior a 2,0 foi considerado positivo, segundo proposto por Pichler; Tilch (2004) e Beeler et al. (2008).

6.6 Titulação dos conjugados de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos

Os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos foram titulados previamente ao seu emprego nos testes de citometria de fluxo. A titulação dos mesmos foi realizada para uma concentração fixa de células mononucleares do sangue periférico, ou seja, de 1×10^6 células/mL, variando a concentração de anticorpo adicionado (2 e 4 µL para anti-CD4 e anti-CD8; 3, 5 e 7 µL para anti-CD69 e anti-CD25). A escolha do volume de anticorpo foi baseada na percentagem da população positiva, bem como na média de intensidade de fluorescência, considerando a densidade dos receptores presentes na célula. No caso dos marcadores de ativação, ou seja, tanto para anti-CD69, como para anti-CD25, as células foram incubadas com 2,0 µg/mL de PHA.

A Figura 2 exemplifica a curva de titulação para o anticorpo CD69. Nesse caso, foi escolhido o volume de 5 µL de anticorpo.

Figura 2. Curva de titulação para CD69 empregando a fitohemaglutinina. As percentagens de células positivas para o marcador CD69 foram 15,6% para 3µl de anticorpo (A), 23,8% para 5µl (B) e 25,5% para 7µl (C). A média de intensidade de fluorescência para CD69 foi de, respectivamente, 13, 17 e 19.



6.7 Análise de citocinas

Os testes imunoenzimáticos para dosagem de IL-5 e IFN- γ em sobrenadante de cultura foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Dosagem de IL-5 e IFN- γ

O método imunoenzimático para dosagem de IL-5 e IFN- γ em sobrenadante de cultura foi o ensaio imunoenzimático ligado à fase sólida (ELISA) (RayBiotech, USA).

As amostras de sobrenadante de cultura de pacientes e de 3 controles foram descongeladas antes do uso e mantidas a temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL das amostras dos pacientes e dos padrões foram adicionadas a cada poço da microplaca já sensibilizada com anticorpos específicos. As placas foram incubadas durante 16h a 4°C, em câmara úmida e sob leve agitação. Após esse período, a placa foi submetida a um ciclo de 4 lavagens com solução de lavagem fornecida pelo fabricante. Em seguida, foram adicionados

100 µL de conjugado anti-IL-5 ou anti-IFN- γ , marcados com biotina e diluídos a 1:80 em solução diluente. As placas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente, em câmara úmida e sob leve agitação. Após novas lavagens, foram adicionados 100 µL de solução diluída a 1:10000 ou 1:20000 (respectivamente para os testes de IL-5 ou IFN- γ) de estreptavidina conjugada com peroxidase por 45 min a temperatura ambiente, em câmara úmida e sob leve agitação. As placas foram submetidas a novos ciclos de lavagens, sendo, a seguir, adicionados 100 µL da solução de substrato contendo tetrametilbenzidina. Após incubação de 30 min a temperatura ambiente e no escuro, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução de ácido sulfúrico 2,0 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas a 450 nm. Os resultados foram expressos em concentrações a partir da elaboração das curvas padrão. Amostras *blank* foram consideradas como os poços contendo todos os reagentes, exceto o sobrenadante de cultura.

6.8 Análise estatística

O teste não-paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para comparação das diferenças entre os grupos não-pareados de pacientes alérgicos a medicamentos e indivíduos saudáveis, com referência ao índice de estimulação (SI) dos marcadores de ativação CD69 e CD25. O nível de significância estatística foi considerado $< 0,05$. O programa utilizado para análise foi o GraphPad Prism 5.01.

7 CAPÍTULO 1

Title: Diagnosing immune-mediated reactions to drugs.

Artigo publicado no periódico *Allergologia et Immunopathologia*, v. 37, p. 98-104, 2009.



Allergologia et immunopathologia

www.elsevier.es/ai



REVIEW

Diagnosing immune-mediated reactions to drugs

A.T. Nagao-Dias^{a,*}, F.M. Teixeira^a and H.L.L. Coelho^b

^aDept. Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará, Brazil

^bDept of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará, Brazil

KEYWORDS

Adverse drug reactions;
Diagnosis;
Drug allergy;
Hypersensitivity drug reactions;
Basophil activation test;
Lymphoproliferative tests;
Skin test

Abstract

Drug allergy is a type B adverse drug reaction, which is unpredictable and difficult to prevent or manage. In patients who have a previous history of drug allergy it must be confirmed by laboratorial diagnosis. However, the diagnostic test remains a major problem in clinical practice. Skin testing is validated for some drugs, such as penicillin, but not for others. Provocation test is a confirmatory test but bears the risk of severe reactions. Lymphocyte transformation test is a reliable test but is considered as a research tool. This review addresses the most recent published literature regarding the techniques which have already been developed as well as the new tests that can be promising alternatives for diagnosis of drug allergy.

© 2008 SEICAP. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introduction

The percentage of the population who reports a history of penicillin allergy is estimated to be 0.7-10%; however, only 20-30% of the patients have IgE-mediated allergy¹. Adverse drug reactions (ADR) are considered to be an important public health problem and can be life-threatening. ADR is classified into two main types: type A reactions, which are dose dependent and predictable. These kinds of reactions constitute 70-80% of adverse drug reactions; and type B, which are unpredictable adverse drug reactions, include idiosyncrasy, drug intolerance, or drug allergy, and may comprise approximately 10-15% of all ADR^{2,3}. Clinical manifestations of drug allergy include anaphylaxis, bronchospasm, dermatitis, fever, granulocytopenia, haemolytic anaemia, hepatitis, lupus erythematosus-like syndrome, nephritis, thrombocytopenia, and vasculitis⁴. Symptoms and signs without

demonstration of being an immunological process are classified as non-immune hypersensitivity drug reactions, and they are generally related to nonspecific histamine release, to nonspecific complement activation, to bradykinin accumulation or to induction of leukotriene synthesis in type I hypersensitivity reactions⁵. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics are most often implicated in drug allergies, besides anaesthetic drugs, latex, insulin, and immunomodulators^{3,6-7} (Table I).

Drug allergy reactions are generally classified according to Coomb's classification⁶. Type I include IgE-mediated reactions, such as urticaria, anaphylaxis, and asthma; type II comprises IgM and IgG-cytotoxic mechanisms (e.g. blood cell dyscrasias); type III are related to soluble IgG and IgM immune complexes (e.g. vasculitis, nephritis). Type IV reactions include distinct manifestations (e.g. maculopapular exanthema, bullous exanthema, acute, generalized exanthemous

*Corresponding author.

E-mail: tiemindi@yahoo.com.br (A.T. Nagao-Dias).

Agents		Clinical manifestations
Aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs	■■■■→	Asthma
Penicillin	■■■■→	Urticaria, asthma, neutropenia, haemolytic anaemia
Antibiotics, muscle relaxants, natural rubber latex, hypnotics	■■■■→	Perioperative anaphylaxis
Anticonvulsants, antibiotics, hydralazine, procainamide	■■■■→	Serum sickness, drug fever, vasculitis, lymphadenopathy
Thalidomide	■■■■→	Maculopapular rashes, Steven Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis
Infliximab, etanercept	■■■■→	Anti-dsDNA antibodies, reversible systemic erythematosus lupus
Interferon alfa	■■■■→	Urticaria, angioedema, anti-thyroid antibodies
Rituximab, alemtuzumab	■■■■→	Dyspnoea, hypotension, urticaria
Sulphonamides, phenytoin	■■■■→	Stevens Johnson syndrome
Vancomycin	■■■■→	Bullous skin disease

Data adapted from 3,6-7. Vervloet and Durham, 1998; Hepner et al., 2003; Greenberg, 2006.

pustulosis) according to the kind of cytokines secreted by T cells. In this type of reaction, a subclassification has been suggested according to the distinct effector cells responsible for the lesions⁹. The type I hypersensitivity reactions are called immediate reactions when they occur within one hour after the drug intake and the common manifestations are systemic anaphylaxis, urticaria, angioedema; they are called accelerated when they occur between 1 to 72 hours after receiving the drug, and the most frequent manifestations are urticaria and maculopapular rashes. Types II to IV hypersensitivity reactions occur in general after 72 hours of the drug intake⁹. The most frequent clinical manifestations caused by betalactamic drugs, which are the commonest implicating agents of drug hypersensitivity, are anaphylaxis (immediate reaction); maculopapular exanthema (late reaction) and isolated urticaria (occurs at any time)¹⁰. In a follow-up study done in two hospitals in Fortaleza, Brazil, it has been verified that from 130 paediatric patients exposed to oxacillin, a drug included in the list of essential medicines, 20.8% presented drug adverse reactions, in a mean time of 14 days after the drug exposure¹¹. Half of the patients had fever and 35.7% showed cutaneous rashes.

A pharmacovigilance evaluation can be done for monitoring a drug adverse reaction. A case report in pharmacovigilance can be defined as “a notification relating to a patient with an adverse medical event (or laboratory test abnormality) suspected to be induced by a medicine”¹². In general, case reports describe suspected adverse drug reactions¹². Various approaches have been developed for determining the likelihood of a causal relationship between drug exposure and adverse events, based on four main considerations, which are: the association in time (or place) between drug administration and event, pharmacology (including current knowledge of nature and frequency of adverse reactions), medical or pharmacological plausibility (signs and symptoms, laboratory tests, pathological findings, mechanism) (Table II).

The Uppsala Monitoring Centre (the UMC)/WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring¹² has proposed a way for assessing causality categories, which have the advantages of being internationally agreed and easy to use (Table III).

Diagnosis

In the evaluation of a possible adverse drug reaction, a careful investigation of the medical history as well as the laboratory parameters is extremely important^{13,14}.

Clinical history investigation

A well-kept history is essential to help in the investigation of adverse drug reaction and should include: (1) timing of the onset, course and duration of symptoms; (2) description of clinical and evolutive features; (3) temporal relationship of symptoms with medication use; (4) a detailed list of all drugs taken during the onset of the reactions; (5) personal and familiar history of adverse drug reactions; and (6) co-associated diseases. Some laboratory parameters, such as full blood count; platelet count; blood sedimentation rate; serum creatinine; bilirubin; alkaline phosphatase; transaminases; biopsy, among others, and specific confirmatory tests (skin and patch tests, in vitro assays for specific IgE, also serology to check for some infectious diseases, such as cytomegalovirus, infectious mononucleosis, parvovirus, hepatitis B and C^{13,14}).

Diagnostic tests

Skin testing

The diagnostic value of skin tests varies depending on the drug involved in the reaction. They should be done 4 to

Table II Reporting information for associating causal relationship between drug exposure and adverse events (UMC-WHO, 2000)

n	Topic	Information
1	The patient	Age, gender and brief medical history
2	Adverse event	Description (nature, localisation, severity, characteristics), laboratorial parameters, start date, course and outcome
3	Suspected drug(s)	Name (brand or ingredient name + manufacturer), dose, route, start/stop dates, indication for use (with particular drugs, e.g. vaccines, a batch number is important)
4	All other drugs used (including self-medication):	Names, doses, routes, start/stop dates
5	Risk factors	(e.g. impaired renal function, previous exposure to suspected drug, previous allergies, social drug use)
6	Name and address of reporter	(to be considered confidential and to be used only for data verification, completion and case follow-up)

Table III Assessment criteria for determining causality categories for drug adverse reactions¹¹ (The UMC/Who, 2000)

Causality term	Assessment criteria*
Certain	<ul style="list-style-type: none"> • Event of laboratory test abnormality, with plausible time relationship to drug intake • Cannot be explained by disease or other drugs • Response to withdrawal plausible (pharmacologically, pathologically) • Event definitive pharmacologically or phenomenologically (i.e. an objective and specific medical disorder or a recognised pharmacological phenomenon) • Rechallenge satisfactory, if necessary
Probable/likely	<ul style="list-style-type: none"> • Event of laboratory test abnormality, with reasonable time relationship to drug intake • Unlikely to be attributed to disease or other drugs • Response to withdrawal clinically reasonable • Rechallenge not required
Possible	<ul style="list-style-type: none"> • Event of laboratory test abnormality, with reasonable time relationship to drug intake • Could also be explained by disease or other drugs • Information on drug withdrawal may be lacking or unclear
Unlikely	<ul style="list-style-type: none"> • Event of laboratory test abnormality, with a time to drug intake that makes a relationship improbable (but not impossible) • Disease or other drugs provide plausible explanations
Conditional/unclassified	<ul style="list-style-type: none"> • Event of laboratory test abnormality • More data for proper assessment needed, or • Additional data under examination
Unassessable/unclassifiable	<ul style="list-style-type: none"> • Report suggesting an adverse reaction • Cannot be judged because information is insufficient or contradictory • Data cannot be supplemented or verified

6 weeks after the reaction is resolved⁵. Their sensitivity and predictive value are considered to be very good for penicillin, myorelaxant, heterologous sera, enzymes; satisfactory for vaccines, hormones, opiates; and poor or unknown for local anaesthetics, sulphonamides, iodine radiopaque media, non-steroidal anti-inflammatory drugs, cephalosporin⁵. Skin testing for penicillin is the only test regularly used for diagnosis of drug allergy¹⁵. The majority of patients with negative results for major and minor determinants of penicillin will tolerate the drug without risk of a severe immediate reaction¹⁶.

Penicillin is one of the most useful antimicrobial drugs⁹. A percentage of 20% of patients admitted to a hospital refer to have allergy to the drug; however, most of these reports are unreliable¹⁷ and make the physicians prescribe alternative antibiotics, which in general are more expensive, can be associated with toxic effects, and can lead to antibiotic resistance¹. Allergic reactions to penicillin are estimated to occur in 2% of the patients treated with the drug and most of them are maculopapular or urticarial rashes⁹.

Penicillin test should be performed in every patient with a background history of penicillin allergy who needs a therapy

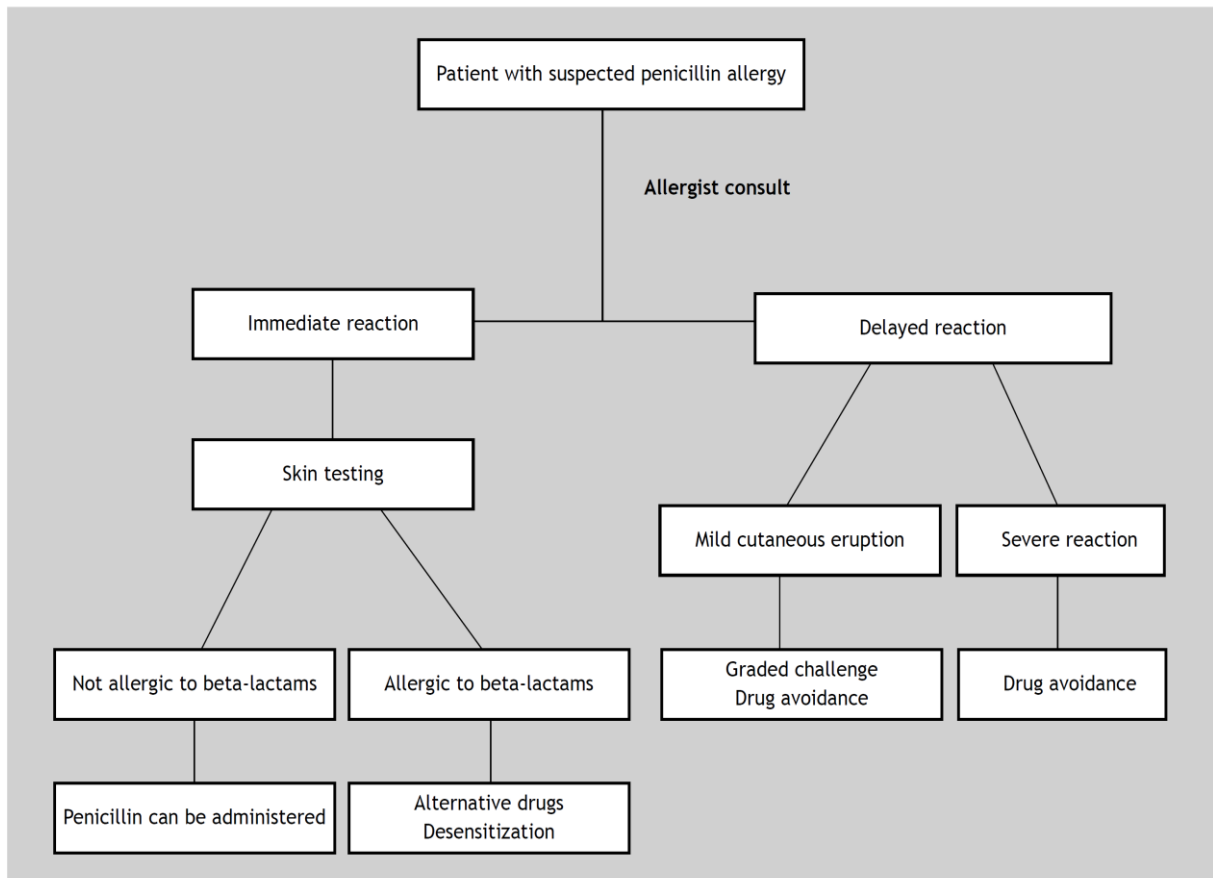


Figure 1. Representation of a clinical practice algorithm. Adapted from Forrest et al, 2001; Gruchalla and Pirmohamed, 2006.

with antibiotics¹⁸. The risk of systemic reactions to penicillin skin tests is considered to be very low and may be related to incorrect dose of the drug and the lack of performing the prick test before the intradermal test¹⁶. It is important to remember that skin testing may give false-negative results for 1 to 2 weeks or even longer after an episode of anaphylaxis⁹ (Fig. 1).

