

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
Campus Virchow Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Überempfindlichkeit gegen parenterale Antibiotika bei Patienten mit  
Mukoviszidose:  
Prävalenz, Charakteristika, Risikofaktoren, Prävention und zelluläre in-vitro  
Allergietests als diagnostische Verfahren

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jobst Fridolin Röhmel  
aus Berlin

Datum der Promotion: 30. Mai 2015

## **Zusammenfassung**

### **Einleitung:**

Überempfindlichkeitsreaktionen gegen parenterale Antibiotika (hypersensitivity reactions to parenteral antibiotics = HRPAs) sind ein wesentliches Problem bei der Behandlung von Patienten mit Mukoviszidose. Diese Patienten benötigen lebenslang Antibiotikabehandlungen mit hohen kumulativen Dosen im Vergleich zu Patienten mit anderen Erkrankungen. Im klinischen Alltag werden zunehmend HRPAs beobachtet. Aus diesem Grund wurde diese Beobachtungsstudie zu HRPAs, deren Prävalenz, Häufigkeit, Risikofaktoren und Präventionsmöglichkeiten durchgeführt. Daran wurde eine Pilotstudie zu dem diagnostischen Wert zellulärer in-vitro Allergietestverfahren für diese Problematik angeschlossen.

### **Methoden:**

Durch Interviews und systematische Aktenauswertung wurden Daten zu Alter, Geschlecht, FEV<sub>1</sub>,  $\Delta$ F508genotype, *Pseudomonasbesiedlung*, Allergianamnese (inklusive Informationen zu IgE-Serumspiegel, ABPA und spezifische IgE-Screeningtests für Aeroallergene), parenteraler Antibiotikaexposition und HRPAs (Zeitpunkt, Symptome und Behandlung) gesammelt. Eingeschlossen waren alle Kinder und Erwachsene des Zentrums mit > 3 vorangegangenen intravenösen Antibiotikakursen. Für die Pilotstudie wurden in der Beobachtungsstudie identifizierte Patienten rekrutiert, bei denen mindestens ein parenterales Antibiotikum aufgrund von HRPAs nicht mehr verabreicht wird. Insgesamt wurden bei dreizehn Patienten Basophilenaktivierungstests (BAT) und Lymphozytentransformationstests (LTT) für die jeweils beschuldigten Antibiotika durchgeführt.

### **Ergebnisse:**

Von den 100 in die Studie eingeschlossenen Patienten hatten 60 mindestens eine HRPAs. Insgesamt wurden 3205 Antibiotikakurse mit 185 HRPAs dokumentiert. 15% der HRPAs erfüllten die Kriterien für eine Anaphylaxie. Die Mehrzahl der Symptome war dermal (53%). Während der ersten vier Tage des meist 14-tägigen Behandlungskurses traten 81% aller und 80% der anaphylaktischen HRPAs auf. Ca. 10% aller Behandlungskurse mit Cefepim und Piperacillin/Tazobactam verursachten HRPAs. Die Anzahl der Jahre mit *Pseudomonasbesiedlung* und die kumulative, jährliche Exposition spezifischer Antibiotika

waren signifikante Risikofaktoren für HRPAs in dieser Patientenkohorte. Die Pilotstudie zeigte zwei positive BAT bei zwei Patienten und sieben positive LTT bei fünf Patienten.

**Schlussfolgerungen:**

HRPAs sind mit einer Prävalenz von 60% sehr relevant. Während der ersten vier Tage der antibiotischen Behandlungskurse könnte ein erhöhtes Risiko für HRPAs bestehen. HRPAs erscheinen medikamentenspezifisch und abhängig von der kumulativen, jährlichen Dosis der spezifischen Antibiotika zu sein. Es scheint, dass hohe kumulative Dosen des gleichen Antibiotikums über einen kurzen Zeitraum zu einem höheren Risiko für HRPAs führen können, als die gleiche Dosis über einen längeren Zeitraum. Die Pilotstudie zeigte hauptsächlich bei den LTT, also T-zellulären Tests, positive Ergebnisse. Dieser Hinweis auf eine T-zelluläre Komponente der HRPAs ist unter anderem gut mit der fehlenden Assoziation mit Atopie vereinbar. Diagnostische Algorithmen für HRPAs sollten weiter entwickelt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und aktueller Veröffentlichungen bezüglich antibiotikaspezifischer Lymphozyten bei Patienten mit Mukoviszidose wäre eine weitere Aufklärung der Immunologie von HRPAs wünschenswert.

## **Abstract**

### **Introduction:**

Hypersensitivity reactions to parenteral antibiotics (HRPA) are a major problem in the treatment of patients with cystic fibrosis (CF). These patients require life-long antibiotic treatment with high cumulative doses compared to other patients. In clinical practice HRPA are increasingly observed. Therefore, this observational study about HRPA was performed focusing on their prevalence, incidence, risk factors and prevention opportunities, followed by a pilot study on the diagnostic value of cellular in vitro allergy tests regarding HRPA.

### **Methods:**

Through interviews and systematic chart evaluation data about age, sex, FEV1,  $\Delta$ F508 genotype, *Pseudomonas* colonization, allergy (including information on IgE-serum levels, ABPA and specific IgE-screening tests for aeroallergens), parenteral antibiotic exposure and HRPA (timing, symptoms and treatment) were gathered. Included were children and adults with > 3 previous courses of intravenous antibiotics. Thirteen patients who were identified in the observational study and had at least one parenteral antibiotic in abstention due to HRPA were enrolled into the pilot study. Those patients underwent basophil activation tests (BAT) and lymphocyte transformation tests (LTT) for each accused antibiotic.

### **Results:**

Of 100 patients included in the study, 60 had  $\geq 1$  HRPA. Overall, 3205 antibiotic courses with 185 HRPA were ascertained. 15% of HRPA met the criteria for anaphylaxis. Symptoms were mostly dermal (53%). 81% of all and 80% of anaphylactic HRPA occurred during days 1-4. Approximately 10% of all antibiotic courses with cefepime and piperacillin/tazobactam caused HRPA. The duration with *pseudomonal* colonisation and the cumulative annual exposure of the given antibiotic were significant risk factors for HRPA. The pilot study revealed two positive BAT in two patients and seven positive LTTs in five patients.

**Conclusions:**

With a prevalence of 60% HRPAs are very relevant. During day 1-4 of antibiotic courses an increased risk for HRPAs could exist. HRPAs appear to be drug-specific and dependent on the cumulative annual dose of specific antibiotics. High cumulative doses of the same antibiotic in a short period could put patients at a higher risk for HRPAs than the same dose over a prolonged period of time. The pilot study showed mainly positive results for LTT, the T-cellular tests. This evidence for a T-cellular component of HRPAs is well compatible with the lack of association with atopy. Diagnostic algorithms for HRPAs need to be developed further. Based on these results and current publications on antibiotic-specific lymphocytes in patients with CF a further elucidation of the immunology of HRPAs would be desirable.