A clinical practice guideline for penicillin skin testing in patients who have a history of penicillin allergy does not increase the costs nor improve financial savings, instead, it increases the percentage of eligible patients for skin testing and, on the other hand, it reduces the necessity of alternative antibiotics¹. It is necessary to take into account that the skin testing for penicillin is useful only for the diagnosis of IgE-mediated reactions to penicillins, not for delayed reactions such as Stevens-Johnson syndrome, or other reactions which are not IgE-mediated⁹. The penicillin skin test has a negative predictive value of 99% and a positive predictive value of 50%⁹, when it includes major and minor determinants of the drugs. Because minor determinants are not commercially available, some authors have suggested a dilution of penicillin G, to a concentration of 10,000 units/ml with 0.9% sodium chloride¹⁷. However, the diluted solution should be freshly prepared⁹. Using benzyl penicilloyl as the major determinant, commercially named Pre-Pen, and diluted penicillin G, the negative predictive value of the test is 97%⁹. Nonetheless, the Pre-Pen solution is nowadays unavailable com-

mercially¹⁵⁻¹⁶, which makes penicillin allergy diagnosis very difficult.

Penicillin skin testing has been proposed to be performed by using lab made reagents. Sarti¹⁹ has performed penicillin skin tests in 6,764 patients in an outpatient clinic, by employing fresh diluted penicillin G (PG) and hydrolysate penicillin as minor determinant mixtures (MDM). His data showed that only 96 patients presented positive results. None of the 6,668 patients with negative skin tests re-exposed to penicillin showed any immediate systemic reaction. According to the author, MDM correlates well with diluted penicillin G and can be employed for diagnosing patients susceptible to immediate severe reactions, such as oedema of the larynx and anaphylactic shock; although it could miss some accelerated reactions which are mainly caused by the major determinants. In our country, the Ministry of Health has adopted the mentioned schedule for penicillin drug allergy diagnosis²⁰.

The Center for Diseases Control²¹ states that as no proven alternatives to penicillin are available for treating neurosyphilis, congenital syphilis or syphilis in pregnant women, it is recommended that if the major determinants are not available, patients with a history of immediate IgE-mediated reactions should be desensitized in a hospital service.

In general, penicillin skin testing is useful for detecting any beta-lactam antibiotics¹⁸; however, it is important to note that penicillins share the beta-lactamic ring structure and the thiazolidine rings, but not necessarily the R side

chains²². It is possible that the patient has non cross-reactive responses to various beta lactam antibiotics²³.

It is estimated that 50% of patients who experienced immediate reactions to penicillin will have a negative skin test after 5 years, and 75-80% will be negative at 10 years⁹. Nonetheless, penicillin is no longer considered the most commonly prescribed β -lactam²⁴, therefore it is recommended to include other determinants in skin tests such as amoxicillin and cephalosporin²⁴⁻²⁵. According to the data from Blanca et al.²⁴ in patients who suffered penicillin allergy adverse reactions after treatment, the drugs most involved in the reactions were amoxicillin (87.8%), followed by benzopenicillin (8.1%), ampicillin (2.7%), and cloxacillin (1.3%).

In vitro IgE-RAST/CAP and ELISA testing

The radioallergosorbent test (RAST), cellulose fluorescent assay-IgE (CAP-IgE) or enzyme-linked immunosorbent assay for detecting anti-drug IgE has variable specificity and sensitivity. For instance, a negative result does not exclude allergy to penicillin, as the assays detect only IgE to the major determinant; however, a positive result can indicate an increased risk for allergic reactions^{9,16}. The specificity and sensitivity of the CAP-IgE for β -lactam are 85.7-100% and 12.5-25.0%, respectively, depending on the initial clinical manifestations²⁶. The positive predictive values are considered to be high in severe clinical conditions, such as anaphylactic shock²⁶. Therefore it could be useful in these situations if the skin test is negative, in order to avoid the necessity of drug provocation^{24,26}. However, the sensitivity and specificity of the in vitro IgE antibodies test decrease more than one year after the allergy episode²⁶.

Drug provocation test

The drug provocation test is recommended to confirm drug hypersensitivity reactions by the European Network for Drug Allergy from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology^{10,27}. The test is cumbersome but can be considered as a reference test when skin tests are not available or not validated^{5,28}. It should be performed in cases of inconclusive or negative skin and/or CAP-IgE tests in patients with history of immediate drug allergy²⁹. In most cases, the same route of administration in the clinical history is used, unless the oral form of the culprit drug is available¹⁰.

Increasing doses of a suspected drug are given at 0.5 to 1-h intervals until the full age/weight-adjusted dose is achieved, and depending on the protocol, this procedure may take 1, 2 or more days^{23,28}. H1-antihistamines and β -blockers should be denied for 2 and 5 days, respectively, before the drug provocation test²⁷. Placebo challenges may be necessary to avoid false positive reactions²⁹. False negative results can occur and could be explained by cofactors such as exercise, sunlight, and tolerance induction²⁷. Contraindications for the test are patients with severe comorbidities such as cardiac, hepatic, renal or other diseases and patients who had experienced severe life-threatening reactions as with Stevens-Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis, vasculitis, drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)^{27,30}.

Drug provocation tests can reproduce the hypersensitivity reactions of the clinical episode, but they are in general milder and have a shorter duration²⁷. Although they are dangerous procedures and potentially life-threatening, these tests are important to confirm drug hypersensitivity, and therefore

non-hypersensitive patients would not need to avoid the related drugs in the future if the test were negative⁵.

Intradermal and patch tests for non-immediate allergy

Intradermal and patch tests are recommended for the routine screening of patients with suspected non-immediate allergy²³. The drug skin tests should be performed 6 weeks to 6 months after resolution of the drug reaction. Barbaud et al.¹³ proposed a guideline for performing skin tests in order to standardise these procedures in cutaneous adverse drug reactions. According to the authors, skin testing should be performed with the commercialised drug whenever possible, and also with the pure active products and excipients. Systemic corticosteroid or immunosuppressive therapy must be interrupted for at least one month. For patients who have experienced severe reactions such as Stevens-Johnson syndrome, the drugs must be diluted first at 0.1%; if negative then at 1.0%; and if negative up to 10% in patch tests¹³. The intradermal tests are contraindicated in these patients. Healthy volunteers with or without previous exposure to the drug can be used as negative controls. The highest frequency of positive drug patches are related to β lactam antibiotics, especially amoxicillin; cotrimoxazole; corticosteroids; heparin derivatives; carbamazepine; diazepam; and pseudoephedrine¹³. Delayed positive results in intradermal tests can be obtained in maculopapular rash, eczema, erythroderma or fixed drug reactions. The threshold of specificity has been determined for various drugs, such as β lactam antibiotics, erythromycin and spiramycin, and needs to be determined for other drugs, because of the risk of false positives in intradermal tests¹³.

Basophil activation test

The CD63 molecule was discovered in the 1990s and since then it has been used as a basophil activation marker in flow cytometry. The technique, which is named basophil activation test (BAT), relies upon anti-IgE to characterize basophiles and anti-CD63 to assess activation of these cells^{31,32}. The molecule is expressed by different types of cells, e.g. basophiles, mast cells, macrophages and platelets. In the resting cells, CD63 is anchored in the basophilic granule and weakly expressed on the surface membrane; upon activation, its expression is upregulated, besides other molecules, such as CD45, CD203c³¹. The BAT test allows the diagnosis of immediate drug allergy and pseudoallergy mainly for drugs that are not always detectable by CAP-IgE³³. The BAT test is more sensitive and specific than other in vitro diagnostic techniques in drug allergy³³, and is essentially complementary to skin tests and allergen-specific IgE determinations³⁴.

This technique has been proven to be a useful tool for assessment of the diagnosis of IgE-mediated allergies, including drug allergy³³. The upregulation of CD63 and CD203c has been observed in tests for pollen, food, drugs, natural rubber latex, and recombinant pollen allergens³¹. Nevertheless, it suffers from some drawbacks. It depends on various factors, such as temperature, incubation time, a diluting buffer, type of allergen, and a positive control as anti-IgE³¹. The density of IgE and IgE receptors may vary considerably among individuals and also among basophiles from the same individual. This may play a negative role, particularly in nonatopic individuals and when the number of activated ba-

sophiles is low³⁴. The necessity of anti-IgE as a positive control in CD63 testing is considered to be an important drawback, once some patients are non-responders; also, the results might be influenced by the intake of drugs, such as glucocorticosteroids, immunosuppressives, and immunomodulators³¹. Moreover, IL-3 may be necessary for the priming of basophiles without up-regulating the activation markers, since in drug allergy it can occur that the drugs *per se* induce a low rate of basophil activation in the test³⁵.

Other alternative means of detecting basophiles have recently been identified, such as the CD203c marker, a neural cell surface differentiation antigen E-NPP3 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase), which is exclusively present on basophiles among blood cells, mast cells and progenitors. The CD 203c marker is upregulated in response to allergen-specific and anti-IgE-induced IgE cross-linking similar to CD63^{32,34} and can be applied in flow-assisted allergy diagnosis to improve the sensitivity of the BAT technique, but multi-centre studies are necessary in order to make the technique useful for clinical routine³⁵.

In a study evaluating immediate reactions to β -lactam, the sensitivity of the BAT test was 50% and its specificity 94%³⁶. Torres et al.³⁷ also assessing reactions to these antibiotics, found similar results to BAT with a sensitivity of 48.6% and specificity of 93%; moreover, the BAT for cephalosporin was positive in 77% of the patients, indicating that this test seems to be very promising for cephalosporin allergy. Nonetheless, studies in larger samples are required in order to validate the technique³⁸.

Gamboa et al.³⁹ found a specificity of 90% and sensitivity of 60% to 70% in BAT for non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The results with BAT are suggestive that when it is positive there would be no need to perform the provocation test. However, Malbran et al.⁴⁰ showed that diclofenac activates basophiles in sensitive individuals in a way that does not induce CD63 expression, suggesting that the BAT test may not be reliable for NSAID hypersensitivity.

Lymphocyte transformation test

The lymphocyte transformation test (LTT) is a test that assesses drug-specific T cells activation after *in vitro* stimulation with various concentrations of the culprit drug⁴¹. It has several advantages as it is not harmful for the patient; it can be positive in drug reactions caused by different immunopathogenic mechanisms⁴². Although it is thought to be a reliable test⁴¹, it has been considered more as a research tool than for diagnostic purposes¹⁵. There are several variables which can influence its performance: time of testing; influence of therapy as corticosteroids; stimulation index; reproducibility; sensitivity; and specificity⁴¹⁻⁴². According to Kano et al.⁴¹, the right time to perform the test depends on the type of reactions, within one week from the onset of the skin rashes in patients with maculopapular exanthema or Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis, and 5 to 8 weeks after the onset of skin rashes in patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash and eosinophilia with systemic symptoms.

Detection of cytokines as IL-5

The IL-5 secretion cells can be analysed *in vitro* in culture supernatants from LTT after activation with specific drugs,

and improve LTT sensitivity⁴³. According to Sachs et al.⁴⁴ the determination of drug-specific IL-5 secretion was more sensitive (92%) than the LTT (75%) and patch test (55%) in patients with drug-induced maculopapular exanthemas. As Th1 and Th2 patterns occur together or not in drug allergy, and as IL-5 is a representative of the Th2 profile, the tests should include the determination of a cytokine representative of the Th1 pattern, as IFN γ .

Markers of T cell activation such as CD69

Considering the several disadvantages of LTT, as mentioned above, the detection of surface markers, such as CD69 and CD25, which upregulate upon T cell activation after contact with a specific antigen, peptide or drug, can also be a promising alternative for diagnostic purposes³⁰. The test consists in culturing peripheral mononuclear cells with nontoxic concentrations of the culprit drug for 36 to 72 h and submitting them to flow cytometry after the addition of fluorochrome-labelled anti-human CD69 monoclonal antibodies³⁰.

Beeler et al.³⁰ evaluating 15 drug-allergic, LTT positive patients, found a CD69 upregulation in both TCD4 cells and TCD8 cells after drug stimulation, except when the cells were cultivated with clavulanic acid, which induced an increase of CD4 T cells only. The test has shown a high specificity since non-allergic individuals showed no increase of CD69 detection of T cells cultivated with drugs. However, the authors demonstrated that clavulanic acid could induce CD69 upregulation without proliferation of non-allergic cells and that vancomycin promoted the proliferation of non-allergic cells without CD69 upregulation. Therefore, the authors³⁰ strongly suggest the necessity of an assay evaluation for every drug to be tested in non-allergic individuals.

Conclusion

The development of new tests and the validation of already developed techniques have been contributing enormously in the diagnosis of drug allergy. The diagnostic tests, together with a carefully detailed clinical history of the patient, physical examination and routine laboratorial parameters, are critical to identify the culprit drug, for the hypersensitivity drug reaction classification, and finally for taking a decision upon the treatment of patients.

Acknowledgement

This article is part of a project entitled "Incidence evaluation of allergy hypersensitivity reactions to beta-lactamics through laboratorial investigation of patients exposed to the drug", sponsored by MCT/CNPq/MS-SCTIEDECIT-DAF 54/2005, process 402509/2005-6.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Forrest DM, Schellenberg RR, Thien VVS, King S, Anis AH, Dodek PM. Introduction of a practice guideline for penicillin skin testing improves the appropriateness of antibiotic therapy. *CID* 2001;32:1685-90.

2. Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:309-16.
3. Greenberg PA. Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117: S464-70.
4. Bates DW, Leape L. Adverse drug reactions. In: Carruthers SG, Hoffman BB, Melmon KL, Nierenberg DW, editor. *Clinical pharmacology: Basic principles in therapeutics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2000. p. 1223-54.
5. Demoly P. Anaphylactic reactions – value of skin and provocation tests. *Toxicology*. 2005;209:221-3.
6. Vervloet D, Durham S. ABC of allergies: adverse reactions to drugs. *BMJ*. 1998;316:1511-4.
7. Hepner DL, Castells MC. Anaphylaxis during the perioperative period. *Anesth Analg*. 2003;97:1381-95.
8. Pichler W, Yawalkar N, Schmid S, Helbling A. Pathogenesis of drug-induced exanthems. *Allergy* 2002;57:884-93.
9. Arroliga ME, Pien L. Penicillin allergy: considering trying penicillin again. *Cleveland Clin J Med* 2003;70:313-26.
10. Bousquet PJ, Kvedariene V, Co-Minh HB, Martins P, Rongier M, Arnoux B, et al. Clinical presentation and time course in hypersensitivity reactions to β -lactams. *Allergy* 2007;62:872-876.
11. Souza MOB, Araujo MCC, Santiago RA, Coelho HLL, Fonteles MMF. Adverse reactions to oxacillin in hospitalized children: a prospective study. *Rev Bras Saúde Matern. Infant.* 2007;7:55-61.
12. The Uppsala Monitoring Centre (the UMC)/WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring. Safety monitoring of medicinal products: Guidelines for setting up and running a Pharmacovigilance Centre, Uppsala, Sweden, 2005, 25 pp.
13. Barbaud A, Goncalo M, Bruynzeel D, Bircher A. Guidelines for performing skin tests with drugs in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. *Contact Dermatitis* 2001;45:321-8.
14. ACAAI. Annotations of the algorithm for disease management of drug hypersensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83: 667-71.
15. Gruchalla RS, Pirmohamed M. Antibiotic allergy. *N Engl J Med* 2006; 354:601-9.
16. Park MA, Li JTC. Diagnosis and management of penicillin allergy. *Mayo Clin Proc* 2005;80:405-10.
17. Wall GC, Peters L, Leaders CB, Wille JA. Pharmacist-managed service providing penicillin allergy skin tests. *Am J Health-Syst Pharm* 2004;61:1271-5.
18. Shepherd GM. Hypersensitivity reactions to drugs: evaluation and management. *The Mount Sinai J Med* 2003;70:113-25.
19. Sarti W. Routine use of skin testing for immediate penicillin allergy to 6,764 patients in an outpatient clinic. *Ann Allergy* 1985;55:157-61.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação nacional de DST e Aids – Manual de teste de sensibilidade à penicilina. Brasília, 1999. http://www.aids.gov.br/testes_penicilina.pdf.
21. Center for Diseases Control. Management of patients who have a history of penicillin allergy. Sexually transmitted diseases treatment guideline. 2006. <http://cdc.gov/std/treatment/2006/penicillin-allergy.htm>. access in 12/3/2007.
22. Gruchalla RS. Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111: S548-59.
23. Padial A, Antunez C, Blanca-Lopez N, Fernandez TD, Cornejo-García JA, Mayorga C, et al. Non-immediate reactions to β -lactams: diagnostic value of skin testing and drug provocation test. *Clin Exp Allergy* 2008;38:822-8.
24. Blanca M, Mayorga C, Torres MJ, Roche M, Moya MC, Rodriguez JL, et al. Clinical evaluation of Pharmacia CAP system RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy* 2001;56:862-70.
25. Torres MJ, Romano A, Mayorga C, Moya MC, Guzman AE, Reche M, et al. Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins: the role of skin testing. *Allergy* 2001;56:850-6.
26. Fontaine C, Mayorga C, Bousquet PJ, Arnoux B, Torres MJ, Blanca M, et al. Relevance of the determination of serum specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate β -lactam allergy. *Allergy* 2007;62:47-52.
27. Messaad D, Sahia H, Benahmed S, Godard P, Bousquet J, Demoly P. Drug provocation tests in patients with a history suggesting an immediate drug hypersensitivity reaction. *Ann Intern Med* 2004;140:1001-6.
28. Gomes ER, Fonseca J, Araujo L, Demoly P. Drug allergy claims in children: from self-reporting to confirmed diagnosis. *Clin Exp Allergy* 2007;38:191-8.
29. Wöhrl S, Vigl K, Sting G. Patients with drug reactions – is it worth testing? *Allergy* 2006;61:928-34.
30. Beeler A, Zaccaria L, Kawabata T, Gerber BO, Pichler WJ. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2008;63:181-8.
31. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, de Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004;34:332-9.
32. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006;61: 1028-39.
33. Sanz ML, Gamboa PM, de Weck AL. Cellular tests in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Curr Pharm Design* 2008;14: 2803-8.
34. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008;18:143-55.
35. Erdmann SM, Sachs B, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Merk H. Regarding Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS & Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004;34:332-9. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1498-500.
36. Sanz ML, Gamboa PM, Antépara I, Uasuf C, Vila L, Garcia-Avilés C, et al. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:277-86.
37. Torres MJ, Padial A, Mayorga C, Fernández T, Sanchez-Sabate E, Cornejo-García JA, et al. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1768-75.
38. Romano A, Demoly P. Recent advances in the diagnosis of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:299-303.
39. Gamboa P, Sanz ML, Caballero MR, Urrutia I, Antépara I, Esparza R, et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004;34: 1448-57.
40. Malbran A, Yeyati E, Rey GL, Galassi N. Diclofenac induces basophil degranulation without increasing CD63 expression in sensitive patients. *Clin Exp Allergy* 2006;147:99-105.
41. 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.
42. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004;59:809-20.
43. Merck HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology* 2005;209:217-20.
44. Sachs B, Erdmann S, Malte Baron J, Neis M, al Masaoudi T, Merk HF. Determination of interleukin-5 secretion from drug-specific activated ex vivo peripheral blood mononuclear cells as a test system for the in vitro detection of drug sensitization. *Clin Exp Allergy* 2002;32:736-44.

8 CAPÍTULO 2

Title: Rifamycin-associated postoperative allergic contact dermatitis in a 70-year old patient.

Artigo submetido em 21/01/2012 ao periódico *Journal of Drugs in Dermatology*.

Rifamycin-associated postoperative allergic contact dermatitis in a 70-year old patient

Fabricia Martins Teixeira, Luciana Mabel Ferreira Vasconcelos, Tatiane da Silva Araújo, Ana Mirella Arcanjo Vasconcelos, Thereza Lúcia Prata de Almeida, Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

Fabricia Martins Teixeira PharmD, Posgraduation Program of Biotechnology (RENORBIO), Federal University of Ceara (UFC), Brazil

Luciana Mabel Ferreira Vasconcelos PharmD, Posgraduation Program of Pharmaceutical Sciences, UFC, Brazil

Tatiane da Silva Araújo PharmD student, Department of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, UFC, Brazil

Ana Mirella Arcanjo Vasconcelos MD, Dermatology Resident, Faculty of Medicine, UFC, Brazil

Thereza Lúcia Prata de Almeida MD MSc, Assistant Professor, Department of Dermatology, Hospital Universitário Walter Cantídio, UFC, Brazil

Aparecida Tiemi Nagao-Dias PhD, Associate Professor, Department of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, UFC, Brazil

Correspondence author:

Fabricia Martins Teixeira

Dept. of Clinical Analysis and Toxicology

Faculty of Pharmacy

Universidade Federal do Ceará

Rua Capitaó Francisco Pedro, 1210

CEP 60430-370 Fortaleza, Ceara, Brazil

E-mail address: briciamt@yahoo.com.br

Tel: 55 - 85 – 3366-8270 / Fax: 55 - 85 – 3366-8292

Conflict of interest: Authors reported none

Abstract

Allergic contact dermatitis to topical rifamycin has been rarely reported in the literature. A 70-year-old man was admitted to the hospital for an open thoracostomy drainage, and after the surgery, he was treated with topical application of rifamycin solution twice daily for two months. In an outpatient follow-up visit, the patient complained of itching erythema at the site of application. The drug was discontinued and the patient was advised to replace it with saline solution. The reaction disappeared after drug discontinuation. The patch test was positive for rifamycin in 1%, 10%, and 30% in petrolatum after 72h. Seven days later, presence of erythema, infiltration and vesicles (++) was observed at the site of patch application. The epicutaneous patch testing confirmed the diagnosis of rifamycin-allergic contact dermatitis. Rifamycin topically applied to the skin should be considered as a potential causative agent of drug adverse reactions, ranging from mild reactions such as allergic contact dermatitis to potentially life-threatening reactions.

KEY WORDS: allergic contact dermatitis, patch testing, rifamycin.

Introduction

Allergic contact dermatitis (ACD) is an eczematous skin disease caused by cell-mediated hypersensitivity after skin contact with an allergen to which the patient has developed a specific sensitivity, such as a topically applied drug. In a study where patients with suspected drug allergic contact dermatitis (DACD) were tested with epicutaneous patch tests, the most frequent drugs implicated in the reactions were neomycin sulfate, bufexamac, bacitracin, gentamicin sulfate, framycetin sulfate, polymyxin B sulfate, amcinonide, hydrocortisone-17-butyrate.¹ Allergic reaction to rifamycin is infrequent. There are few reports in the literature of severe anaphylactic reaction after topical use of rifamycin SV,²⁻⁷ as well as contact urticaria^{8,9} and delayed reaction similar to that observed in our patient.¹⁰⁻¹³ Rifamycin SV is a semisynthetic antibiotic belonging to the class of ansamycins obtained from rifamycin B, which is produced by fermentation of *Streptomyces mediterranei*. The drug is used topically for the treatment of infected wounds and for the prevention of local asepsis due to its broad

spectrum of activity against Gram-positive and some Gram-negative bacteria. We describe a case of a rifamycin-associated postoperative allergic contact dermatitis in a 70-year old patient.

Case Report

A 70-year-old man without any personal or familial history of atopy had suffered from pneumonia and empyema. Thoracic radiography had showed pleural effusion in the left hemitorax. For this reason, the patient was admitted to the hospital for an open thoracostomy drainage. After the surgery, he was treated with topical application of a rifamycin solution twice daily for two months. In an outpatient follow-up visit, the patient complained of itching erythema at the site of application (Figure 1). The drug was discontinued and the patient was advised to replace it with saline solution. The reaction disappeared after drug discontinuation. A patch test with 1%, 10% and 30% rifamycin (purchased from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in petrolatum was performed. The test was done after obtaining the patient's written consent. On examination after 72 hours, the test revealed erythema and slight infiltration (+). Seven days later, it was observed erythema, infiltration and vesicles (++) at the site of application (Figure 2). The epicutaneous patch test confirmed allergic contact dermatitis to rifamycin. The epicutaneous patch testing with rifamycin was also performed in 10 healthy volunteers with no history of drug allergy, and negative results were obtained for all of them.

Discussion

We reported a case of delayed hypersensitivity reaction mediated by T cells after topical application of rifamycin. The clinical data and positive patch testing confirmed the diagnosis of drug allergic contact dermatitis (ACD). The assessment criteria for determining probability for drug adverse reactions was used according to the Uppsala Monitoring Centre (UMC)/WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring¹⁴ which indicated a definitive causality between rifamycin and the development of ACD in our patient.

Contact dermatitis due to topically applied drugs may be caused by allergy not only to the agent but also to its constituents, such as preservatives or excipients. Milpied *et al.*¹¹ reported two cases of allergy, one involving a patient sensitized to rifamycin and the other a patient allergic to potassium metabisulfite, both cases confirmed by epicutaneous tests. The patients had a background history of atopy and the authors considered this condition as a risk factor for drug hypersensitivity.

Balato *et al.*¹² described a case of a 30-year-old woman without history of atopy who developed ACD after topical use of rifamycin on a leg ulcer. The patch test with 0.5% rifamycin in petrolatum was positive. According to their supposition, pre-existing skin lesions could have predisposed ACD after topical medications, probably as a result of chronic venous stasis.¹⁵

Guerra *et al.*¹³ reported three cases of ACD in adult patients after topical application of rifamycin on a leg ulcer (two patients) and post-surgical wounds (one patient). The skin lesions had late onset and disappeared gradually after the drug was discontinued. One patient presented clinical manifestations similar to our case. After two months of treatment, he showed erythema, itching and edema around the wound. The patch tests with 2.5% rifamycin in petrolatum were positive in all cases.

In conclusion, although neomycin is the most frequent allergen in topical antibacterial preparations, rifamycin topically applied to the skin should also be considered a potential causative agent of drug adverse reactions, ranging from mild reactions such as allergic contact dermatitis to potentially life-threatening anaphylaxis.

References

1. Menezes de Pádua CA, Uter W, Schnuch A. Contact allergy to topical drugs: prevalence in a clinical setting and estimation of frequency at the population level. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2007;16:377-84.
2. García F, Blanco J, Carretero P, et al. Anaphylactic reactions to topical rifamycin. *Allergy* 1999;54:526-33.
3. Antonicelli L, Micucci C, Bilò MB, et al. IgE-mediated reactions to rifaximin and rifamycin SV and cross-reactivity among rifamycins. *Allergy* 2009;64:1232-3.
4. Scala E, Giani M, Lia P, et al. Multiple drug allergy syndrome: severe anaphylactic reaction due topical Rifamycin SV in patient with hypersensitivity to ciprofloxacin. *Int J Dermatol* 2001;40:603-4.
5. Ebo DG, Verheecke G, Bridts CH, et al. Perioperative anaphylaxis from locally applied rifamycin SV and latex. *Br J Anaesth* 2006;96:738-41.
6. Cardot E, Tillie-Leblond I, Jeannin P, et al. Anaphylactic reaction to local administration of rifamycin SV. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:1-7.
7. Erel F, Karaayvaz M, Deveci M, Ozangüç N. Severe anaphylaxis from rifamycin SV. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:257-60.
8. Grobb JJ, Pommier G, Robaglia A, et al. Contact urticaria from rifamycin. *Contact Dermatitis* 1987;16:284-5.
9. Mancuso G, Masara N. Contact urticaria and severe anaphylaxis from rifamycin SV. *Contact Dermatitis* 1992;27:124-5.
10. Riboldi A, Pigatto PD, Morelli M, et al. Allergy to mercurochrome and rifamycin. *Contact Dermatitis* 1985;12:180.
11. Milpied B, van Wassenhove L, Larousse C, Barriere H. Contact dermatitis from rifamycin. *Contact Dermatitis* 1986;14:252-3.

12. Balato N, Lembo G, Patruno G, Ayala F. Allergic contact dermatitis from rifamycin. *Contact Dermatitis* 1988;19:310.
13. Guerra L, Adamo F, Venturo N, Tardio M. Contact dermatitis due to rifamycin. *Contact Dermatitis* 1991;25:328.
14. The Uppsala Monitoring Centre (the UMC)/ WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring. Safety monitoring of medicinal products: Guidelines for setting up and running a Pharmacovigilance Centre, Uppsala, Sweden, 2005, 25pp.
15. Nichols KM, Cook-Bolden FE. Allergic skin disease: major highlights and recent advances. *Med Clin N Am* 2009;93:1211-24.

Acknowledgements

This study was financially supported by the CNPq (process 554970/2010-4) and FUNCAP/CAPES (process BMD – 1401-2.08/08).

Figures:

Figure 1. Reaction to rifamycin in the region of the site of surgical incision located on the left side of the patient's back (A and B).

Figure 2. Patch test with rifamycin 1, 10 and 30% in petrolatum. A positive reaction to the drug with erythema, infiltration and vesicles was observed 7 days after testing.

Figure 1. A and B

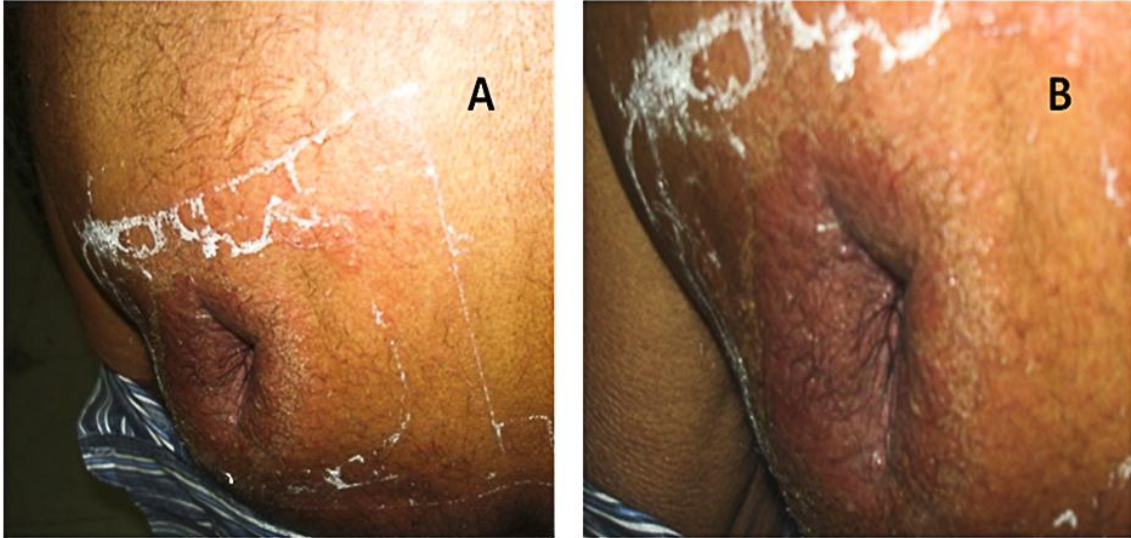
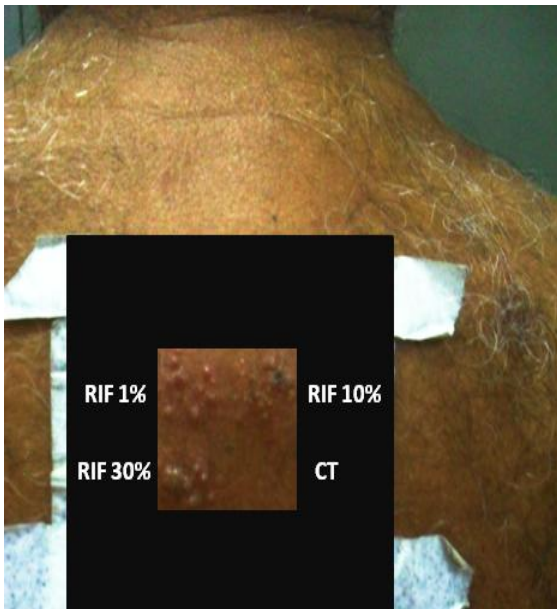


Figure 2



9 CAPÍTULO 3

Title: Detection of CD69 and CD25 in immediate and delayed drug hypersensitivities.

Manuscrito em preparação.

Detection of CD69 and CD25 in immediate and delayed drug hypersensitivities

Fabricia Martins Teixeira^a, Luciana Mabel Ferreira Vasconcelos^b, Tatiane da Silva Araújo^c, Thereza Lúcia Prata de Almeida^d, Lília Maria Carneiro Câmara^e, Aparecida Tiemi Nagao-Dias^c.

^aPosgraduation Program of Biotechnology (RENORBIO), Universidade Federal Ceara (UFC), Brazil

^bPosgraduation Program of Pharmaceutical Sciences, UFC, Brazil

^cDepartment of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, UFC, Brazil.

^dDepartment of Dermatology, Hospital Universitário Walter Cantídio, UFC, Brazil

^eDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, UFC, Brazil

* Corresponding author:

Fabricia Martins Teixeira

Dept. Clinical Analysis and Toxicology

Faculty of Pharmacy

Universidade Federal do Ceara

Rua Capitaó Francisco Pedro, 1210

CEP 60430-370 Fortaleza, Ceara, Brazil

E-mail address: briciamt@yahoo.com.br

Tel: 55 - 85 – 3366-8270 / Fax: 55 - 85 – 3366-8292

Conflict of interest: Authors reported none

ABSTRACT

Background: Diagnosis of drug allergy is difficult once few methods are validated in the literature. In the last few years, identification of T cell activation markers has been the focus to be used as auxiliary laboratorial parameters for other tests, as the lymphocyte transformation test (LTT). Drug provocation tests have been considered the gold standard in drug allergy diagnosis; however, it is harmful and must be performed at hospitals with emergency supplies. The LTT is considered valuable in Europe but not in USA and it has to be performed with radioactive labels. The aim of the present work is to search for CD25 and CD69 markers in TCD4 and TCD8 cells after incubation of peripheral blood mononuclear cells with different concentrations of suspected drugs in patients who were classified as having probable drug allergy. The presence of interleukin 5 and interferon gamma was also investigated in cell supernatant.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells from 20 patients with a well-documented history of suspected drug hypersensitivity (5 immediate e 15 nonimmediate reactions) and from 12 healthy controls (at least 3 to each tested drug) were incubated with different concentrations of the suspicious drugs for 72 h before the addition of fluorochrome-labelled anti-CD69, anti-CD25, anti-CD4, anti-CD8. The samples were analyzed by a 4-channel flow cytometer. The determination of human interleukin (IL)-5 and interferon (IFN- γ) in the supernatants of cultures was performed by means of a sandwich type immunoenzymatic assay, according to the manufacturer's protocol.

Results: Most of the patients analyzed (n=15), showed positivity for markers of lymphocyte activation in response to the suspicious drug. Some drugs were positive for one of the markers, and the association of CD25 and CD69 increased the sensitivity of the test. Comparing activation markers on drug-incubated peripheral blood mononuclear cells between drug-allergic patients and healthy controls, the greatest differences was found for CD4CD69 ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.005$ with low, medium and high drug concentrations, respectively). For CD4CD25, a significant difference comparing the groups could be found in the lowest drug concentration ($p = 0.01$). For higher drug concentrations and for the other markers no remarkable differences was found ($p > 0.05$). Eight out of 10 skin test-positive patients and 7 out of 12 skin-negative patients were positive for one or both lymphocyte activation markers.

No significant differences in IL-5 and IFN- γ were observed comparing drug-allergic patients and healthy individuals.

Conclusions: Detection and the association of both activation markers, as CD69 and CD25, by flow cytometry appears to be a promising tool in drug allergy diagnosis, both in immediate or in nonimmediate reactions; however, a larger number of patients shall be evaluated.

Keywords: CD25; CD69; drug hypersensitivity; drug allergy; IL-5; IFN- γ .

Introduction

Drug hypersensitivity reactions (DHRs) account for approximately 15% of all adverse drug reactions (1), can be life-threatening, require or prolong the period of hospitalization, and entail changes in drug prescription (2). They represent an important public health problem once they may cause significant morbidity, mortality and higher costs (3).

Drug allergy is defined by World Allergy Organization (WAO) as an immunologically mediated reaction, that occurs after a re-exposure to the offending drug through mechanisms either IgE or non-IgE mediated (4), and may provoke recurrence upon re-exposure to the offending drug (5).

The clinical picture of drug hypersensitivity is very heterogeneous and of variable severity (5). Although it can affect many other organ systems, the most common target is the skin (6).

A conclusive diagnosis of drug allergy that confirms the symptoms and identify its causative agent still remains a major challenge in daily clinical practice (7). The skin tests, such as patch, prick and intradermal tests (IDT) are the most readily available form of allergy testing for physicians, but have an overall low sensitivity, even in patients with clear history of DHR (5,7). Provocation oral tests are considered to be the gold standard in drug allergy, but are not well accepted by physicians and patients due to the risk of causing severe reactions and do not differentiate between allergic and not allergic reactions (1).