## **Vorwort**

im Zusammenhang mit meiner Promotion sind seit Beginn meiner Mitarbeit im September 2010 in der Arbeitsgruppe Mukoviszidose der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie bzw. am Christiane-Herzog-Zentrum-Berlin und der Arbeitsgruppe Immunologische Grundlagen von allergischen Erkrankungen folgende Veröffentlichungen entstanden:

### **1. Originalarbeiten:**

Roehmel, J.F. et al., 2014. Hypersensitivity to antibiotics in patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 13(2), pp.205–211.

### **2. Korrespondenz:**

Roehmel, J.F. & Staab, D., 2014. Answer to "Letter to the Editor" concerning the article "Hypersensitivity to antibiotics in patients with cystic fibrosis" by Roehmel et al. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 13(3), pp.355–356.

### **3. Posterbeiträge bei Konferenzen:**

- Deutsche Mukoviszidose Tagung in Würzburg 11/2011: „Erhebung der Prävalenz und Inzidenz von Reaktionen gegen Antibiotika bei Patienten mit Cystischer Fibrose und Identifikation von Risikofaktoren“ – ausgezeichnet mit dem 1. Posterpreis.
- Postervortrag bei der North American Cystic Fibrosis Conference in Orlando/ USA 10/2012: „Hypersensitivity to antibiotics in patients with Cystic Fibrosis“
- Postervortrag bei der Tagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie in Lübeck, 3/2013: Unverträglichkeit parenteraler Antibiotika bei Patienten mit Mukoviszidose - Risikofaktoren und Charakteristika
- Postervortrag bei dem Drug Hypersensitivity Meeting der EAACI in Bern/ Schweiz 4/2014: Hypersensitivity to parenteral antibiotics in patients with Cystic Fibrosis

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1. Pathophysiologie und klinisches Bild der Mukoviszidose	11
1.2. Epidemiologie der Mukoviszidose	14
1.3. Multimodale Behandlung der Mukoviszidose	15
1.4. Probleme und Folgen der Behandlung von Mukoviszidose	19
1.5. Diagnostik von Medikamentenunverträglichkeiten	20
<b>2. Fragestellung und Motivation</b>	<b>23</b>
<b>3. Methodik</b>	<b>26</b>
3.1. Beobachtungsstudie	26
3.1.1. Durchführung am Christiane-Herzog-Zentrum	26
3.1.2. Studienpopulation der Beobachtungsstudie	26
3.1.3. Ausgestaltung der Studie	27
3.1.4. Statistische Analyse	32
3.2. Pilotstudie	33
3.2.1. Überblick	33
3.2.2. Basophilenaktivierungstests (BAT)	34
3.2.3. Lymphozytentransformationstests (LTT)	41
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
4.1. Beobachtungsstudie	43
4.1.1. Überblick über die Patientencharakteristika	43
4.1.2. Prävalenz der HRPAs	44
4.1.3. Risiko der Antibiotika für HRPAs	44
4.1.4. Charakteristika der HRPAs	48
4.1.5. Zeitlicher Verlauf der HRPAs	52
4.1.6. Risikofaktoren für HRPAs	55
4.1.7. Kumulative Dosis als Risikofaktor für HRPAs	57
4.1.8. Auftreten von HRPAs in Bezug auf den Beginn der antibiotischen Behandlung	58
4.1.9. Therapeutische Strategien bei HRPAs	60
4.2. Pilotstudie	61
4.2.1. BAT	61
4.2.2. LTT	64

<b>5. Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>5.1. Beobachtungsstudie</b>	<b>65</b>
5.1.1. Überblick	65
5.1.2. Zeitlicher Verlauf der HRP	65
5.1.3. Risiko der Antibiotika für HRP	67
5.1.4. Risikofaktoren für HRP	67
5.1.5. Stärken und Schwächen der Beobachtungsstudie	68
<b>5.2. Pilotstudie</b>	<b>70</b>
5.2.1. BAT als diagnostisches Verfahren bei Überempfindlichkeit gegen parenterale Antibiotika	70
5.2.2. LTT als diagnostisches Verfahren bei Überempfindlichkeit gegen parenterale Antibiotika	70
<b>5.3. Ausblick</b>	<b>71</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>80</b>
<b>7.1. Fragebogen</b>	<b>80</b>
<b>7.2. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>81</b>
<b>7.3. Lebenslauf</b>	<b>83</b>
<b>7.4. Publikationsliste</b>	<b>86</b>
<b>7.5. Danksagung</b>	<b>87</b>

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verdünnungsreihen der Medikamente .....	36
Tabelle 2: Parameter der Flowcytometrie .....	38
Tabelle 3: Liste der für BAT und LTT verwendeten Chemikalien.....	42
Tabelle 4: Patientencharakteristika .....	43
Tabelle 5: Verteilung der HRPAsymptome.....	49
Tabelle 6: Verteilung der Symptomkombination der HRPAsymptome.....	51
Tabelle 7: Risikofaktoren der HRPAsymptome: Regressionsergebnisse.....	56
Tabelle 8: Kumulative Dosis als Risikofaktor .....	57
Tabelle 9: Ergebnisse der Basophilenaktivierungstests .....	62
Tabelle 10: Ergebnisse der Lymphozythentransformationstests.....	64

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zusammenfassung von allergologischen Diagnoseverfahren.....	22
Abbildung 2: BAT Negativkontrolle.....	39
Abbildung 3: BAT Positivkontrolle .....	40
Abbildung 4: Anteil der Behandlungskurse mit HRPAsymptomen.....	45
Abbildung 5: Anteil der Behandlungskurse mit schwerer HRPAsymptomatik.....	46
Abbildung 6: Anteil der Behandlungskurse mit anaphylaktischer HRPAsymptomatik.....	47
Abbildung 7: Anteil der HRPAsymptome mit den entsprechenden Symptomgruppen. ....	50
Abbildung 8: Verteilung der Symptome pro Antibiotikum. ....	52
Abbildung 9: Anteil der HRPAsymptome in Abhängigkeit des Behandlungstages.....	53
Abbildung 10: Anteil der schweren HRPAsymptome in Abhängigkeit des Behandlungstages. ....	54
Abbildung 11: Anteil der anaphylaktischen HRPAsymptome in Abhängigkeit des Behandlungstages..	55
Abbildung 12: Verteilung der Dauer von Beginn der iv Antibiotikabehandlung bis zur ersten HRPAsymptomatik .....	59
Abbildung 13: Altersverteilung zu Beginn der iv Antibiotikabehandlung .....	60
Abbildung 14: Beispiel eines positiven BAT.....	63

## Abkürzungsverzeichnis

ABPA	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
AI	Aktivierungsindex
BAT	Basophilen Aktivierungstest
CD	Cluster of differentiation
CF	Cystische Fibrose
CFLD	Cystic Fibrosis related Liver Disease
CFRD	Cystic Fibrosis related Diabetes
CPM	Counts per Minute
DIOS	Distales intestinales Obstruktionssyndrom
DLTX	Doppellungentransplantation
FcεRI	Fcε-Rezeptoren
FEV1	forcierte Einsekundenkapazität
FSC	forward scatter
HRPA	Überempfindlichkeitsreaktion gegen parenterale Antibiotika
IgE	Immunglobulin E
iv	Intravenös
LAT	Lymphozyten Aktivierungstest
LTT	Lymphozyten Transformationstest
PA	Pseudomonas aeruginosa
RAST	Radio Immuno Absorbent Assay
SI	Stimulationsindex
SSC	sideward scatter
SX1	Screening Test für inhalative Allergene
WAO	World Allergy Association

# 1. Einleitung

## 1.1. Pathophysiologie und klinisches Bild der Mukoviszidose

### *Was ist Mukoviszidose?*

Mukoviszidose (Cystische Fibrose = CF) ist eine genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang. Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) führen zu einer verringerten Sekretion von Chloridionen am apikalen Pol der Drüsenzellen. Diese verringerte Sekretion führt vor allem zu einer erhöhten Viskosität der Sekrete der exokrinen Drüsen mit zahlreichen Folgen für den erkrankten Patienten.

### *Wie wurde Mukoviszidose entdeckt?*

Historisch übermittelt sollen Hebammen an Mukoviszidose erkrankte Kinder schon früh an dem salzigen Geschmack auf der Haut erkannt haben, damals starben die Kinder meist im ersten Lebensjahr. Klinisch ist die Mukoviszidose seit den 1930iger Jahren bekannt (Andersen 1938). Der Zusammenhang von Mukoviszidose und einem erhöhten Chloridgehalt im Schweiß wurde erstmalig in den 1950er Jahren beschrieben (Darling et al. 1953). Die Identifikation des verantwortlichen Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 gelang jedoch erst vor 25 Jahren. Damals wurden in der Septemberausgabe des Fachmagazins Science mehrere Arbeiten parallel veröffentlicht, die das Gen identifizierten (Rommens et al. 1989; Riordan et al. 1989; Kerem et al. 1989).

### *Wie wird Mukoviszidose diagnostiziert?*

Der erhöhte Chloridionengehalt, der durch die mangelnde Rückresorption des Chlorids aus dem Filtrat der Schweißdrüsen bedingt ist, wird für den Schweißtest, der die Chloridkonzentration im Schweiß misst, genutzt (Gibson & Cooke 1959). Der Test ist nach wie vor der Goldstandard für die Diagnose der CF. Chloridkonzentrationen von größer als 30 mmol/l werden als pathologisch gewertet. Im Anschluss an einen positiven Schweißtest wird heutzutage in der Regel eine genetische Analyse zur Identifikation der Mutation des CFTR-Gens durchgeführt. Dies geschieht mittels eines Screenings nach den häufigsten Mutationen. Nur in seltenen Fällen ist eine Sequenzierung des gesamten Gens notwendig. Die Kenntnis des Genotyps des Patienten ist heute notwendig, da mittlerweile unterschiedliche Verläufe und auch spezifische Therapieansätze für einzelne Mutationen

bekannt sind. Als weitere diagnostische Möglichkeiten finden beim Neugeborenenenscreening die Bestimmungen von immunoreaktivem Trypsinogen (Davies et al. 2007) bzw. von pankreatitis-assoziiertem Protein im Blut Anwendung (Sommerburg et al. 2010). Weitere Diagnosemöglichkeiten sind die Untersuchung der exokrinen Pankreasfunktion durch Bestimmung der Elastase im Stuhl und die Messung von nasalen Potentialdifferenzen. Männer mit milden Verläufen der CF können durch ein Spermogramm auffallen; eine obstruktive Azoospermie ohne Vorliegen anderer Gründe ist ein starker Hinweis auf eine CF (Stern 1997).

Die mehr als 1900 bekannten CFTR Mutationen werden in fünf Klassen nach ihrem Einfluss auf die Synthese bzw. auf die Funktion des CFTR Proteins eingeteilt (De Boeck et al. 2014). Eingruppiert wird nach molekularen Mechanismen welche die CFTR Synthese, den CFTR Transport oder die CFTR Funktion unterbrechen:

- Klasse I Mutationen : Verkürzte oder nicht funktionierende CFTR Proteine.
- Klasse II Mutationen: Falsch gefaltete CFTR Proteine, die durch das Proteasom abgebaut werden und so bis zum völligen Fehlen von CFTR Protein auf der Zellmembran führen können. Die häufigste Mutation  $\Delta F508$  gehört zur Klasse II.
- Klasse III Mutationen: Komplette CFTR Proteine in den Zellmembranen, die jedoch eine defekte Regulation haben und somit keinen Chloridionenfluss zulassen.
- Klasse IV Mutationen: Verringerte Chloridionenleitfähigkeit.
- Klasse V Mutationen: Deutlich reduzierte Anzahl von CFTR Proteinen mit normaler Funktion.

#### *Klinische Auswirkung der Mukoviszidose*

Die fehlende oder mangelnde Funktion des CFTR (Davies et al. 2007), die - vereinfacht formuliert - zu einer erhöhten Viskosität der Drüsensekrete führt, kann Funktionseinschränkungen multipler Organe bedingen und bis zu deren Zerstörung führen. Des Weiteren liegen mittlerweile Forschungsergebnisse vor, die das Vorliegen eines mukosalen Immundefektes bei Patienten mit CF beschreiben (Cohen & Prince 2012). Die zähen Sekrete führen in erster Linie zu einer Beeinträchtigung der oberen und unteren Atemwege, des Gastrointestinaltraktes – besonders betroffen sind dabei Leber und Pankreas - sowie der Fertilität (bei Männern häufiger als bei Frauen).

Generell treten die Beeinträchtigungen der Organsysteme in unterschiedlicher Ausprägung auf. Zum Teil sind diese vorhersehbar, z.B. haben Patienten mit genetisch determinierter Pankreasinsuffizienz in der Regel auch einen schwereren Verlauf der pulmonalen Erkrankung (Loubières et al. 2002). Häufig werden aber auch unterschiedliche klinische Verläufe und ein unterschiedliches Ausmaß des Organbefalls bei genetisch identischen CFTR Mutationen beobachtet. Umweltfaktoren wie z.B. der Beginn einzelner Keimbepielungen (Konstan et al. 2007; Henry et al. 1992) und der sozioökonomische Status der Eltern (Taylor-Robinson et al. 2013; Schechter et al. 2009) sind als weitere wesentliche Faktoren für das Outcome bei CF zu nennen.