Difficulties in diagnosis reside in the lack of sensitivity of currently available tests, and in the presence of variables as the time of the reaction, type of clinical manifestations which may be confounding factors (8).

The proposal of developing in vitro tests is necessary once it would be a safe procedure for the patients avoid possible sensitization to the drug and risk of severe adverse reactions. The lymphoproliferative test is currently the most widely used test for diagnosis of immediate or nonimmediate reactions in Europe (9,10). Nevertheless, it imposes technical problems, requires incorporation of radioactive substances and is time-consuming (11).

Different activation markers are expressed on the surface of the T cells after stimulation, such as CD25, CD69, CD71, and HLA-DR. Some papers have described the use of antibodies to CD69 and HLA-DR by flow cytometry to investigate activation markers in drug allergic patients (5,10). The aim of the present work is to search for CD25 and CD69 markers in TCD4 and TCD8 cells after incubation of peripheral blood mononuclear cells with different concentrations of suspected drugs in patients who were classified as having certain or probable drug allergy. The presence of interleukin 5 and interferon gamma was also investigated in cell supernatant.

Materials and Methods

Patients

A number of 20 patients (average age: 57 years, range 23-86 years) with a suspected history of drug hypersensitivity was included in the investigation. Some patients had at least one reaction to one or more suspected drug; therefore, a total of 23 reactions and 10 drugs were investigated. Drug allergy was classified as certain or probable drug allergy history, according to Nyfeler and Pichler (12). A summary of the patients' clinical characteristics is given in Table 1. Blood samples from 12 adult volunteers without previous history of drug hypersensitivity were considered as negative controls in the in vitro tests. Five controls were tested for each drug, except for phenytoin, rifamycin, etanercept (three controls).

After written informed consent, the participants could be included in the project. The project, under the code 011.03.08, was approved on April 28th, 2008 by the Ethics Committee in Research, Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Universidade Federal do Ceara, Brazil.

Skin tests

Drug skin testing included prick and patch tests according to standardized protocols established by the European Society of Contact Dermatitis Workshop (13).

Prick tests were performed on the forearm using the commercial form of the drug. Pure form of the drug was tested whenever possible. Reactions were considered positive when it was observed a wheal with a diameter 3 mm greater than that of the negative control (0.9% saline) after 20 min. A positive control with histamine (10 mg/mL, Immunotech) was systematically included.

Patch test was performed on the patient's back (or on the affected site in case of fixed drug eruption) using the commercial form of the drug or, whenever available, the pure substance. Tablets and capsule contents were tested at 10% and 30% in petrolatum. The results of patch testing were interpreted according to the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG), that is, negative, doubtful or positive (+, ++, +++) after 48 and 72 hours (14), and one week after whenever possible. The epicutaneous patch testing with all suspicious drugs was also performed in 10 healthy volunteers with no previous history of drug allergy. Negative results were observed for all individuals.

Drugs and antigens

Before testing, the suspicious drugs were dissolved in phosphate buffered saline (LGC Biotecnologia, Sao Paulo, Brazil) and adjusted to three different concentrations, according to the procedures described by the authors (7,15). Acetylsalicylic acid, diclofenac, rifamycin, phenytoin, paracetamol, sulfasalazine and betamethasone were previously dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) or in 0.1 M NaOH or in alcohol. All drugs were obtained as pure substances (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and were included in the following

concentrations: 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ for paracetamol, dipyrrone, diclofenac and betamethasone, and 1, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$ for phenytoin, rifamycin and sulfasalazine. Acetylsalicylic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was tested at 10, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$, and captopril (INCQS/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) was tested at 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$. The commercial form of the etanercept (50 mg/mL, Wyeth Pharmaceuticals, Germany) was diluted to concentrations 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$. Phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 2.0 $\mu\text{g/mL}$ was used as a positive control. When no mention for a certain drug concentration was found in the literature, the concentrations of 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$ were used.

Cell preparation and culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and cultured as described by Pichler and Tilch (15), with some modifications. Briefly, PBMC were isolated from heparinized peripheral blood (10 mL) by gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque solution (Sigma-Aldrich, St Lois, MO, USA). Concentrations of 1×10^6 cells/ mL in antibiotic-free RPMI 1640 supplemented with sodium bicarbonate (2 g/L), l-glutamine (2.05 mM) (LGC Biotecnologia, Sao Paulo, Brazil) and 10% heat inactivated AB-serum were cultured with the various drug concentrations in 24-well round-bottom plates (TPP, Switzerland) for 72 h at 37°C and 5% CO_2 (the tests were run in duplicate). Cells incubated with 2.0 $\mu\text{g/mL}$ phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich, St Lois, MO, USA) were considered as positive control. Cells incubated with PBS were considered as the negative controls.

Flow cytometry analysis of CD69 and CD25

CD69 and CD25 expression on $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ T cells were evaluated by flow cytometry FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) with fluorochrome-labelled antihuman monoclonal antibodies (mAb) (PE-CD69, APC-CD25, FITC-CD4, PerCP-CD8; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The results were expressed as normalized mean fluorescence intensity (NMFI), which was calculated by multiplying the percentage of lymphocytes in the double positive quadrant with the mean fluorescence intensity of CD69^+ or CD25^+ , according to Beeler et al. (11). Stimulation indices (SI) were calculated by the

following formula: NMFI in culture medium (CM) with antigen divided by NMFI in CM without antigen. A positive stimulation index was estimated to be equal or above to 2.0, as proposed by Beeler et al. (11) and Pichler; Tilch (15).

IL-5 and IFN- γ measurement in cell culture supernatant

Interleukin (IL)-5 and interferon (IFN- γ) in the cell culture supernatants were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (RayBiotech, USA). The protocols were performed according to the manufacturer. One drug concentration was selected to test the cell supernatant culture, that is, 1 $\mu\text{g/mL}$ (captopril, paracetamol, rifamycin, etanercept, phenytoin); 10 $\mu\text{g/mL}$ (bethametasone, sulfasalazine); 100 $\mu\text{g/mL}$ (diclofenac, dipyrone); 200 $\mu\text{g/mL}$ (acetylsalicylic acid). The analytical sensitivities of the assays were 5 pg/mL and 15 pg/mL, for IL-5 and IFN- γ , respectively. The results were expressed in cytokine concentration (pg/mL).

Statistical analysis

The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare unpaired groups in respect to the stimulation index of CD activation markers in drug allergic-patients compared to healthy individuals. The level of statistical significance was considered to be 0.05. The software used was GraphPad Prism 5.01.

Results

Clinical characteristics of the patients

Patients included in the study presented drug reactions classified in categories A or B, that is, certain or probable, according to Nyfeler and Pichler (12). This means that they had a well-documented history of drug adverse reaction, symptoms of immediate or nonimmediate reactions, and a clear temporal correlation between drug exposure and symptoms.

Although nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are frequently associated with non allergic reactions, one cannot exclude the possibility of a true IgE-mediated allergy to the drugs. For this reason, patients who had clinical manifestations to those drugs were also included in the study. The physicians who participated in the present work did not agree to perform oral provocation tests because of the high risk of causing a severe reaction in the patient by the drug during testing.

The table 1 summarizes some clinical characteristics of the patients with certain or probable drug allergy.

As the patients were selected in a dermatology outpatient clinic, most of them had presented a cutaneous manifestation, with or without systemic symptoms. Two of five acetylsalicylic acid-allergic patients had angioedema, one had urticaria and angioedema, and one presented pruritus. One patient presented photoallergic reaction to acetylsalicylic acid or diclofenac. In regard to diclofenac allergy, one presented pruritus and one had urticaria and angioedema. One of the dipyrrone-allergic patients showed urticaria, one presented leukocytoclastic vasculitis and one had Stevens-Johnson syndrome (SJS). One patient showed a lichenoid eruption to dipyrrone and diclofenac. One of the captopril-allergic patients showed a drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS), one had photoallergic reaction, one had lichenoid eruption and one presented leukocytoclastic vasculitis. One patient showed an erythroderma to captopril or diclofenac. One patient presented fixed drug eruption (FDE) after exposure to paracetamol and one patient presented a maculopapular exanthema (MPE) after exposure to betamethasone. One patient had contact dermatitis after rifamycin topical application. One patient developed acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) after use of etanercept. Two patients suffered from SJS to drugs sulfasalazine and phenytoin.

Table 1. Clinical characteristics of patients with certain or probable history of drug allergy.

Patient	Age/sex		Culprit drugs	Symptoms	Skin test	Time interval*
1	72 years/f	1 st	Acetylsalicylic acid	Pruritus	Positive ^a	6 months
		2 nd	Diclofenac	Pruritus	Positive ^a	6 months
2	57 years/f	1 st	Dipyron	Urticaria	Negative ^a	3 years
3	49 years/m	1 st	Acetylsalicylic acid	Angioedema	Positive ^a	2.6 years
4	61 years/f	1 st	Acetylsalicylic acid	Angioedema	Positive ^a	1 month
5	32 years/f	1 st	Acetylsalicylic acid	Urticaria and angioedema	n.d.	16 months
		2 nd	Diclofenac	Urticaria and angioedema	n.d.	14 months
6	53 years/f	1 st	Dipyron	Leukocytoclastic vasculitis	n.d.	21 months
7	41 years/f	1 st	Captopril	Leukocytoclastic vasculitis	Negative ^b	1 month
8	72 years/m	1 st	Rifamycin	Contact dermatitis	Positive (++) ^b	21 months
9	56 years/m	1 st	Captopril Diclofenac	Erythroderma	Negative ^b Negative ^b	1 year
10	65 years/f	1 st	Betamethasone	MPE	Negative ^b	1.5 year
11	78 years/f	1 st	Captopril	Photoallergic reaction	Positive (+) ^b	22 months
12	79 years/f	1 st	Acetylsalicylic acid Diclofenac	Photoallergic reaction	Positive (+) ^b Negative ^b	20 months
13	23 years/f	1 st	Paracetamol	FDE	Negative ^b	2 years
14	86 years/m	1 st	Captopril	DRESS	Positive (+) ^b	2.5 years
15	53 years/f	1 st	Etanercept	AGEP	Negative ^b	1.5 year
16	50 years/f	1 st	Dipyron	Lichenoid eruption	Negative ^b	2 years
		2 nd	Diclofenac	Lichenoid eruption	Negative ^b	2 years
17	74 years/m	1 st	Captopril	Lichenoid eruption	Positive (+) ^b	21 months
18	33 years/f	1 st	Dipyron	SJS	Negative ^b	16 years
19	49 years/f	1 st	Sulfasalazine	SJS	Negative ^b	3.4 years
20	64 years/m	1 st	Phenytoin	SJS	Positive (++) ^b	3.4 years

AGEP: Acute generalized exanthematous pustulosis; DRESS: Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms; FDE, Fixed drug eruption; SJS: Stevens-Johnson syndrome; MPE: Maculopapular exanthema; f: female; m: male; n.d.: not done.

*Time interval between reaction and testing.

^aPrick test, ^bPatch test.

Drug skin testing

The clinical manifestations after drug administration had occurred 1 month to 16 years before testing. Skin tests were done according to the type of drug hypersensitivity. In cases of pruritus and angioedema, in which IgE participation could be involved, a positive prick was performed. The prick test was performed in 3 of 4 cases of immediate hypersensitivity to acetylsalicylic acid, and resulted positive in all of them. The prick test was also performed in one of the cases of immediate allergy to diclofenac, and the result was positive. In one case of urticaria to dipyron, the prick test was negative and the IDT was not performed because the patient did not allow to.

Two patients presented leukocytoclastic vasculitis after dipyrone and captopril administration. In one of the cases, the patch test was performed but resulted negative, as expected once this type of reaction is considered to be type III hypersensitivity.

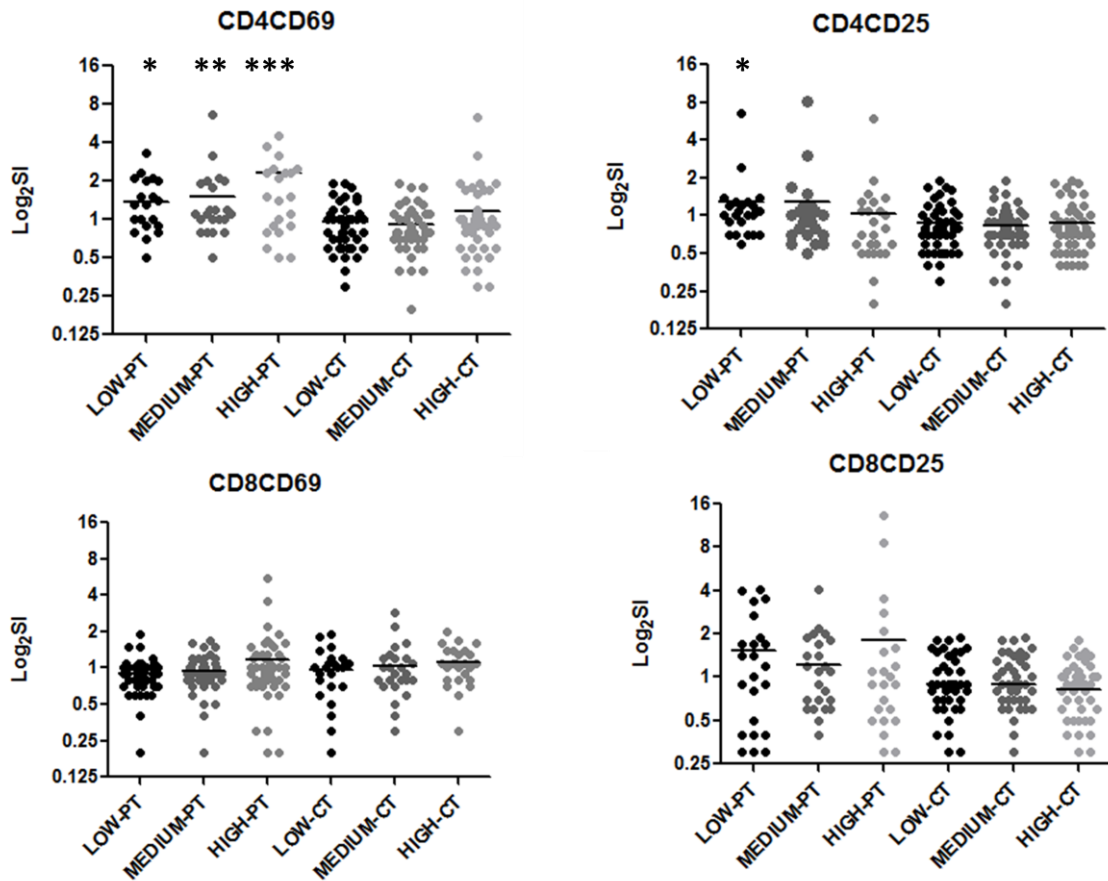
The patch test was positive in one case of contact dermatitis caused by rifamycin, and in one case of Stevens-Johnson caused by phenytoin. The patch test was also positive in three patients with probable allergy to captopril. Another patient with suspected photosensitive reaction induced by two drugs administered at same time showed positive patch test (+) to one of them.

Detection of CD69 and CD25 activation markers in lymphocytes TCD4 and TCD8

The 20 drug-allergic patients were evaluated for CD69 and CD25 upregulation on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The flow cytometry was performed with three different concentrations of the drugs (low, middle, high, see Methods section). The concentrations chosen had been previously found not to be toxic (7,15).

First of all, analyzing altogether, drug-allergic patients (PT) and healthy individuals (CT), irrespectively to the suspected drug, some statistical differences could be found at low, medium and/or high drug concentrations (Figure 1). Comparing activation markers on drug-incubated PBMC between the two groups (Mann-Whitney tests), the greatest differences was found for CD4CD69 ($p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.005$ with low, medium and high drug concentrations, respectively). For CD4CD25, a significant difference comparing the groups could be found in the lowest drug concentration ($p=0.01$). For higher drug concentrations and for the other markers no remarkable differences was found ($p>0.05$).

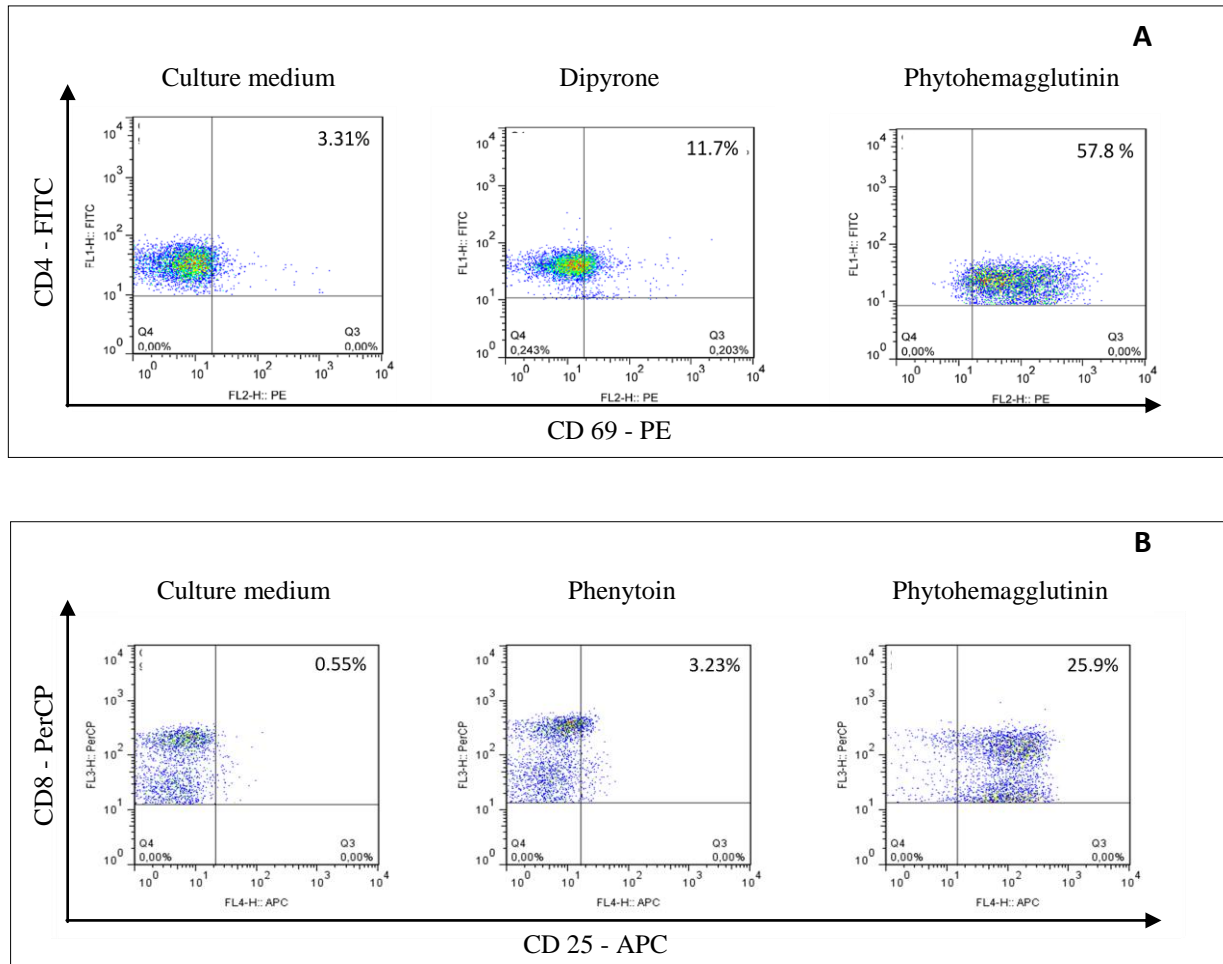
Figure 1. Stimulation index (Log_2SI) for activation surface markers (CD69 and CD25) on T CD4^+ and T CD8^+ lymphocytes from drug-allergic patients (PT) or from healthy individuals (CT) incubated for 72 h with low, medium or high drug concentrations.