In den oberen Atemwegen kommt es aufgrund einer graduellen Zerstörung des zilientragenden Epithels durch den zähen Mukus und chronische Infektionen zu einer Abnahme bis hin zu einer vollständigen Zerstörung der mukoziliären Clearance und häufig zu chronischen Besiedelungen des Nasen-Rachenraumes und der Nebenhöhlen mit gramnegativen Stäbchen und somit zu chronischen Sinusitiden. Ähnliches gilt für die unteren Atemwege. Die Folgen der eingeschränkten mukoziliären Clearance und der chronischen Infektionen sind die Entstehung von Bronchiektasen und Bullae, also einer Zerstörung von vitalem Lungengewebe mit einer konsekutiven Abnahme der Lungenfunktion. Hämoptysen sind eine häufige Komplikation, insbesondere bei fortgeschrittener Lungenerkrankung. Die dauerhaften pulmonalen Infektionen können zu einer chronischen Hyperinflammation (Jacquot et al. 2008) unterschiedlicher Ausprägung bei Patienten mit CF mit dem klinischen Leitsymptom der bronchialen Obstruktion führen. Eine chronische Besiedelung der Lunge mit *Aspergillus spp.* kann zu einer IgE vermittelten Sensibilisierung führen, die eine allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) (Agarwal et al. 2013; Liu et al. 2013) verursachen kann. Charakteristischerweise kommt es hier zu einem starken Anstieg des Gesamt-IgEs im Serum. Das Leitsymptom der ABPA ist bronchopulmonale Obstruktion, die einen Abfall der Lungenfunktion verursacht.

Im Gastrointestinaltrakt sind bei Patienten mit CF insbesondere Leber, Pankreas und der Darmtrakt (Borowitz & Gelfond 2013) von der Mukoviszidose betroffen. Je nach CFTR Mutation kommt es oft schon im Säuglingsalter zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz und zu einer graduellen Fibrosierung der Pankreas, die eine Malabsorption und im weiteren Verlauf der Krankheit auch ein Diabetes mellitus Typ III, den so genannten Cystic Fibrosis Related Diabetes (CFRD) (Ode & Moran 2013; Kelly & Moran 2013)

verursacht. In der Leber kommt es zum so genannten Cystic Fibrosis Related Liver Disease (CFLD) (Rowland & Bourke 2011), eine voranschreitende Fibrosierung der Leber bis hin zur Zirrhose. Im Gegensatz zur toxischen Leberzirrhose beginnt die Zirrhose bei CFLD eher mit einer inhomogenen, fleckförmigen Verteilung der Fibrose in der Leber. Die Folgen des CFLD sind jedoch im fortgeschrittenen Stadium mit den Folgen der toxischen Leberzirrhose vergleichbar. In vielen Fällen werden klinisch portale Hypertension mit Hypersplenismus und Ösophagusvarizen gesehen. Die Ausprägung des CFLD ist für den individuellen Patienten nach aktuellen Kenntnissen schwierig zu prognostizieren und therapeutisch auch kaum zu beeinflussen (Leeuwen et al. 2014). Die Beeinträchtigung des Darmes führt direkt als auch indirekt durch die exokrine Pankreasinsuffizienz zu einer Malabsorption. Säuglinge können von einem Mekoniumileus betroffen sein. Bei älteren Patienten kann ein so genanntes distales intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS) auftreten. Beim DIOS kommt es in der Regel im Ileum zu einer Obstruktion des Darmlumens durch zähe Fäzes im Sinne eines mechanischen Ileus.

Die chronischen pulmonalen Infektionen, die vermehrte Atemarbeit bei fortschreitender Lungendestruktion und die Malabsorption führen zu einem deutlich erhöhten Energiebedarf der Patienten mit CF. In vielen Fällen ist somit Untergewicht eine Folge der Erkrankung. Der Ernährungsstatus der Patienten korreliert positiv mit der Prognose (Corey et al. 1988).

Die zähen Sekrete verhindern bei der Mehrzahl der männlichen Patienten einen Transport der Spermien und führen somit trotz im Hoden vorhandener Spermien zu einer Infertilität. Bei weiblichen Patienten kann der Transport der Eizellen beeinträchtigt sein.

Die chronische Krankheit führt auch zu psychischen Problemen. Zum Beispiel kann es aufgrund der retardierten körperlichen Entwicklung bei sich in der Pubertät befindlichen Jugendlichen zu Störungen bei Wahrnehmung und Akzeptanz des eigenen Körpers kommen.

## **1.2. Epidemiologie der Mukoviszidose**

Mukoviszidose gehört zu den häufigsten autosomal-rezessiven Stoffwechselerkrankungen und liegt in Deutschland bei ca. 1:3000 Geburten vor (<http://muko.info/mukoviszidose/ueber-mukoviszidose/grundlagen/vererbung.html>, Stand 28.4.2014) bzw. (<http://www.cff.org/AboutCF/Testing/Genetics/>; Stand 28.4.2014). Die

Heterozygotenfrequenz, also die Frequenz von gesunden Überträgern, liegt in Deutschland bei ca. 1:25-30. In Deutschland leben aktuell ca. 8000 Patienten mit Mukoviszidose, jedes Jahr werden 200-300 Kinder mit CF geboren. In Nordeuropa und Großbritannien sowie Irland gibt es regional eine deutlich höhere Inzidenz von bis zu 1:500. Entsprechend der stattgefundenen Migration aus den genannten Gebieten findet man auch in den Vereinigten Staaten regional eine höhere Inzidenz als in Mitteleuropa. In den USA leben ca. 30.000 Patienten mit CF, weltweit werden ca. 70.000 Patienten geschätzt. CF ist am häufigsten bei Menschen mit nordeuropäischer und mitteleuropäischer Abstammung (<http://www.cff.org/AboutCF>), kommt allerdings bei Menschen jeglicher Herkunft vor.

### **1.3. Multimodale Behandlung der Mukoviszidose**

Die symptomatischen Behandlungsmöglichkeiten für die unter 1.1. beschriebenen Probleme der Patienten mit Mukoviszidose haben sich in den letzten Dekaden rasant entwickelt.

#### *Behandlung der Malabsorption*

Schon in der Mitte des letzten Jahrhunderts wurde damit begonnen, Pankreasenzyme oral zu substituieren. Auch heute noch stellt diese Substitution einen wesentlichen Pfeiler der Therapie dar. Die in der Regel von Schweinen gewonnenen Pankreasenzyme werden in Form von Kapseln oder Granulat verabreicht und individuell nach Bedarf und Fettmenge in der Mahlzeit angepasst. Die Malabsorption kann auf diesem Wege verringert, aber nicht verhindert werden. Entsprechend zählt die Substitution der fettlöslichen Vitamine A, D und E bei vielen Patienten zur Dauertherapie. Einige Patienten benötigen hochkalorische Zusatznahrung, um ihren Kalorienbedarf zu decken. In Einzelfällen wird diese auch per Magensonde oder PEG-Sonde verabreicht.