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ (Mann-Whitney test).

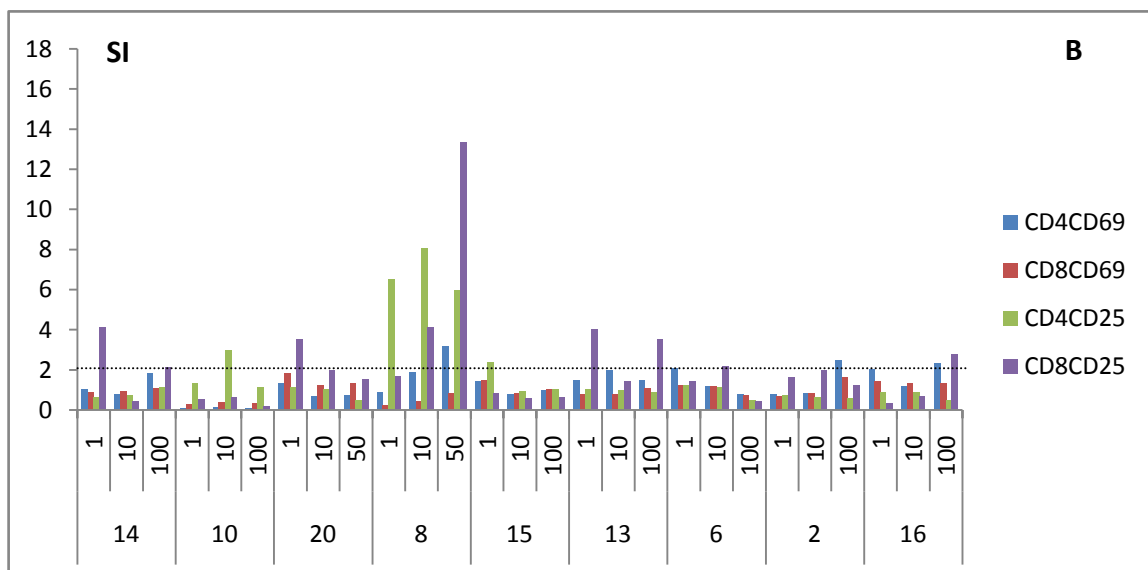
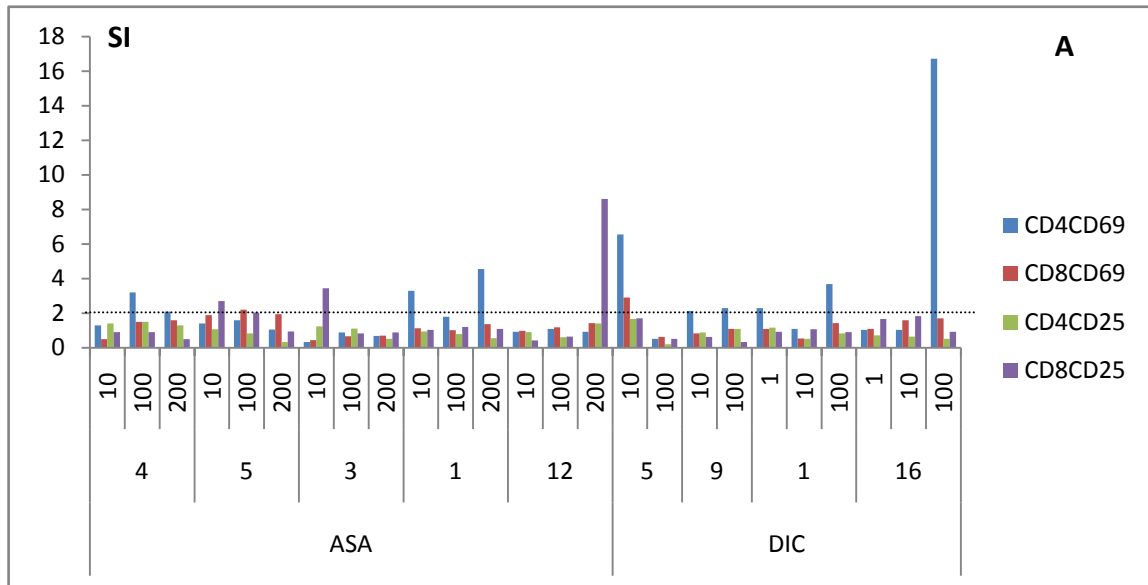
Figure 2A illustrates CD69 upregulation on CD4^+ T cells in a dipyrone-allergic patient. Upon exposure to dipyrone or to phytohemagglutinin, 11.7% and 57.8% of CD4^+ cells showed CD69 expression, respectively, while only 3.3% were positive for the marker upon incubation with culture medium. Figure 2B illustrates CD25 upregulation on CD8^+ T cells in a phenytoin-allergic patient. Upon exposure to phenytoin or phytohemagglutinin, 3.2% and 25.9% of CD8^+ cells showed CD25 expression, respectively, while only 0.6% was positive for the marker upon incubation with culture medium.

Figure 2. Flow cytometric analysis of CD69 upregulation on CD4 T cells from a dipyrone-allergic patient (A) and of CD25 upregulation on CD8 T cells from a phenytoin-allergic patient (B) 72h after culture of peripheral blood mononuclear cells with medium (negative control), suspected drug, or phytohemagglutinin (positive control).



The data in Figure 3 show all the patients who showed stimulation index equal or above to 2 for any of the different drug concentrations. Acetylsalicylic acid (ASA), dipyrone (DIP), paracetamol (PAR) and rifamycin (RIF) were able to induce both markers, CD69 and CD25, in at least one concentration for most of the samples analyzed. Some tests were positive only for one marker, for instance betamethasone (BET) and etanercept (ETN), captopril (CAP) and phenytoin (PHE) could stimulate CD25 and diclofenac (DIC) stimulated CD69. It can be observed that a very high SI for CD4CD69 was found in one patient (#16) probable allergic to DIC. A high SI was also found for CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD25⁺ in a rifamycin-allergic patient (#8), whose patch test was also positive (++)

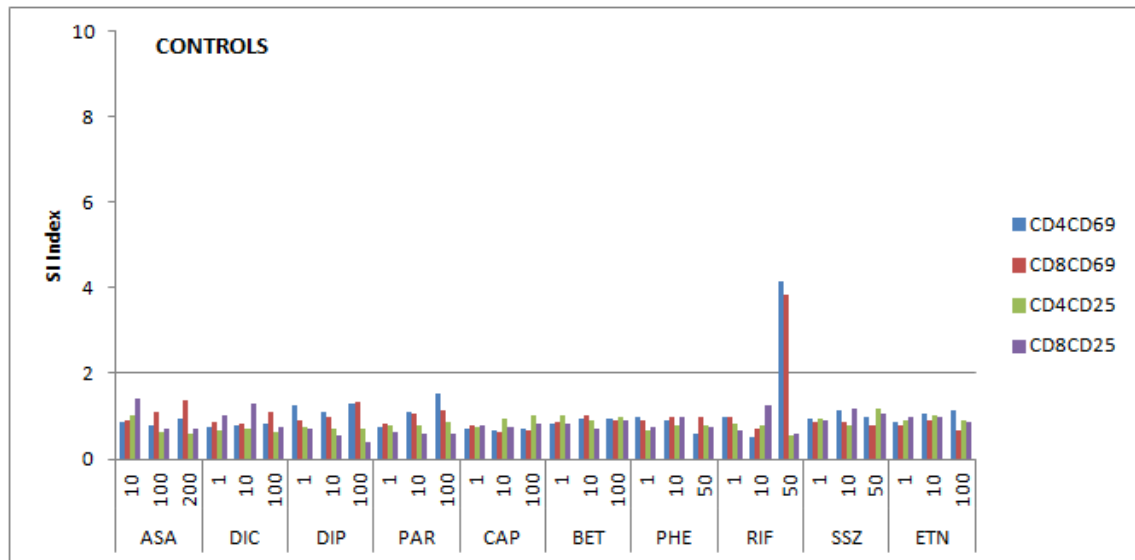
Figure 3. CD69 and CD25 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from all patients who presented stimulation index (SI) above 2 after incubation of peripheral blood mononuclear cells with different concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of the suspected drug in relation to not stimulated cells (A and B).



Acetylsalicylic acid (ASA), diclofenac (DIC), captopril (CAP), betamethasone (BET), phenytoin (PHE), rifamycin (RIF), etanercept (ETN), paracetamol (PAR) and dipyrrone (DIP).

The healthy individuals showed negativity when PBMC were incubated with the same drug concentrations as used in the patients, except for rifamycin in the highest concentration (50 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 4) and for diclofenac, when it was tested at 200 $\mu\text{g/mL}$ (not shown).

Figure 4. Mean of stimulation indices (SI mean) for CD69 and CD25 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells after 72h of incubation with different drug concentrations ($\mu\text{g/mL}$). Five controls were used for each drug testing, except for PHE (n=4), RIF (n=3) and ETN (n=3).



Acetylsalicylic acid (ASA), diclofenac (DIC), captopril (CAP), betamethasone (BET), phenytoin (PHE), rifamycin (RIF), etanercept (ETN), paracetamol (PAR), sulfasalazine (SSZ) and dipyron (DIP).

Figure 5 illustrates the CD25 (A) and CD69 (B) upregulation in two patients (PT), one had presented allergy to rifamycin, and the other to diclofenac. The figure also illustrates a healthy individual, whose PBMCs were assayed in the same conditions. The results were expressed in normalized mean fluorescence intensity (NMFI).

Figure 5. Normalized mean fluorescence intensity (NMFI) of CD4⁺CD25⁺ in a rifamycin-allergic patient (PT) (A) and of CD8⁺CD69⁺ in a diclofenac-allergic patient (B) and in healthy individuals used as controls (CT). The PBMCs from the patients and controls were incubated with the suspected drugs during 72 h. CM means control medium.

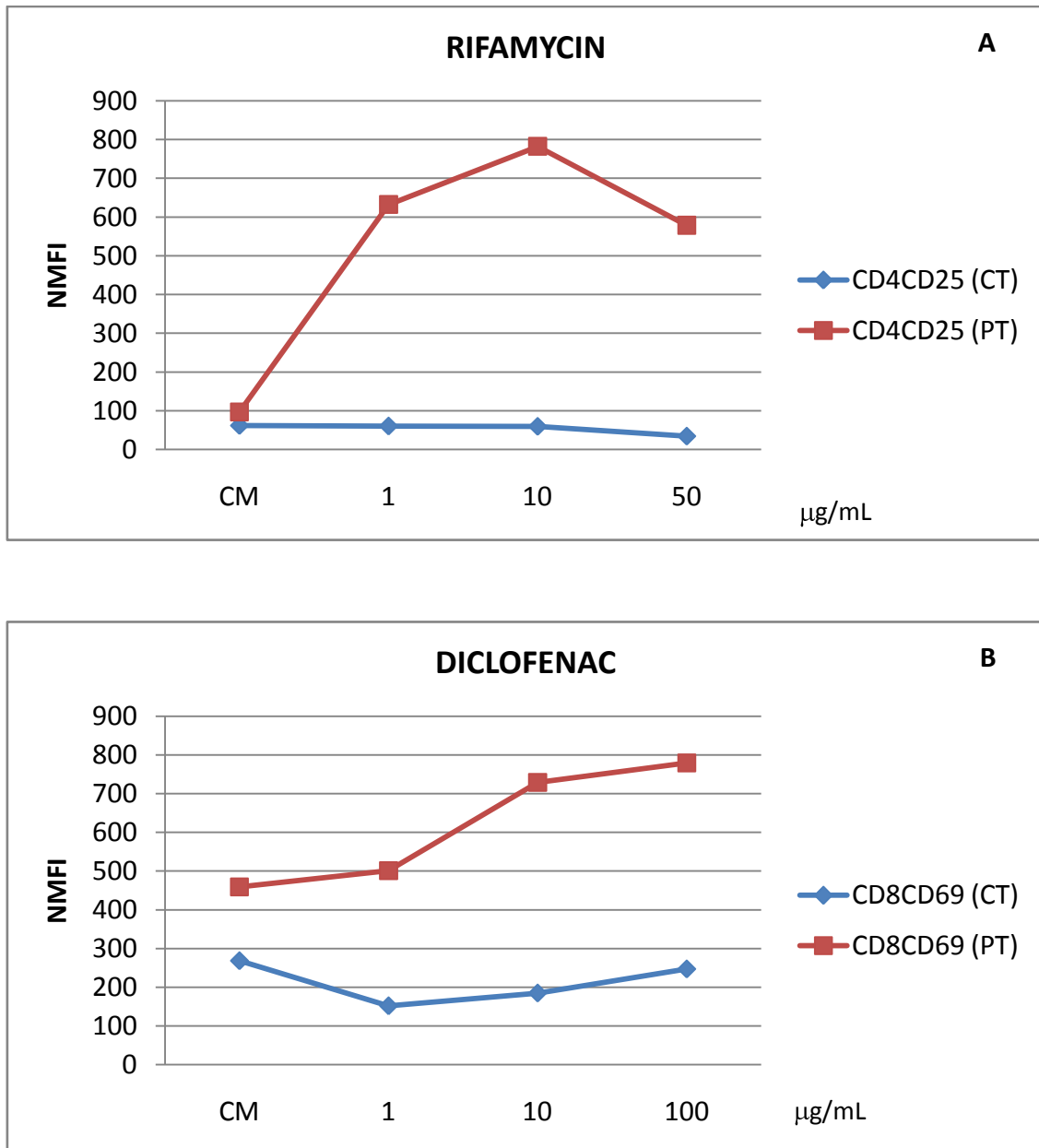


Table 3 presents the activation markers CD69 and CD25 on CD4 and CD8 T cells after incubation of PBMCs from drug-allergic patients (PT) and healthy individuals (CT) during 72h. The result of the skin test was mentioned whenever it was done. The table also shows the concentrations of IL-5 and IFN- γ measured in the cell culture supernatants.

Table 3. Activation markers (CD69 and CD25) on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from drug-allergic patients (PT) and healthy individuals (CT) after incubation of PBMCs with low, medium or high concentrations of the suspected drug. IL-5 and IFN- γ were measured in cell supernatant by enzyme immunoassay and were expressed in pg/mL.

Culprit drug	Id	Cell surface markers [§]				Skin test	Secreted cytokine (pg/mL)	
		CD69		CD25			IL-5	IFN- γ
		CD4	CD8	CD4	CD8			
Acetylsalicylic acid	PT 1	+	-	-	-	Positive	0.5	273.2
	PT 3	-	-	-	+	Positive	3.7	< 15
	PT 4	+	-	-	-	Positive	6.8	< 15
	PT 5	-	+	-	+	n.d.	0.8	< 15
	PT 12	-	-	-	+	Positive	2.1	311.4
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		2.4	305.5
Diclofenac	PT 1	+	-	-	-	Positive	0.5	256.9
	PT 5	+	+	-	-	n.d.	3.4	< 15
	PT 9	+	-	-	-	Negative	1.6	< 15
	PT 12	-	-	-	-	Negative	4.7	277.6
	PT 16	+	-	-	-	Negative	0.8	< 15
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		2.2	370.2
Dipyron	PT 2	+	-	-	+	Negative	0.5	< 15
	PT 6	+	-	-	+	n.d.	2.1	< 15
	PT 16	+	-	-	+	Negative	0.5	< 15
	PT 18	-	-	-	-	Negative	1.6	234.7
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		5.1	215.2
Paracetamol	PT 13	+	-	-	+	Negative	1.0	< 15
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		1.7	419.7
Captopril	PT 7	-	-	-	-	Negative	3.4	< 15
	PT 9	-	-	-	-	Negative	nd	nd
	PT 11	-	-	-	-	Positive	2.1	318.1
	PT 14	-	-	-	+	Positive	0.8	< 15
	PT 17	-	-	-	-	Positive	0.8	227.2
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		2.2	291.9
Betamethasone	PT 10	-	-	+	-	Negative	0.8	< 15
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		1.9	383.6
Phenytoin	PT 20	-	-	-	+	Positive	0.5	339.5
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		2.4	388.6
Rifamycin	PT 8	+	-	+	+	Positive	2.1	< 15
	CT mean (n=2)	+	+	-	-		2.2	520.7
Sulfasalazine	PT 19	-	-	-	-	Negative	3.4	376
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		3.6	397.0
Etanercept	PT 15	-	-	+	-	Negative	0.5	398.0
	CT mean (n=3)	-	-	-	-		4.3	356.2

n.d.: not determined.