#### *Behandlung der beeinträchtigten mukoziliären Clearance*

Eine therapeutische Erhöhung der beeinträchtigten Atemwegsclearance wird ebenfalls schon seit den 1950er Jahren mittels Inhalationen von Kochsalz, zunächst in physiologischer Konzentration und später auch in hypertoner Konzentration (3%iger bzw. 6%iger Lösung) durchgeführt. Zusätzlich wurde Mannitol als Pulverinhalation für Patienten mit CF zugelassen, dieses Medikament steigert ebenfalls die mukoziliäre

Clearance. Kochsalz und Mannitol bewirken eine Senkung der Viskosität des Mukus durch ihre osmolare Wirkung. Da der hochviskose Mukus aufgrund der chronischen Infektion und Abwehrreaktion viel DNA enthält, wurde in den 1990er Jahren die DNase Alpha-Dornase (Wagener & Kupfer 2012) als inhalatives Medikament zur Steigerung der mukoziliären Clearance zugelassen.

### *Antiinfektive Therapie*

Einen weiteren wichtigen therapeutischen Pfeiler stellt die antibiotische Therapie von bakteriellen Infektionen dar. Mit dem Aufkommen von *staphylokokkenwirksamen* und später auch *antipseudomonalen* Antibiotika ging ein deutlicher Anstieg der Lebenserwartung von Patienten mit CF einher (Dodge et al. 2007). Die chronischen Infektionen mit vor allem *Staphylokokken* und *Pseudomonas aeruginosa* und die rekurrierenden Exazerbationen dieser Infektionen wurden nun mittels Antibiotika behandelbar. Weniger häufig bei pädiatrischen Patienten und zunehmend mit dem Verlauf der Erkrankung spielen auch andere gramnegative Stäbchen wie *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Burgholderia spp.* sowie *atypische Mykobakterien* (z.B. *Mykobakterium abszessus*) und Pilze (*Aspergillus spp.*, *Exophialia dermatidis* und *Scedosporia spp.*) eine Rolle. Eine dauerhafte Eradikation der Infektionen gelingt nur selten, dann meistens auch nur bei jungen Patienten. Der positive Effekt der antiinfektiven Therapie beruht hauptsächlich auf einer Kontrolle der Exazerbationen der meist chronischen Infektionen bezüglich Ausmaß und Häufigkeit. Im Wesentlichen finden für durch *Staphylokokken* bedingte Infektionen Aminopenicilline in Kombination mit Betalactamaseinhibitoren und Cephalosporine der zweiten Generation Anwendung. Diese werden sowohl oral als auch parenteral verabreicht. Zur Behandlung von Infektionen durch gramnegative Stäbchen, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, die in der Regel erst später im Verlauf der Erkrankung auftreten, kommen neben den Chinolonen als einzige oral verabreichbare Wirkstoffgruppe in erster Linie kombinierte, parenterale Antibiotikabehandlungen mit einem *pseudomonaswirksamen* Cephalosporin (Ceftazidim) oder Acylureidopenicillin (Piperacillin in Kombination mit Tazobactam) und einem Aminoglykosid (Tobramycin) zur Anwendung. Mit zunehmenden Antibiotikaresistenzen der *Pseudomonaden* (Llanes et al. 2013), die von Natur aus über viele Resistenzmechanismen verfügen, wird auch die Verwendung von weiteren

*antipseudomonalen* Antibiotika inklusive Reserveantibiotika notwendig. Eingesetzt werden unter anderem Meropenem, Cefepim, Colisitin, Fosfomycin und Tigecyclin.

Wie bereits erwähnt, ist es nur selten möglich, pulmonale Infektionen zu beenden. Für die Kontrolle der Infektionen bzw. deren Exazerbationen ist es dementsprechend notwendig, regelmäßige intravenöse Behandlungskurse durchzuführen. Diese Behandlungskurse laufen in der Regel über einen Zeitraum von 14 Tagen. Diese Praxis hat unter anderem zu einem wesentlichen Anstieg der Lebenserwartung geführt (Dodge et al. 2007). Parallel dazu ist die Exposition gegenüber parenteralen Antibiotika bei Patienten mit CF auf ein sehr hohes Niveau gestiegen. Eine weitere antibiotische Behandlungsoption bieten die inhalativen *antipseudomonalen* Antibiotika. Auf dem Weg der inhalativen Administration können enteral nicht resorbierbare Antibiotika direkt in die Lunge verabreicht werden. Als zugelassene Inhalationsmedikamente stehen Tobramycin, Colistin und Aztreonam zur Verfügung. Die inhalativen Antibiotika werden nach unterschiedlichen Schemata - dauerhaft oder intermittierend - zur Kontrolle der chronischen Infektionen eingesetzt (Heijerman et al. 2009). Die Entwicklung von Inhalationsgeräten mit perforierten Schwingmembranen hat die Inhalationsdauer pro Anwendung bereits auf wenige Minuten reduziert. Eine weitere Verkürzung der Anwendung wurde durch inhalative Antibiotika in Form einer Pulverinhalation erreicht, hierfür stehen derzeit Tobramycin und Colistin zur Verfügung (Máiz et al. 2013).

Für die Behandlung von Pilzinfektionen mit Fadenpilzen stehen als oral verabreichbare Medikamente die Azole Itraconazol und Voriconazol sowie als parenterale Medikamente die Echinokandine, z.B. Caspofungin und liposomales Amphotericin B, zur Verfügung. Voriconazol und liposomales Amphotericin B (zum Teil auch nicht-liposomales Amphotericin B) werden off-label auch als inhalative Antimykotika eingesetzt. Für Infektionen mit Sprosspilzen wird in erster Linie Fluconazol enteral und parenteral eingesetzt.

Die bereits beschriebene Hyperinflammation mit bronchialer Obstruktion kann mit Azithromycin per os, mit systemischen Corticosteroiden und mit inhalativen Corticosteroiden sowie inhalativen Bronchodilatoren wie z.B. Salbutamol behandelt werden. Die Therapie der APBA erfolgt mit hochdosierten Corticosteroiden und Itraconazol per os, in Einzelfällen werden auch off-label als Heilungsversuch anti-IgE Antikörper eingesetzt.

### *Weitere Behandlungsformen*

Regelmäßige Physiotherapie mit Anwendung von Atemtechniken zur Steigerung der Mukusclearance und Übungen zur Stärkung der Muskulatur gehören ebenfalls zur modernen CF Therapie. Auch eine regelmäßige psychologische Betreuung ist zur Behandlung der aus der Krankheit resultierenden psychischen Störungen indiziert. Sinnvoll ist eine psychologische Betreuung auch zur Sicherung der Therapieadhärenz. Darüber hinaus wird Ernährungs- und ggf. Diabetesberatung durchgeführt. Eine konsequente Behandlung des CFRD ist auch hinsichtlich der pulmonalen Prognose notwendig (Moran et al. 2009).

### *Behandlung der klinischen Komplikationen Hämoptysen und DIOS*

Die Behandlung eines DIOS sollte primär konservativ erfolgen und besteht aus der enteralen Gabe von großen Mengen Macrogol-Elektrolytlösung, der Durchführung von hohen Schwenkeinläufen sowie medikamentöser Stimulation des antegraden Nahrungstransportes mit Metoclopramid und Pyridostigmin.