[§]CD69 and/or CD25 upregulation on T cells: a stimulation factor of more than 2 is interpreted as positive.

Eight out of 10 skin test-positive patients and 7 out of 12 skin-negative patients were positive for one or both lymphocyte activation markers.

In regard to the cytokines, it was not observed a significant difference comparing drug-allergic patients altogether and healthy individuals (Mann Whitney test, $p>0.05$). Once the number of patients for every drug studied was low, no further comparisons could be done. Anyhow, one patient (#4), whose prick test and surface activation markers were positive, showed an increased level of IL-5 compared to the controls.

5. Discussion

In vivo tests as the epicutaneous tests are used as the first line of investigation in non-immediate reactions, including, fixed drug eruption, contact dermatitis, erythroderma (exfoliative dermatitis), maculopapular exanthema, lichenoid eruption, acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) and drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). Recent studies have suggested that intradermal tests with immediate and delayed readings should be included in the investigation of delayed hypersensitivity to drugs. For instance, IDT delayed positive reactions for corticosteroids have been reported (16). Considering our patients, the IDT might be useful in cases where the patch tests were negative, as in erythroderma, lichenoid and maculopapular drug eruptions. The tests would not be useful in the diagnosis of the type III hypersensitivity (5). Nonetheless, we have performed the patch test in one case. In the case of drug fixed eruption, it is often suggested that the test be performed on the residual pigmented skin site of the reaction (16). In our study, the patch test was performed on the back of the patient who had suffered from a drug fixed eruption but it was negative after 48 hours, as it would be expected. The patient did not allow the test to be performed on the same place of the reaction.

In cases of SJS, the IDT is not recommended due to the possibility of reproducing the reactions. The patch test has a weak sensitivity and few cases of positive results have been reported. Wolkenstein et al. (17) found two patients among the 22 SJS/TEN with positive results. Positive patch tests have been reported for carbamazepine (18) and phenytoin (19). In our study, two patients who suffered from SJS (one caused by dipyron and the other, by

sulfasalazine) presented negative patch test results. One who presented SJS due to phenytoin showed a positive patch test.

Although it is expected a good sensitivity of patch tests in AGEP (16), one patient with reaction probably due to etanercept in our study showed a negative patch test result. At the time of the testing, the patient was taking another anti-TNF what could partially explain the negative results. According to Wee et al. (20), a significant positivity of patch tests can be found even in patients under use of systemic corticosteroids and cytokine inhibitors such as adalimumab, etanercept and infliximab.

Considering patch test to biologic agents, it has already been described previously (21), although it is questioned by some authors (22), once they have high molecular weight (> 500 Da) which could render them difficulties to penetrate the skin.

The results of *in vivo* tests can vary substantially depending on the period of drug sensitization which may decrease over time (16). The majority of the skin tests in our study were performed at least six months after reaction. It is important to remark that although they present high positive predictive value, negative results do not exclude drug allergy (16).

In regard to *in vitro* test, they are not commonly performed during the acute phase of the reactions, because the cells are strongly activated and can result in high background proliferation. In general, the shortest interval period recommended for doing the *in vitro* tests is at least three weeks after the clinical manifestations (5). Some authors found substantial CD69 upregulation on CD4⁺ and CD8⁺ cells in patients in intervals of two months to 12 years after the drug adverse reactions (11). For lymphoproliferative assays, Pichler and Tilch (15) observed that the test could be performed after 10-20 years of the reaction due to betalactams or carbamazepin. In our study, the clinical manifestations after drug administration had occurred 1 month to 16 years before testing.

The CD69 molecule was chosen to be investigated because of its advantage comparing to other activation surface markers, as it is up-regulated quickly (within 18 h), according to some authors (11). We also decided to investigate CD25, once it is a late activation marker, and few papers are found with data related to drug allergy (23). These authors observed that from onset to recovery no CD69 was expressed on the cells but CD25 increased both on CD4 and CD8 cells. They could also demonstrate that these cells did not present CTLA-4; for this reason, they concluded that those cells were activated. One of the limitations of our work was

related to the fact that we could not differentiate CD25 activated cells than CD25 regulatory cells.

Some considerations about the cell culture should be done. First, we decided the time of PBMC incubation with the suspected drug based on some observations done by other authors. It was previously described that when PBMC were stimulated *in vitro* with phytohemagglutinin, the peak of CD69 was reached in 24h and after that time it starts to decrease. It seems that at 72 h there was a decrease corresponding to about 20% less than the levels at 24h. On the other hand, the peak of CD25 occurred after 96h (24). In order to detect both markers, we decided for the period of 72h- incubation. Also, some authors (25) showed a clear increase of these cytokines at the end of the incubation period of 72h. Therefore, in this time interval the cell culture supernatants were removed and stored at -80°C until analysis of interleukin (IL)-5 and interferon (IFN- γ) by means of ELISA. Second, we chose the stimulation index equal or above 2, as the cut-off value for the activation markers, as proposed previously (11). According to these authors, it differentiates drug-allergic patients and non allergic individuals adequately.

In our study, we could verify that high concentrations of rifamycin ($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$) could stimulate CD69 expression in individuals without prior sensitization to the referred drug. Beeler et al. (11) had observed its increase in cells from nonsensitized individuals incubated with clavulanic acid.

We also could verify that the expression of the markers may occur just for one drug concentration; for this reason we truly recommend the use of three concentrations. When no reference about a certain drug concentration was found, we decided to choose to test 1, 10 and $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$.

Analyzing drug-allergic patients altogether in comparison with healthy individuals, we have found a significant statistical difference for $\text{CD4}^+\text{CD69}^+$ in all concentrations of drug tested. It was interesting that the higher drug concentration, the higher statistical difference. It occurred just the opposite with $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$, that is, the higher the drug concentration, the lower statistical difference. We do not know how to explain these data.

No differences were found in regard to the activation markers on CD8 cells. However, we can see, observing the Figure 3, an increase of CD25 expression on CD8 cells in two patients (#8 and #12). The patient with probable allergy to rifamycin (#8) who had showed a

positive patch test, presented increased expression of T CD25 for the three concentrations of the drug.

Considering the skin test, performed in all patients (except for 2), as the gold standard, and CD69 and/or CD25 expression as the dependent variable, we observed 8 true positives and 2 false negatives (out of 10 skin test-positive patients), and 5 true negatives and 7 false positives (out of skin-negative patients). In this way, we roughly speculated that the diagnosis sensitivity was 80% and the diagnosis specificity, 58.3%, for the activation markers testing.

The problem that remains for detection of the activation markers is the same that it occurs for the cytokine measurement in matter of their association with the clinical manifestation. In this aspect, association of activation markers could be useful for drug allergy diagnosis. Lochmatter et al. (25), for instance suggested the association of IL-5, which was considered to be more specific, and IL-2, IL-13 or IFN- γ , which were considered to be more sensitive.

In our work, we have done as described by other authors (26, 27, 28), that is, we measured IL-5 and IFN- γ . In respect to IL-5 we did not find any remarking conclusions because the statistical analysis was not significant when drug-allergic patients and healthy individuals were compared. Lochmatter et al. (25) found presence of IL 5 in 6 of 10 patients studied. We found a patient who had presented CD4⁺CD69⁺ expression, a higher level of IL-5 compared to the controls. This patient had presented angioedema after taking acetylsalicylic acid and showed a positive prick test.

In the present study, our data suggest that detection of CD69 and CD25 activations markers on drug-specific lymphocytes is a promising useful tool in drug allergy diagnosis, both in immediate or in nonimmediate reactions. The association of both markers on CD4 and CD8 would be more informative; moreover, at least three different concentrations of each suspicious drug should be tested in this type of assay, as already done by various authors.

Acknowledgements

This study was financially supported by the CNPq (process 554970/2010-4) and FUNCAP/CAPES (process BMD – 1401-2.08/08).

References

1. Lochmatter P, Zawodniak A, Pichler WJ. In vitro tests in drug hypersensitivity diagnosis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2009;**29**:537-554.
2. Demoly P, Viola M, Gomes ER, Romano A. Epidemiology and causes of drug hypersensitivity. *In: PICHLER, W.J. Drug Hypersensitivity*. 1st ed., Basel: Karger, **2007**, p.2-17.
3. Gomes ER, Demoly, P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2005;**5**:309-316.
4. Thong BY-H, Tan T-C. Epidemiology and risk factors for drug allergy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011;**71**:684-700.
5. Porebski G, Gschwend-Zawodniak A, Pichler WJ. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 2011;**41**:461-470.
6. Klan DA, Solensky R. Drug allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;**125**(2):S126 -S137e1.
7. Martin M, Wurpts G, Ott H, et al. In vitro detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry. *Allergy* 2010;**65**:32-39.
8. Torres MJ, Mayorga C, Blanca M. Nonimmediate allergic reactions induced by drugs: pathogenesis and diagnostics Tests. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2009;**19**:80-90.
9. Luque I, Leyva L, Torres MJ, et al. In vitro T-cell responses to β -lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy* 2001;**56**:611-618.
10. Ebo DG, Leysen J, Mayorga C, et al. The in vitro diagnosis of drug allergy: status and perspectives. *Allergy* **2011**. [Epub ahead of print]
11. Beeler A, Zaccaria L, Kawabata T, et al. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2008;**63**:181-188.
12. Nyfeler B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 1997;**27**:175-181.

13. Barbaud A, Goncalo M, Bruynzeel D, Bircher A. Guidelines for performing skin tests with drugs in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. *Contact Dermatitis* 2001;**45**:321-328.
14. Lachapelle J-M, Maibach HI. *Patch Testing and Prick Testing: A practical guide*. 2nd ed. Verlag-Berlin Heidelberg, **2009**. 203p.
15. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004;**59**:809-820.
16. Barbaud A. Skin testing in delayed reactions to drugs. *Immunol Allergy Clin N Am* 2009;**29**:517-535.
17. Wolkenstein P, Chosidow O, Flechet M-L, et al. Patch testing in severe cutaneous adverse drug reactions, including Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Contact Dermatitis* 1996;**35**:234-236.
18. Lin YT, Chang YC, Hui RC, et al. A patch testing and cross-sensitivity study of carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions. *J Eur Acad Dermatol Venereology* 2012 [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04418.x.
19. Sharma VK, Vatve M, Sawhney IM, Kumar B. Clinical spectrum of drug rashes due to antiepileptics. *J Assoc Physicians India* 1998;**46**:595-597.
20. Wee JS, White JM, McFadden JP, White IR. Patch testing in patients treated with systemic immunosuppression and cytokine inhibitors. *Contact Dermatitis* 2010;**62**:165-169.
21. Seneschal J, Lepreux S, Milpied B, et al. Psoriasiform eruptions during anti-TNF- α treatment: psoriasis or not? *Arch Dermatology* 2007;**143**:1593-1595.
22. Lecluse LL, Piskin G, Bos JD. The use of patch tests in determining hypersensitivity to etanercept and infliximab. *Arch Dermatology* 2008;**144**:1070-1.
23. Nishio D, Izu K, Kabashima K, Tokura Y. T cell populations propagating in the peripheral blood of patients with drug eruptions. *J Dermatol Sci* 2007;**48**:25-33.
24. Antas PRZ, Oliveira EB, Milagres AS, et al. Kinetics of T cell-activation molecules in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;**97**:1097-9.

25. Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT, et al. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2009;**64**:1269-78.
26. Sachs B, Erdmann S, Al-Masaoudi T, Merk HF. In vitro drug allergy detection system incorporating human liver microsomes in chlorazepate-induced skin rash: drug-specific proliferation associated with interleukin-5 secretion. *Br J Dermatol* 2001;**144**:316–320.
27. Halevy S, Cohen AD, Livni E. The diagnostic role of the in vitro drug-induced interferon-gamma release test in Stevens–Johnson syndrome. *Int J Dermatol* 1999;**38**:835–840.
28. Halevy S, Cohen A, Livni E. Acute generalized exanthematous pustulosis associated with polysensitivity to paracetamol and bromhexine: the diagnostic role of in vitro interferon-gamma release test. *Clin Exp Dermatol* 2000;**25**:652–654.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes *in vitro* apresentados neste trabalho mostraram que a expressão dos marcadores de ativação linfocitária CD69 e CD25 foi verificada em 75% das amostras de células mononucleares de sangue periférico incubadas com o fármaco suspeito provenientes de pacientes com diagnóstico provável de reação alérgica a fármacos. A detecção de ambas as moléculas melhorou a sensibilidade dos testes de forma que o uso associado das mesmas pode vir a ser empregado como potente ferramenta auxiliar no diagnóstico de reações imediatas e não-imediatas para identificação do fármaco suspeito. Contudo, faz-se necessário a realização de estudos complementares, principalmente no tocante a um maior número de pacientes e controles saudáveis, bem como a necessidade de melhor investigação sobre o perfil de citocinas secretadas em cultura.

REFERÊNCIAS

- ADAM, J.; PICHLER, W.J.; YERLY, D. Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, p. 701-707, 2011.
- ADKINSON JR., N.F.; ESSAYAN, D.; GRUCHALLA, R.; HAGGERTY, H.; KAWABATA, T.; SANDLER, J.D.; UPDYKE, L.; SHEAR, N.H.; WIERDA, D; THE HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE INSTITUTE TASK FORCE. Task force report: future research needs for prevention and management of immune-mediated drug hypersensitivity reactions. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. S461-478, 2002.
- BARBAUD, A.; GONCALO, M.; BRUYNZEEL, D.; BIRCHER, A. Guidelines for performing skin tests with drugs in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. **Contact Dermatitis**, v. 45, p. 321-328, 2001.
- BARBAUD, A. Drug patch testing in systemic cutaneous drug allergy. **Toxicology**, v. 209, p. 209-216, 2005.
- BARBAUD, A. Skin testing in delayed reactions to drugs. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, p. 517-535, 2009.
- BEELER, A.; PICHLER, W.J. In vitro tests of T-cell-mediated drug hypersensitivity. *In: PICHLER, W.J. Drug Hypersensitivity*. 1st ed. Basel: Karger, 2007. p. 380-390.
- BEELER, A.; ZACCARIA, L.; KAWABATA, T.; GERBER, B.O.; PICHLER, W.J. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. **Allergy**, v. 63, p. 181-188, 2008.
- BELLÓN, T.; BLANCA, M. The innate immune system in delayed cutaneous allergic reactions to medications. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 11, p. 292-298, 2011.
- BIRCHER, A.J. Approach to the patient with a drug hypersensitivity reaction – clinical perspectives. *In: PICHLER, W.J. Drug Hypersensitivity*. 1st ed. Basel: Karger, 2007. p. 352-365.
- 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**, v. 57, p. 45-51, 2002.
- CERNY, A.; BERTOLI, R. Drug allergic liver injury. *In: PICHLER, W.J. Drug Hypersensitivity*. 1st ed. Basel: Karger, 2007. p. 278-294.
- DEMOLY, P.; KROPF, R.; BIRCHER, A.; PICHLER, W.J. Drug hypersensitivity: questionnaire. **Allergy**, v. 54, p. 999-1003, 1999.
- DEMOLY, P.; BOUSQUET, J. Epidemiology of drug allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 1, p. 305-310, 2001.

DEMOLY, P.; VIOLA, M.; GOMES, E.R.; ROMANO, A. Epidemiology and causes of drug hypersensitivity. *In*: PICHLER, W.J. **Drug Hypersensitivity**. 1st ed. Basel: Karger, 2007. p. 2-17.

DE WECK, A.L.; SANZ, M.L.; GAMBOA, P.M.; ABERER, W.; BIENVENU, J.; BLANCA, M.; DEMOLY, P.; EBO, D.G.; MAYORGA, L.; MONNERET, G.; SAINTE-LAUDY, J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 18, p. 143-155, 2008.

EBO, D.G.; LEYSEN, J.; MAYORGA, C.; ROZIERES, A.; KNOL, E.F.; TERREEHORST, I. The in vitro diagnosis of drug allergy: status and perspectives. **Allergy**, v. 66, p. 1275-1286, 2011.

FRIEDMANN, P.S.; LEE, M.S.; FRIEDMAN, A.C.; BARNETSON, R.S. Mechanisms in cutaneous drug hypersensitivity reactions. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 861-872, 2003.

GHOSH, K.; BANERJEE, G.; GHOSAL, A.K.; NANDI, J. Cutaneous drug hypersensitivity: immunological and genetic perspective. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, p. 137-144, 2011.

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**, v. 62, p. 1439-1444, 2007.

KHAN, D.A.; SOLENSKY, R. Drug allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S126–S137e1, 2010.

KISHIYAMA, J. L.; TEVRIZIAN, A. T.; ÁVILA, P. C. Drug allergy. *In*: PARSLOW, T.G.; STITES, D. P.; TERR, A. I.; IMBODEN, J. B. **Medical Immunology**, 10th ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 394-400.

KOUTKIA, P.; MYLONAKIS, E.; ROUNDS, S.; ERICKSON, A. Cutaneous leucocytoclastic vasculitis associated with oxacillin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 39, p. 191-194, 2001.

LACHAPELLE, J.-M.; MAIBACH, H.I. **Patch Testing and Prick Testing: A practical guide**. 2nd ed. Springer: Verlag-Berlin Heidelberg, 2009.

LANDSTEINER, K. **The specificity of serological reactions**. Cambridge: Harvard University Press, 1946.

LIEBERMAN, P.; KEMP, S.F.; OPPENHEIMER, J.; LANG, D.M.; BERNSTEIN, I.L.; NICKLAS, R.A.; ANDERSON, J.A.; BERNSTEIN, D.I.; BERNSTEIN, J.A.; FINK, J.N.; GREENBERGER, P.A.; LEDFORD, D.K.; LI, J.; SHEFFER, A.L.; SOLENSKY, R.; WOLF, B.L.; BLESSING-MOORE, J.; KHAN, D.A.; LEE, R.E.; PORTNOY, J.M.; SCHULLER, D.E.; SPECTOR, S.L.; TILLES, S.A. The diagnosis and management of anaphylaxis: an updated practice parameter. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, p. S483-523, 2005.

LOCHMATTER, P; ZAWODNIAK, A.; PICHLER, W.J. In vitro tests in drug hypersensitivity diagnosis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, p. 537-554, 2009.

LOCHMATTER, P; BEELER, A.; KAWABATA, T.T.; GERBER, B.O.; PICHLER, W.J. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. **Allergy**, v. 64, p. 1269-1279, 2009.

LUQUE, I.; LEYVA, L.; TORRES, M.J.; ROSAL, M.; MAYORGA, C.; SEGURA, J.M.; BLANCA, M.; JUÁREZ, C. In vitro T-cell responses to β -lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. **Allergy**, v. 56, p. 611-618, 2001.

MARTIN, T.; HUI, L. Severe cutaneous adverse drug reactions: a review on epidemiology, etiology, clinical manifestation and pathogenesis. **Chinese Medical Journal**, v. 121, p. 756-761, 2008.

MARTIN, M.; WURPTS, G.; OTT, H.; BARON, J.M.; ERDMANN, S.; MERK, H.F.; SACHS, B. In vitro detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry. **Allergy**, v. 65, p. 32-39, 2010.

MAYORGA, C.; SANZ, M.L.; GARCÍA, B.E.; CABALLERO, M.T.; GARCÍA, J.M.; LABRADOR, M.; LAHOZ, C.; LONGO ARESO, N.; LÓPEZ HOYOS, M.; MARTÍNEZ QUESADA, J.; MONTESEIRÍN, F.J. In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 20, p. 103-109, 2010.

MESSAAD, D.; SAHLA, H.; BENAHMED, S.; GODARD, P.; BOUSQUET, J.; DEMOLY, P. Drug provocation tests in patients with a history suggesting an immediate drug hypersensitivity reaction. **Ann Inter Med**, v. 140, p. 1001-1006, 2004.

MIRAKIAN, R.; EWAN, P.W.; DURHAM, S.R.; YOULTEN, L.J.F.; DUGUÉ, P.; FRIEDMANN, P.S.; ENGLISH, J.S.; HUBER, P.A.; NASSER, S.M. BSACI guidelines for the management of drug allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 39, p. 43-61, 2009.

NAGAO-DIAS, A.T.; BARROS-NUNES, P.; COELHO, H.L.L.; SOLÉ, D. Allergic drug reactions. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 259-266, 2004.

NYFELER, B.; PICHLER, W.J. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 27, p. 175-181, 1997.

PARK, M. A.; LI, J.T.C. Diagnosis and management of penicillin allergy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 80, p. 405-410, 2005.

PICHLER, W. J. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 2, p. 301-305, 2002a.

PICHLER, W. J. Pathogenesis of drug-induced exanthems. **Allergy**, v. 57, p. 884-893, 2002b.

PICHLER, W. J.; TILCH, J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. **Allergy**, v. 59, p. 809-820, 2004.

PICHLER, W.J.; BEELER, A.; KELLER, M.; LERCH, M.; POSADAS, S.; SCHMID, D.; SPANOU, Z.; ZAWODNIAK, A.; GERBER, B. Pharmacological interaction of drug with immune receptors: the p-i concept. **Allergology International**, v. 55, p. 17-25, 2006.

PICHLER, W.J. Drug hypersensitivity reactions: classification and relationship to T-cell activation. *In*: PICHLER, W.J. **Drug Hypersensitivity**. 1st ed. Karger: Basel, Switzerland, 2007. p.168-189.

PICHLER, W.J.; ADAM, J.; DAUBNER, B.; GENTINETTA, T.; KELLER, M.; YERLY, D. Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. **Medical Clinics of North America**, v. 94, p. 645–664, 2010.

PICHLER, W.J.; NAISBITT, D.J.; PARK, B.K. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, p. S74-S81, 2011.

POREBSKI, G.; GSCHWEND-ZAWODNIAK, A.; PICHLER, W.J. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 41, p. 461-470, 2011.

POSADAS, S.J.; PICHLER, W.J. Delayed drug hypersensitivity reactions – new concepts. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 989-999, 2007.

REDDY, M.; EIRIKIS, E.; DAVIS, C.; DAVIS, H.M.; PRABHAKAR, U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. **Journal of Immunological Methods**, v. 293, p. 127-142, 2004.

ROMANO, A.; TORRES, M.J.; CASTELLS, M; SANZ, M.L.; BLANCA, M. Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, p. S67-S73, 2011.

SANZ, M. L.; GAMBOA, P. M.; DE WECK, A. L. Cellular tests in the diagnosis of drug hypersensitivity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 2803-2808, 2008.

SCHERER, K.; BIRCHER, A.J. Danger signs in drug hypersensitivity. **Medical Clinics of North America**, v. 94, p. 681-689, 2010.

SCHNYDER B. Approach to the patient with drug allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, p. 405-418, 2009.

SCHNYDER, B.; PICHLER, W.J. Mechanisms of drug-induced allergy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 84, p. 268-272, 2009.

SCHNYDER B. Approach to the patient with drug allergy. **Medical Clinics of North America**, v. 94, p. 665-679, 2010.

STARSKA, K.; GŁOWACKA, E.; KULIG, A.; LEWY-TREND, I.; BRYŚ, M.; LEWKOWICZ, P. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity - the expression of the early CD69⁺, CD71⁺ and the late CD25⁺, CD26⁺, HLA/DR⁺ activation markers on T CD4⁺ and CD8⁺ cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. **Folia Histochemica Cytobiologica**, v. 49, p. 579-592, 2011.

THONG, B.Y-H.; TAN, T-C. Epidemiology and risk factors for drug allergy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, p. 684-700, 2011.

TORRES, M.J.; MAYORGA, C.; BLANCA, M. Nonimmediate allergic reactions induced by drugs: pathogenesis and diagnostics Tests. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, p. 80-90, 2009.

ANEXO A

Title: Secondary leprosy infection in a patient with psoriasis during treatment with infliximab.

Artigo publicado no periódico *Journal of Clinical Rheumatology*, v. 17, p. 269-71, 2011.

CASE REPORT

Secondary Leprosy Infection in a Patient With Psoriasis During Treatment With Infliximab

Fabricia Martins Teixeira,* Luciana Mabel Ferreira Vasconcelos,† Clarissa de Alencar Diogenes Rola, MD,‡
 Thereza Lúcia Prata de Almeida, MD, MSc,§ José Telmo Valença, Jr; PhD,§
 and Aparecida Tiemi Nagao-Dias, PhD||

Abstract: Tumor necrosis factor α antagonists are proven to be effective for the treatment of chronic inflammatory conditions, such as psoriasis. A major concern for patients is the risk of acquiring granulomatous infectious diseases caused by the immunosuppressive effects of the drugs. We report a 60-year-old man with psoriasis who underwent infliximab treatment for 2 years and developed secondary leprosy, presenting extensive erythematous and infiltrated plaques on the trunk and limbs with loss of sensitivity (thermal, pain and tactile). The skin lesion biopsy showed perivascular epithelioid granulomas, nodular dermal aggregates of foamy macrophages and bundles of acid-fast bacilli. The clinical picture associated with histopathologic evaluation suggested borderline lepromatous leprosy. Before infliximab treatment, the patient had a positive tuberculin skin test and underwent chemoprophylaxis treatment for latent tuberculosis. Although the tuberculin reactivity suggests a strong correlation with a latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, the possibility of infections by other mycobacteria, such as *Mycobacterium leprae*, should not be discarded.

Key Words: psoriasis, anti-TNF therapy, infliximab, leprosy

(*J Clin Rheumatol* 2011;17: 269–271)

Psoriasis is a chronic immune-mediated disease characterized by inflammatory infiltrates in the skin and hyperproliferation of keratinocytes; moreover, it may also affect the joints.^{1,2} Infliximab is a chimeric monoclonal IgG1 antibody indicated for the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis, and other chronic inflammatory diseases.³ Some adverse effects are associated with the use of infliximab, including reactions related to its infusion, lupus-like syndrome, demyelinating conditions, and lymphomas. Moreover, there is a potential risk for the development or reactivation of serious infectious diseases.¹ Infectious agents associated with the use of TNF- α neutralizing agents include microorganisms such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Listeria*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, and *Aspergillus*.³ Leprosy or Hansen disease (HD) is a chronic infectious disease caused by *M. leprae* and is considered to be an endemic public health problem for many developing countries, including Brazil. We report the case of a patient who received infliximab

for psoriasis and subsequently developed borderline lepromatous HD during the treatment of the primary disease.

CASE REPORT

A 60-year-old white man from the state of Ceara, Brazil, presented with erythrodermic psoriasis with psoriatic arthritis for 4 years. Clinical examination revealed generalized itchy exfoliative erythroderma. A skin lesion biopsy suggested psoriasis vulgaris. The disease did not respond to topical and systemic corticosteroids and methotrexate, prompting the use of infliximab. Before the initiation of the infliximab treatment, the patient presented a positive tuberculin skin test (24 mm), normal chest x-ray (CXR), mild leukocytosis, increased erythrocyte sedimentation rate (80 mm), and no history of tuberculosis (TB). Prophylactic treatment for TB, isoniazid 5 mg/kg daily for 9 months, was administered as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention.⁴ The TB prophylaxis was initiated 3 months before infliximab therapy. The infliximab regimen (infusions of 5 mg/kg at weeks 0, 2, and 6 and every 2 months thereafter) coupled with methotrexate (7.5 mg/wk orally) was administered for 2 years. The patient showed an improvement of skin lesions but persistent arthralgia, especially in the hands. A few days after the 14th dose of infliximab, the patient presented extensive erythematous and infiltrated plaques on the trunk and limbs (Fig. 1) that were not characteristic of psoriasis. The lesions on the upper limbs were hyperchromic and non-itchy, with loss of sensitivity (thermal, pain, and tactile). The infliximab treatment was suspended, and lymph smears, biopsy, CXR, and the tuberculin skin test were performed. The new CXR was normal; the lymph smears stained by the Ziehl-Neelsen method were positive; the tuberculin reaction was 7 mm; and the skin lesion biopsy showed perivascular epithelioid granulomas, nodular dermal aggregates of foamy macrophages, and bundles of acid-fast bacilli (Fig. 2). The patient was treated with a standard multidrug therapy recommended by the Brazilian Ministry of Health, which consisted of rifampicin (600 mg monthly), dapsone (100 mg daily), and clofazimine (50 mg daily).⁵ After 2 weeks, the patient showed improvement of the lesions; nonetheless, the clinical examination revealed multiple vesicles and hemorrhagic crusted lesions on the left lower back diagnosed as reactivation of the varicella zoster virus infection (Fig. 3). He was treated with acyclovir (4 g/d for 7 days). One month later, he was admitted to hospital for recurrence of crusted lesions, poor general condition, pancytopenia, lethargy, fever, appetite loss, and low diuresis. Treatment with acyclovir was restarted; methotrexate treatment was discontinued because of unresolved pancytopenia; and the leprosy treatment was discontinued because of acute renal failure. At this time, his psoriatic lesions were no longer active. The bone marrow aspiration revealed discrete hyperplasia in the erythrocytic series and moderate hypoplasia in the granulocytic lineage, with 2% blasts and mature cells without alterations. Serum antibodies against *M. leprae*-specific phenolic glycolipid antigen 1 were not detected after 2 months of leprosy; nonetheless, salivary anti-phenolic glycolipid antigen IgA was

From the *Posgraduation Program of Biotechnology (RENORBIO), †Posgraduation Program of Pharmaceutical Sciences, ‡Department of Dermatology, Hospital Universitário Walter Cantídio, §Department of Pathology, Faculty of Medicine, and ||Department of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil.

This research was financially supported by CNPq (process 402509/2005-6). The authors declare no conflicts of interest.

Correspondence: Fabricia Martins Teixeira, Department of Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceara, Rua Capitaó Francisco Pedro, 1210, CEP 60430-370 Fortaleza, Ceara, Brazil. E-mail: briaciamt@yahoo.com.br.

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 1076-1608/11/1705-0269

DOI: 10.1097/RHU.0b013e3182288870

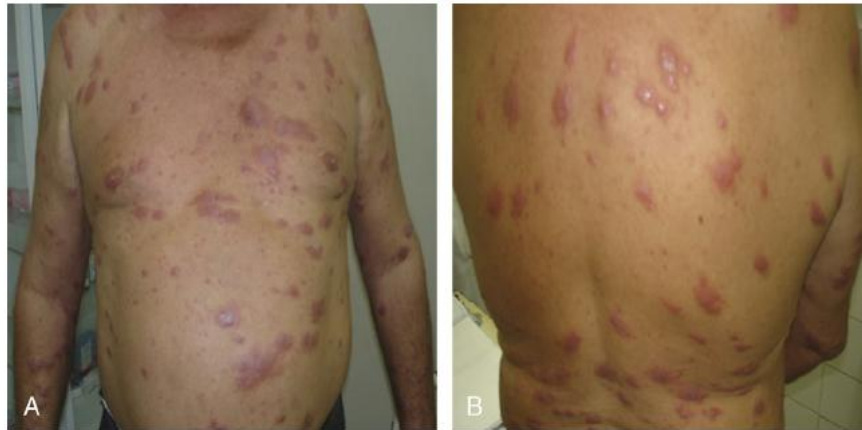


FIGURE 1. Skin lesions: extensive erythematous and infiltrated plaques on trunk and limbs (A) and back (B). Color online-only figures are available at <http://www.jclinrheum.com>.

found. The patient presented with exacerbation of psoriatic lesions and depression. He was prescribed prednisone (15 mg/d) and, after clinical reassessment, resumed treatment for leprosy and psoriasis. However, the day after the consultation, the patient was admitted in the intensive care unit with community-acquired pneumonia, respiratory failure, and adrenal insufficiency. After 3 days, the patient died of septic shock with pulmonary focus. Blood cultures revealed *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*.

DISCUSSION

The association of TNF inhibitors with an increased risk of infections, including sepsis, TB, and other opportunistic infections, is strongly evidenced in the literature.^{5,6} Recommendations and guidelines have been developed for all patients before the initiation of the treatment with this kind of drug. According to the guidelines, the patient should be properly evaluated with liver function tests, complete blood cell counts, hepatitis serol-

ogy markers, and tuberculin skin tests.³ In 2001, Keane et al⁷ observed a significant correlation between infliximab treatment and the development of TB; the majority of cases (91%) were described in countries with a low incidence of the disease.

In 2008, Wallis⁸ reported that *M. tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria, and *M. leprae* represented about 75%, 17%, and 8% of the granulomatous infections (129 cases), respectively, in 197,000 American patients treated with infliximab or etanercept.

Scollard et al⁹ reported 2 cases of borderline lepromatous HD after 1 to 2 years of infliximab treatment in US-born residents. Recently, Lopes et al⁵ reported a Brazilian case of lepromatous HD after the patient received 4 courses of the drug.

The diagnosis of HD in our patient was firmly established by clinical and histopathologic criteria. The manifestation of leprosy after a short period of treatment with infliximab reflects a previous subclinical infection because the typical incubation time for the *M. leprae* infection is 3 to 5 years.⁹ Before treatment with infliximab, the patient had used other immunosuppressive

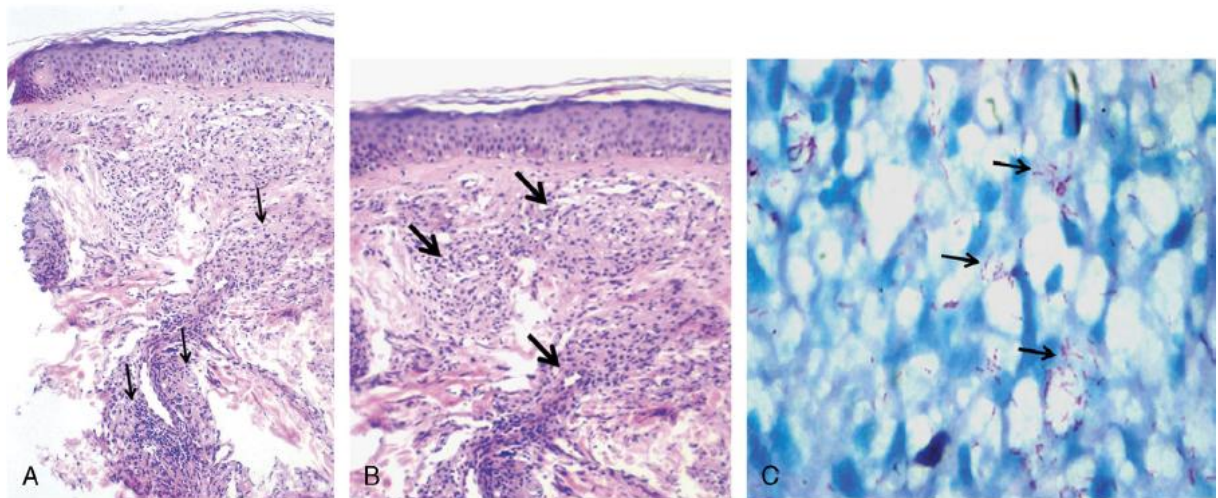


FIGURE 2. Skin lesions showed (A) perivascular epithelioid granulomas (arrows; hematoxylin-eosin staining, original magnification $\times 100$); (B) some nodular dermal aggregates of foamy macrophages and lymphocytes are also seen around vessels (arrows; hematoxylin-eosin staining, original magnification $\times 200$). C, The section presents some bundles of acid-fast bacilli (arrows; Ziehl-Neelsen staining, original magnification $\times 1000$). Color online-only figures are available at <http://www.jclinrheum.com>.



FIGURE 3. Skin lesion: multiple vesicles and hemorrhagic crusted lesions on the left lower back. Color online-only figure is available at <http://www.jclinrheum.com>.

drugs for years; however, these drugs did not affect host immunity against the *M. leprae*.

Although Brazil is still considered an endemic country for leprosy and ranks second in number of cases worldwide,¹⁰ there is currently no recommendation to screen for *M. leprae* infection.

In regions where leprosy is considered to be endemic, the possibility that the tuberculin test may be positive when the patient is infected with *M. leprae* should not be discarded. For this reason, physicians prescribing anti-TNF drugs should evaluate patients based on a detailed current and past personal and family history of leprosy, as well as a careful physical examination.