Als therapeutische Prinzipien für die Behandlung akuter Hämoptysen kommt der Fibrinolysehemmer Tranexamsäure oral, parenteral oder inhalativ und Adrenalin als Vasokonstriktor inhalativ verabreicht zur Anwendung. Als Ultima ratio kann bei therapierefraktären oder vital bedrohlichen Hämoptysen die interventionelle selektive Embolisation von Bronchialarterienästen durchgeführt werden.

### *Neuere Entwicklungen in den Behandlungsmöglichkeiten*

In den letzten Jahren wurde mit Ivacaftor das erste Medikament, das eine krankheitsmodifizierende Wirkung hat, zugelassen. Ivacaftor erhöht als Potentiator spezifisch bei Patienten mit der G551D Mutation die CFTR Funktion (Ramsey et al. 2011). Weitere Medikamente, die mutationsspezifisch die mangelnde CFTR Funktion steigern können, befinden sich in der klinischen Erprobung. Da die G551D Mutation insgesamt selten ist, liegen momentan große Erwartungen auf der Entwicklung bzw. der klinischen Erprobung von Potentioren bzw. Korrektoren, die bei Vorliegen der  $\Delta F508$  Mutation eine Verbesserung der CFTR Funktion bewirken könnten (Van Goor et al. 2011; Rowe & Verkman 2013). Das größte Potenzial wird in der Behandlung von jungen Patienten mit CF gesehen, da sich auf diesem Weg eventuell die Entstehung der Lungenschäden deutlich verlangsamen oder gar verhindern lassen könnte. Von der

Anwendung bei Kleinkindern und Säuglingen ist man für diese neuen Medikamente derzeit noch weit entfernt.

### *Lungentransplantation*

Als Ultima Ratio steht für Patienten mit CF auch eine Doppellungentransplantation zur Verfügung. Diese Option kommt aufgrund des knappen Organangebotes und der jeweiligen Infektsituation allerdings nicht immer in Frage. Auch nach einer erfolgreich durchgeführten Doppellungentransplantation (DLTX) ist die CF nicht geheilt, da die oberen Atemwege sowie Leber und Darm nach wie vor an CF erkrankt sind. Auch der Erhalt der Transplantatlungenfunktion ist mit diversen klinischen Problemen behaftet, da es einerseits zu akuten Abstoßungsreaktionen kommen kann und andererseits die Immunsuppression pulmonale Infektionen mit Viren, wie zum Beispiel Ebstein-Barr-Virus und Cytomegalie-Virus sowie mit Pilzen begünstigt. In vielen Fällen kommt es klinisch zu einem Mischbild; die infektiös getriggerte Inflammation kann zu einer akuten Abstoßungsreaktion führen. Beide Mechanismen können zu einem reversiblen und gegebenenfalls auch zu einem irreversiblen Verlust von Lungenfunktion (Diso et al. 2013) führen. Die Prognose nach DLTX ist insbesondere für pädiatrische Patienten noch nicht zufriedenstellend (Liou et al. 2007).

## **1.4. Probleme und Folgen der Behandlung von Mukoviszidose**

Die oben beschriebenen Behandlungen für Patienten mit CF haben die Lebenserwartung von nur wenigen Jahren in der Mitte des letzten Jahrhunderts ansteigen lassen (Dodge et al. 2007). Heutzutage wird eine Lebenserwartung prognostiziert, die bis ins Rentenalter reichen kann (Rosenthal 2014). Im Folgenden werden drei häufige Probleme, die aus der hohen Therapielast von Patienten mit Mukoviszidose resultieren, diskutiert: Hohe Exposition mit Antibiotika, hohe Exposition mit Glucocorticoiden sowie psychische Probleme.

Die hohe Exposition mit Antibiotika kann die Selektion von Bakterien mit ausgeprägter Virulenz und ausgeprägten Resistenzmechanismen zur Folge haben sowie Infektionen mit pathogenen Pilzen begünstigen (Waters 2012). Bei Patienten mit CF und einer hohen Exposition mit Antibiotika werden regelmäßig Überempfindlichkeitsreaktionen im Zusammenhang mit den Antibiotikabehandlungen beobachtet (Koch et al. 1991; Wills et al. 1998; Pleasants et al. 1994; Burrows et al. 2007). Häufig erleiden die Patienten

Überempfindlichkeiten gegenüber mehreren verschiedenen *pseudomonaswirksamen* Antibiotika. Diese werden dann im klinischen Alltag regelmäßig als Allergien gewertet und können zu wesentlichen Einschränkungen in der antiinfektiven Therapie bis hin zu inkonsistenter Therapie der Patienten führen.

Mitunter werden langfristige und hochdosierte antiinflammatorische Therapien mit Glucocorticoiden notwendig. Dies kann beispielsweise bei Vorliegen einer ABPA oder ausgeprägter Hyperinflammation mit bronchialer Obstruktion während und nach pulmonalen Exazerbationen der Fall sein. Komplikationen von Glucocorticoidtherapien können eine sekundäre Nebenniereninsuffizienz (Charmandari et al. 2014) und eine Verschlechterung der Glucosetoleranz nach sich ziehen (van Raalte & Diamant 2014). Die therapeutische Immunsuppression der Glucocorticoide kann auch Pilzinfektionen begünstigen. Generell besteht für Patienten mit CF von klein auf eine sehr hohe Therapielast (Sawicki et al. 2009). Die in den CF-Ambulanzen koordinierten Therapien erfordern von den betroffenen Patienten Tag für Tag ein hohes Maß an Disziplin und an aufgewendeter Zeit. Dieser enge Rahmen kann zu einer Einschränkung der Lebensqualität führen. In der Vergangenheit wurden z.B. Essstörungen bei Patienten mit CF beobachtet, die durch zu viel Druck bei der Ernährung auf die Patienten ausgelöst wurden.

## **1.5. Diagnostik von Medikamentenunverträglichkeiten**

Für die Diagnostik von Medikamentenallergien stehen grundsätzlich die Anamnese, in-vivo Verfahren und In-vitro-Tests zur Verfügung. An In-vivo-Testverfahren werden derzeit Pricktests, intradermale Tests, Patchtests und Provokationstests (Nase, Haut, Bronchien und systemische orale oder parenterale Gabe) durchgeführt (Romano et al. 2004; Blanca et al. 2009; Mayorga et al. 2010; Renz et al. 2010). An In-vitro-Testverfahren stehen derzeit unter anderem spezifische IgE (RAST) Tests, allerdings nicht für *antipseudomonale* Antibiotika, zur Verfügung. Zelluläre Testverfahren haben für die Diagnostik von Medikamentenallergien den Vorteil, für alle Antibiotika anwendbar zu sein.

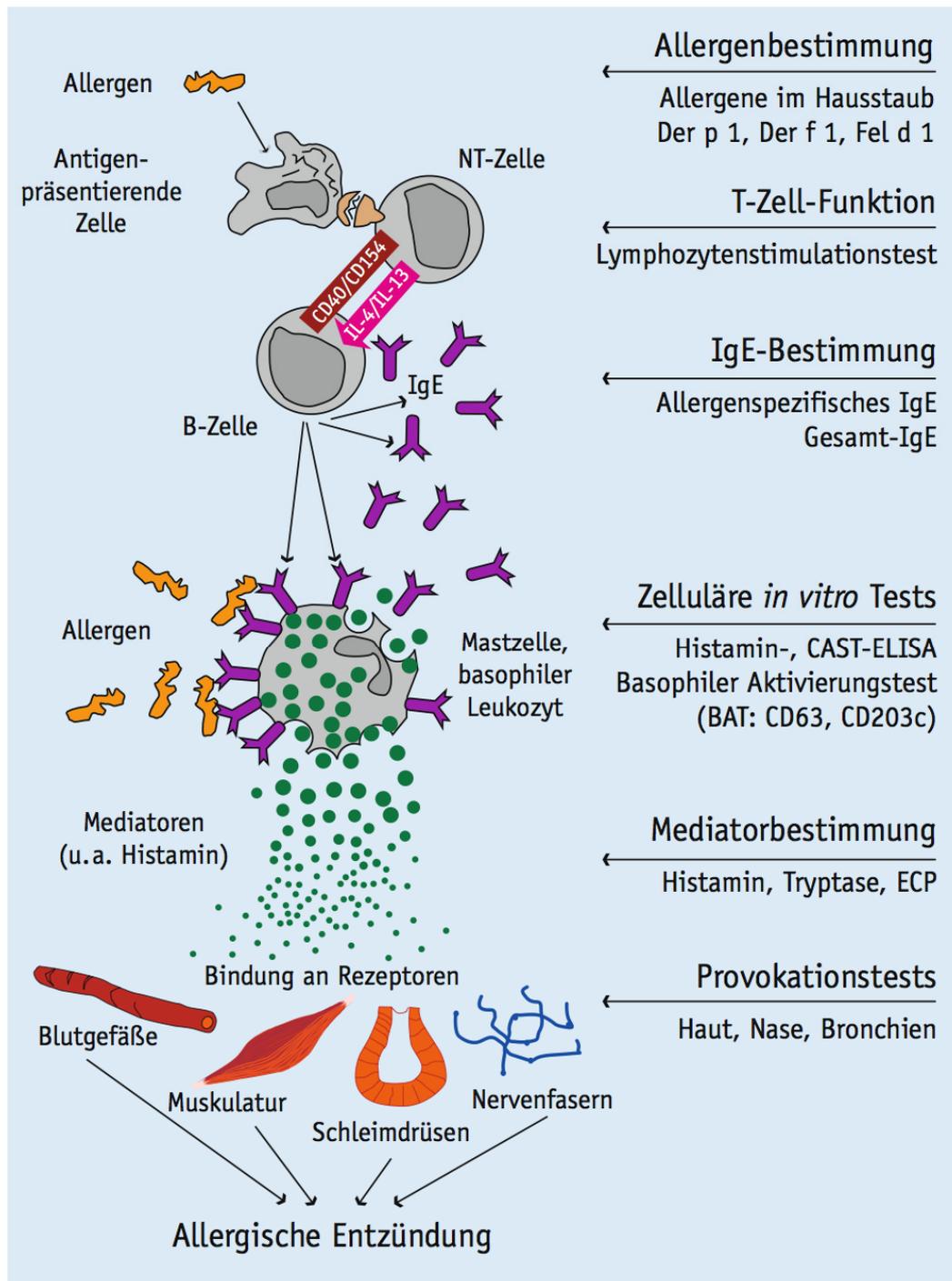
Es werden unter anderem folgende drei zelluläre Testverfahren durchgeführt:

- 1) Basophilenaktivierungstests (BAT) basierend auf der flusscytometrischen Messung von CD 63 und CD 203c Expression nach Exposition mit Allergen.
- 2) Lymphozytentransformationstests (LTT) basierend auf Messung der Proliferation von spezifischen Lymphozyten nach Exposition mit Allergen.
- 3) Lymphozytenaktivierungstests (LAT) basierend auf der flusscytometrischen Messung von CD 69 als Aktivierungsmarker (Beeler et al. 2008) auf spezifischen Lymphozyten nach Exposition mit Allergen.

Die LTT und LAT sind Tests auf spezifische Lymphozyten. Die Ergebnisse bilden somit Allergiemechanismen vom Zell-vermittelten Typ ab. Die Ergebnisse des BAT bilden die Allergiemechanismen vom IgE-vermittelten Soforttyp ab. In Abbildung 1 werden die relevanten derzeit verfügbaren Allergietestverfahren grafisch dargestellt (Renz et al. 2010).

Für zelluläre Allergietests wurde eine bessere Sensitivität und Spezifität als für andere Verfahren ermittelt (Nyfeler & Pichler 1997; Sanz et al. 2009; Sanz et al. 2005). Darüber hinaus wurden mehrere Arbeiten (Pichler & Tilch 2004; Luque et al. 2001; Aranda et al. 2011) publiziert, die das diagnostische Potential von zellulären Allergietests für die Diagnostik von Arzneimittelüberempfindlichkeiten beschreiben. Zelluläre Allergietests können prinzipiell mit jedem Medikament, also auch mit allen in Frage kommenden *antipseudomonalen* Antibiotika, durchgeführt werden.

Als Vorteile der zellulären Testverfahren sind damit zusammenfassend deren Verfügbarkeit für die Tests der *antipseudomonalen* Antibiotika und der In-vitro-Ansatz, der eine Gefährdung des Patienten ausschließt, zu nennen.



**Abbildung 1: Zusammenfassung von allergologischen Diagnoseverfahren (Renz et al. 2010)**

„Modell der IgE-vermittelten Sensibilisierung und Effektorphase. Die Pfeile (rechte Bildhälfte) markieren den Angriffspunkt verschiedener diagnostischer Prinzipien und allergologischer Tests“ (Renz et al. 2010).