The methotrexate was discontinued because of the high risk of having caused pancytopenia in the patient. Pancytopenia is an uncommon toxic effect of the drug.¹¹ On the other hand, the varicella zoster virus reactivation in our patient was probably associated with the use of infliximab, because it is known that TNF- α inhibits the virus replication.¹² Other reports have also been published regarding this association.¹³

The patient was admitted to the hospital with community-acquired pneumonia; after 3 days, he contracted a nosocomial infection caused by *K. pneumoniae* and *C. albicans*, which culminated in septic shock and death. The use of the infliximab drug greatly contributed to a bad outcome in our patient. Indeed, the Food and Drug Administration warns about the risk of serious and potentially life-threatening infections, including sepsis and disseminated TB, during anti-TNF therapy.⁶ Finally, our case report emphasizes the need for more rigorous and periodic

monitoring not only for TB, but also for leprosy, during anti-TNF treatment.

REFERENCES

1. Pastore S, Gubinelli E, Leoni L, et al. Biological drugs targeting the immune response in the therapy of psoriasis. *Biologics*. 2008;2:687–697.
2. Leman JA, Burden AD. Treatment of severe psoriasis with infliximab. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4:1165–1176.
3. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:826–850.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Guide for primary health care providers: targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. 2005. Available at: <http://www.cdc.gov/TB/publications/LTBI/pdf/TargetedLTBI05.pdf>. Accessed December 17, 2009.
5. Lopes RV, Ohashi CB, Cavaleiro LH, et al. Development of leprosy in a patient with ankylosing spondylitis during the infliximab treatment: reactivation of a latent infection? *Clin Rheumatol*. 2009;28:615–617.
6. US Food and Drug Administration. Safety update on TNF- α antagonists: infliximab and etanercept. Available at: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3779b2_01_cber_safety%20_revision2.pdf. Accessed December 17, 2009.
7. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001;345:1098–1104.
8. Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:601–611.
9. Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis*. 2006;43:e19–e22.
10. Nagao-Dias AT, Almeida TL, Oliveira MF, et al. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. *Braz J Infect Dis*. 2007;11:215–219.
11. Lim AY, Gaffney K, Scott DG. Methotrexate-induced pancytopenia: serious and under-reported? Our experience of 25 cases in 5 years. *Rheumatology*. 2005;44:1051–1055.
12. Domm S, Cinatl J, Mrowietz U. The impact of treatment with tumour necrosis factor-alpha antagonists on the course of chronic viral infections: a review of the literature. *Br J Dermatol*. 2008;159:1217–1228.
13. Strangfeld A, Listing J, Herzer P, et al. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. *JAMA*. 2009;301:737–744.

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 4011-8213 - FAX: (85) 281-4961 - E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 011.03.08

Pesquisadora Responsável: Fabrícia Martins Teixeira

Departamento / Serviço:

Título do Projeto: “Avaliação da atividade linfoproliferativa e de seus marcadores com ferramenta diagnóstica nas reações de hipersensibilidade cutânea e fármacos”.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou na sessão do dia 28/04/08 o projeto de pesquisa: “**Avaliação da atividade linfoproliferativa e de seus marcadores com ferramenta diagnóstica nas reações de hipersensibilidade cutânea e fármacos**”, tendo como pesquisadora responsável Fabrícia Martins Teixeira.

Baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), o Comitê de Ética resolve classificar o referido projeto como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 28/04/09).

Fortaleza, 30 de abril de 2008.

Dra. Mônica Cardoso Façanha
Coordenadora do CEP - HUWC

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de adesão ao estudo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **AValiação da Atividade Linfoproliferativa e de seus Marcadores como Ferramenta Diagnóstica nas Reações de Hipersensibilidade Cutânea a Fármacos**, que tem como principal objetivo estabelecer métodos de diagnóstico das reações alérgicas a medicamentos. Para tanto, necessitamos realizar com o sr. (a) apenas um questionário e a coleta de 10 ml de sangue em tubo contendo anti-coagulante (para as hemácias não coagularem) para aplicação das técnicas desenvolvidas. O Sr. (a) poderá sentir o desconforto quando receber a picada para colher o sangue do seu antebraço. Não há benefício direto para o participante, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Recomendações: O paciente deve estar na fase remissiva da doença e saudável no momento da análise.

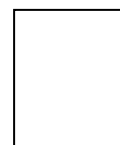
Nós, pesquisadores, garantimos que:

1. Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos pacientes.
2. O paciente poderá contactar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC para apresentar recursos ou reclamações relativas ao estudo (Ana Paula, tel 3366 8589) ou para a Responsável do Projeto (farmacêutica Fabrícia Martins Teixeira, tel 9621 2920).
3. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
4. É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
5. É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
6. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Fortaleza, de _____ de 20__.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Se necessário, concordo também em ser fotografado.

Assinatura do paciente _____
/representante legal
Assinatura de quem aplicou o termo _____
/responsável pelo estudo
Testemunha _____



ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para realização de testes cutâneos.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **AValiação da Atividade Linfoproliferativa e de seus Marcadores como Ferramenta Diagnóstica nas Reações de Hipersensibilidade Cutânea a Fármacos**, que tem como principal objetivo estabelecer métodos de diagnóstico das reações alérgicas a medicamentos. Para tanto, necessitamos realizar com o sr. (a) um questionário e um teste de alergia a medicamentos. O Sr. (a) poderá sentir um incômodo em decorrência da aplicação da agulha na face anterior do antebraço, ficando o local levemente inflamado. O teste alérgico poderá ser realizado duas vezes, caso o primeiro teste seja negativo. O Sr. (a) será acompanhado (a) no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. As leituras do teste cutâneo (primeiro teste) e do teste intra-dérmico (segundo teste) são feitas 15 minutos após a aplicação, e após 2 dias caso apareça alguma reação ou ainda a reação permaneça positiva. Caso algum resultado esteja alterado, o profissional médico será comunicado e, caso for identificado o medicamento responsável pela reação, o mesmo será substituído.

Benefícios da realização do teste: O teste positivo indica que o paciente pode vir a ter uma reação alérgica ao receber ao medicamento. No caso de alergia a penicilina, o teste negativo indica que o paciente provavelmente não desenvolverá reação alérgica ao receber o antibiótico.

Riscos da realização do teste: O teste alérgico apresenta um pequeno risco de causar reações colaterais, como falta de ar, prurido, rubor, tosse, dor torácica, congestão nasal e da conjuntiva.

Contra-indicação do teste: Caso a pessoa tenha tido comprovadamente uma reação grave anterior a medicamento, o teste não deve ser realizado.

Recomendações: O paciente deve interromper uso de anti-histamínicos 5 dias antes do teste.

Nós, pesquisadores, garantimos que:

1. Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos pacientes.
2. O paciente poderá contactar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC para apresentar recursos ou reclamações relativas ao estudo (Ana Paula, tel 3366 8589) ou para a Responsável do Projeto (farmacêutica Fabrícia Martins Teixeira, tel 9621 2920).
3. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
4. É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
5. É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
6. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Fortaleza, de _____ de 20__.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

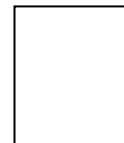
Assinatura do paciente _____

/representante legal

Assinatura de quem aplicou o termo _____

/responsável pelo estudo

Testemunha _____



ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para realização de testes epicutâneos.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LINFOPROLIFERATIVA E DE SEUS MARCADORES COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA NAS REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE CUTÂNEA A FÁRMACOS**, que tem como principal objetivo estabelecer métodos de diagnóstico das reações alérgicas a medicamentos. Para tanto, necessitamos realizar com o sr. (a) um questionário e um teste de alergia a medicamentos. O Sr. (a) poderá sentir um incômodo em decorrência da aplicação da câmara no dorso, ficando o local levemente irritado. O Sr. (a) será acompanhado (a) no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. As leituras do teste epicutâneo serão feitas 20 minutos após a aplicação, e também após 2, 4 e 7 dias da aplicação. Caso algum resultado esteja alterado, o profissional médico será comunicado e, caso for identificado o medicamento responsável pela reação, o mesmo será substituído.

Benefícios da realização do teste: O teste positivo indica que o paciente pode vir a ter uma reação alérgica ao receber o medicamento. O teste negativo não exclui a possibilidade de o paciente ser alérgico ao medicamento.

Riscos da realização do teste: O teste alérgico pode causar um efeito secundário após a aplicação do mesmo, como a urticária, o que constitui indicação para suspender o teste.

Contra-indicação do teste: O teste não deve ser realizado caso as reações cutâneas não tenham cessado.

Recomendações: O paciente deve ser orientado a não realizar movimentos bruscos, e de não molhar o local durante o período do teste. O paciente deve ter interrompido o uso de corticóides ou imunossuppressores, há pelo menos 3 semanas atrás.

Nós, pesquisadores, garantimos que:

1. Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos pacientes.
2. O paciente poderá contactar a Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC para apresentar recursos ou reclamações relativas ao estudo (Ana Paula, tel 3366 8589) ou para a Responsável do Projeto (farmacêutica Fabrícia Martins Teixeira, tel 9621 2920).
3. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
4. É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
5. É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
6. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Fortaleza, de _____ de 20__.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

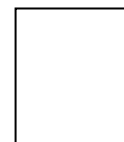
Assinatura do paciente _____

/representante legal

Assinatura de quem aplicou o termo _____

/responsável pelo estudo

Testemunha _____



ANEXO F – Questionário de investigação de hipersensibilidade a fármacos.

MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE SUAS CITOCINAS COMO FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS NA HIPERSENSIBILIDADE ALÉRGICA A FÁRMACOS

QUESTIONÁRIO

Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC

Nº Ficha: _____

Investigador

Nome: _____ Data: _____ Tel/ Cel: () _____

Identificação do paciente

Nome: _____ Nº Prontuário: _____ Setor: _____
Profissão: _____ Idade: ____ anos DN: ____ / ____ / ____ Sexo: M F Peso: ____ kg Altura: ____ cm
Endereço: _____
Tel/ Cel: () _____

História atual: _____

Reação ao fármaco: _____ Data da reação: _____
(Podem ser assinaladas múltiplas opções; se necessário, a opção mais importante pode ser sublinhada; a cronologia pode ser caracterizada numericamente)

• MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Exantema Maculopapular | <input type="checkbox"/> Dermatite de contato |
| <input type="checkbox"/> Exantema Macular | <input type="checkbox"/> Causa tópica <input type="checkbox"/> Causa sistêmica |
| <input type="checkbox"/> Exantema urticariforme | <input type="checkbox"/> Conjuntivite |
| <input type="checkbox"/> Pustulose aguda generalizada | <input type="checkbox"/> Vasculite urticariforme |
| <input type="checkbox"/> Exantema eczematóide | <input type="checkbox"/> Prurido isolado |
| <input type="checkbox"/> Eritema multiforme | <input type="checkbox"/> Urticária |
| <input type="checkbox"/> Exantema bolhoso | <input type="checkbox"/> Angiodema/ Localização: _____ |
| <input type="checkbox"/> Sdr Stevens Johnson/ TEN (S. Lyell) | <input type="checkbox"/> Outras/ Especificar: _____ |
| <input type="checkbox"/> Erupção fixa induzida por drogas | <input type="checkbox"/> Morfologia/ Localização: _____ |
| <input type="checkbox"/> Púrpura → Contagem de plaquetas: _____ | |
| <input type="checkbox"/> Palpável | <input type="checkbox"/> Hemorrágica/ necrolisante |
| | <input type="checkbox"/> Com envolvimento de órgãos viscerais: _____ |

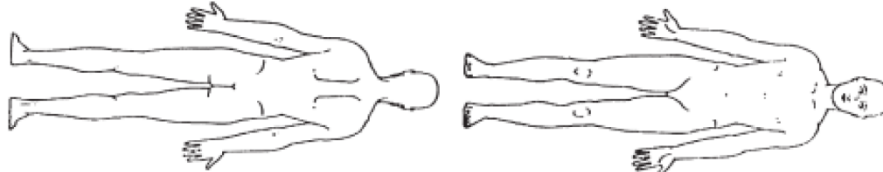
• DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL:

- _____

• FATORES ASSOCIADOS:

- | | |
|--|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Infecções virais: <input type="checkbox"/> Sdr gripal <input type="checkbox"/> Outro: _____ | <input type="checkbox"/> Febre |
| <input type="checkbox"/> Suspeita de fotossensibilidade? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhece | <input type="checkbox"/> Exercício |
| <input type="checkbox"/> Outras/ Especificar: _____ | <input type="checkbox"/> Stress |

• DISTRIBUIÇÃO CUTÂNEA DAS LESÕES/ DINÂMICA (↑↓):



Generalizada

MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE SUAS CITOCINAS COMO FERRAMENTAS
DIAGNÓSTICAS NA HIPERSENSIBILIDADE ALÉRGICA A FÁRMACOS

• SINTOMAS GASTROINTESTINAIS E RESPIRATÓRIOS:

- () Náuseas () Vômitos () Diarréia () Cólicas/ dores abdominais
 () Tosse () Rinite () Rinorréia
 () Disfonia () Obstrução nasal () Espirros
 () Dispneia: _____ () Pieira/ Broncoespasmos () Outros/ Especificar: _____

• SINTOMAS ASSOCIADOS:

- Envolvimento: Hepático Renal Outros/ Especificar: _____
 () Febre _____°C () Mal estar () Linfadenopatia
 () Dor/ ardor Localização: _____ () Edema/ Localização: _____
 () Artralgia/Mialgia Localização: _____ () Outros/ Especificar: _____

• SINTOMAS CARDIOVASCULARES:

- () Taquicardia Pulso: _____/min () Hipotensão TA: _____ mmHg
 () Choque () Arritmia () Outros/ Especificar: _____

• SINTOMAS PSÍQUICOS:

- () Medo/ Reação de pânico () Vertigem () Sensação de desmaio
 () Parestesias/ Hiperventilação () Sudorese () Outros/ Especificar: _____

• ENVOLVIMENTO DE OUTROS ÓRGÃOS: (ex. neuropatia periférica, envolvimento pulmonar, citopenia, etc.)

- _____

• Referir todos os fármacos incluindo automedicação, produtos naturais e alimentos contendo aditivos usados quando ocorreu a reação: _____

• FÁRMACOS SUSPEITOS: _____

Tratamento durante a reação: Nome genérico ± aditivos / Indicação:	Dose diária / Via de administração / Duração do tto.:	Intervalo entre a dose e a reação:	Tratamento prévio com a mesma droga:
1.	_____ mg/d; _____; _____ d		<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido <input type="checkbox"/> Sim → Sintomas: _____
2.	_____ mg/d; _____; _____ d		<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido <input type="checkbox"/> Sim → Sintomas: _____
3.	_____ mg/d; _____; _____ d		<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido <input type="checkbox"/> Sim → Sintomas: _____
4.	_____ mg/d; _____; _____ d		<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido <input type="checkbox"/> Sim → Sintomas: _____
5.	_____ mg/d; _____; _____ d		<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido <input type="checkbox"/> Sim → Sintomas: _____
6.	_____ mg/d; _____; _____ d		<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido <input type="checkbox"/> Sim → Sintomas: _____

• ORIENTAÇÃO TERAPÊUTICA APÓS REAÇÃO AGUDA:

- () Suspendeu o fármaco suspeito No. _____ () Diminuição da dose (fármaco nº ____)
 () Mudança para fármaco alternativo/s: _____
 () Outras/ Especificar: _____

MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE SUAS CITOCINAS COMO FERRAMENTAS
DIAGNÓSTICAS NA HIPERSENSIBILIDADE ALÉRGICA A FÁRMACOS

- CD / TRATAMENTO ATUAL: _____

- EVOLUÇÃO CLÍNICA: _____

- HISTÓRIA PESSOAL:
 - 1) Teve sintomas semelhantes sem a administração dos fármacos suspeitos? Sim Não Desconhece
 - 2) História clínica:

<input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Doenças Auto-imune (Sjögren, Lupus, etc.) <input type="checkbox"/> Polipose nasal <input type="checkbox"/> Fibrose cística <input type="checkbox"/> Infecção HIV <input type="checkbox"/> Doença Hepática: _____ <input type="checkbox"/> Outras/Especificar: _____	<input type="checkbox"/> Urticária crônica <input type="checkbox"/> Urticária pigmentosa / mastocitose sistêmica <input type="checkbox"/> Linfoproliferativa (LLA, LLC, Hodgkin, etc.) <input type="checkbox"/> Cirurgia por patologia discal vertebral <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Doença Renal: _____
--	---
 - 3) Doenças alérgicas: _____
(ex. polinose, dermatite atópica, alergia alimentar, alergia ao veneno de insetos, alergia ao látex, etc.)
 - 4) Reações a drogas durante cirurgias prévias: _____ Dentária Anestesia Local Anestesia Geral
 - 5) Reações a imunizações prévias: _____
 Polio Tétano Rubéola Sarampo Hepatite B Difteria Outra: _____ Desconhecida

- HISTÓRIA FAMILIAR: Alergias / Alergias a fármacos: _____

- PROCEDIMENTOS DIAGNÓSTICOS (EXAMES/ DATA/ RESULTADOS):

MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE SUAS CITOCINAS COMO FERRAMENTAS
 DIAGNÓSTICAS NA HIPERSENSIBILIDADE ALÉRGICA A FÁRMACOS

Hemograma:									
Hb									
Ht									
VCM									
HCM									
Leucócitos									
Bast / Segm									
Eo / Bas									
Linf									
Mon									
Plaquetas									
VHS									
Triptase									
Prot cat eosinof									
PCR									
F. Hepática:									
TGO									
TGP									
γGT									
FA									
BT									
Função renal:									
Cr									
Ur									
Metilhistamina									
Sorologia:									
CMV - IgG									
CMV - IgM									
EBV - IgG									
EBV - IgM									

() Biópsia cutânea: _____

() Outros/ Especificar: _____

• **DIAGNÓSTICO:**

Testes cutâneos:	Fármaco (s):	Resultados:
() Prick test	_____	_____
() Intradérmico	_____	_____
() Patch test	_____	_____
Outras análises:	_____	_____
() IgE total	_____	_____

Modificado com base no artigo: DEMOLY, P.; KROPF, R.; BIRCHER, A.; PICHLER, W. J. Drug hypersensitivity: questionnaire. *Allergy*, v. 54, p. 999-1003, sep. 1999.