## 2. Fragestellung und Motivation

Aufgrund von chronischen pulmonalen Infektionen sind Patienten mit Mukoviszidose einer sehr hohen Exposition gegenüber intravenösen Antibiotika ausgesetzt. Die am häufigsten verabreichten Antibiotika sind Penicilline, Cephalosporine und Aminoglykoside. Klinische Beobachtungen und Kohortenstudien (Wills et al. 1998; Burrows et al. 2007; Pleasants et al. 1994; Koch et al. 1991) haben gezeigt, dass Überempfindlichkeitsreaktionen auf parenteral verabreichte Antibiotika (Hypersensitivity Reactions to Parenteral administered Antibiotics = HRPAs) ein substanzielles Problem im therapeutischen Management für Patienten mit Mukoviszidose darstellen. Dies gilt insbesondere für Patienten mit bereits fortgeschrittener Lungenerkrankung. Ärzte, die Patienten mit Mukoviszidose behandeln, sind im klinischen Alltag regelmäßig mit HRPAs konfrontiert (Burrows et al. 2007; Legere et al. 2009). Die bisher am häufigsten dokumentierten Symptome von HRPAs sind Juckreiz und dermale Symptome wie z.B. Exantheme (Wills et al. 1998; Burrows et al. 2007; Pleasants et al. 1994; Koch et al. 1991). Da die zugrundeliegenden Mechanismen für HRPAs oft unklar bleiben, werden antibiotische Behandlungen aufgrund von HRPAs häufig beendet, was teilweise zu inkonsistenter Behandlung führt. Aufgrund eines substanziellen Anstiegs der Lebenserwartung von Patienten mit Mukoviszidose in den letzten Jahrzehnten (Parkins et al. 2011) und dementsprechend längeren Behandlungszeiten mit parenteralen Antibiotika reflektieren viele der bisher veröffentlichten Arbeiten zum Thema HRPAs die heutigen Patienten und Behandlungsregime nicht ausreichend. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Schließen dieser Lücke darstellen. Dazu wurde eine Beobachtungsstudie am Christiane-Herzog-Zentrum der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Anhand der in der Beobachtungsstudie gewonnenen Daten wurden die Epidemiologie, Charakteristika und die Risikofaktoren von HRPAs untersucht sowie nach Hinweisen für Konzepte zur Prävention von HRPAs gesucht. Die Methoden zur Auswertung sowie die Ergebnisse dieser Beobachtungsstudie werden in der vorliegenden Arbeit dargestellt.

Für den klinischen Umgang mit dem Phänomen „multiple Antibiotikaunverträglichkeiten“ wurden bereits Protokolle zur schnellen Hyposensibilisierung entwickelt (Legere et al. 2009; Whitaker et al. 2011). Diese Hyposensibilisierungsprotokolle führen jedoch nicht bei jedem Patienten zum gewünschten Erfolg und können zu erneuten Reaktionen führen.

Zusätzlich stellen diese ein Risiko für Patienten mit vorangegangenen HRPAs dar, weil die Patienten, wenn auch unter medikamentösem Schutz, direkt den Medikamenten exponiert werden, die zuvor HRPAs verursacht hatten.

Die diagnostischen Möglichkeiten für Medikamentenunverträglichkeiten, insbesondere gegenüber *antipseudomonalen* Antibiotika, sind bislang im klinischen Alltag noch nicht ausreichend. Die angewendeten Hauttests mit *antipseudomonalen* Antibiotika bleiben in der Regel negativ. Der negative prädiktive Wert von Hauttests für die spezifische Frage nach Überempfindlichkeit gegen parenterale *antipseudomonale* Antibiotika ist niedrig. Viele der betroffenen Patienten erleiden auch HRPAs gegen mehrere verschiedene parenterale Antibiotika. Dementsprechend gibt es die dringende Notwendigkeit, anhand eines diagnostischen Verfahrens beurteilen zu können, ob eine Wiederholungsgefahr bei erneuter Exposition mit dem HRPAs auslösenden Antibiotikum im Sinne einer spezifischen Allergie besteht. Darüber hinaus wäre eine individuelle immunologische Klassifizierung, die zur Risikostratifizierung und zum klinischen Management der HRPAs bei Patienten mit CF herangezogen werden könnte, wünschenswert.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Pilotstudie durchgeführt. Die Pilotstudie verfolgte mehrere Ziele: Zum einen sollte die klinische Relevanz der Kombination der zellulären In-vitro-Testverfahren Basophilenaktivierungstests (BAT) und Lymphozytentransformationstests (LTT) für die Diagnostik, die Klassifikation und das klinische Management von Überempfindlichkeitsreaktionen gegen parenterale Antibiotika bei Patienten mit CF untersucht werden. Es sollten gegebenenfalls neue Erkenntnisse über die immunologischen Mechanismen dieser Überempfindlichkeitsreaktionen gewonnen werden. Zusätzlich sollten diese Methoden speziell für die Untersuchung von Medikamentenunverträglichkeiten in unserem Labor etabliert werden. Folgende Hypothese sollte getestet werden: Zelluläre In-vitro-Testverfahren wie BAT und LTT in Kombination sind sensitive und spezifische diagnostische Verfahren für die Klassifizierung und für das klinische Management von Überempfindlichkeitsreaktionen gegen parenterale Antibiotika bei Patienten mit CF.

Dementsprechend wurde im Allergielabor der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin eine experimentelle Pilotstudie zur Diagnostik von Medikamentenunverträglichkeiten bzw. Allergien mit den beiden zellulären Allergietestverfahren BAT und LTT durchgeführt.

Die in der Beobachtungsstudie gewonnenen Informationen zu Patienten mit HRPDA fanden in der sich anschließenden Pilotstudie weitere Verwendung. Die Methodik und die Ergebnisse dieser Pilotstudie werden ebenfalls in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit einerseits mittels einer Beobachtungsstudie Fragen zu Prävalenz, Risikofaktoren und Charakteristika von HRPDA sowie den Präventionsmöglichkeiten untersucht. Hauptfragestellung war dabei die Prävalenz und die Analyse der Risikofaktoren von HRPDA. Darüberhinaus wurde in einer Nebenfragestellung die Art der Reaktion, der Zeitpunkt der Reaktion sowie der immunologische Mechanismus untersucht. In einer Pilotstudie wurden außerdem Untersuchungen zur Wertigkeit der zellulären Allergietestverfahren BAT und LTT für Patienten mit CF und HRPDA durchgeführt.

## **3. Methodik**

### **3.1. Beobachtungsstudie**

#### **3.1.1. Durchführung am Christiane-Herzog-Zentrum**

Das Christiane-Herzog-Zentrum ist ein in die Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin integriertes Zentrum zur Behandlung von pädiatrischen und erwachsenen Patienten, die an Mukoviszidose leiden. Die Behandlungsmöglichkeiten bestehen aus ambulanter und stationärer Versorgung durch auf Mukoviszidose spezialisierte Kinderpneumologen und Pneumologen. Die multimodalen Behandlungsmöglichkeiten umfassen neben der ärztlichen Behandlung auch hochspezialisierte Physio- und Atemtherapie, Psychotherapie und Ernährungs- sowie Diabetesberatung. Es bestehen enge Kooperationen zum deutschen Herzzentrum Berlin im Rahmen des Lungentransplantationsprogrammes, mit diversen Kliniken der Charité – Universitätsmedizin Berlin, wie z.B. der Transplantationschirurgie (Lebertransplantationsprogramm), der Gastroenterologie und den weiteren Kinderkliniken. Ein besonderes Qualitätsmerkmal liegt in der sowohl räumlich als auch personell sehr engen Verzahnung der ambulanten und stationären Patientenversorgung. Die vereinfachte Kontaktaufnahme zu den Patienten sowohl ambulant als auch stationär wirkte sich auch positiv auf das Rekrutieren von Patienten für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Studien aus.

#### **3.1.2. Studienpopulation der Beobachtungsstudie**

Zum Zeitpunkt der Beobachtungsstudie wurden am Christiane-Herzog-Zentrum ca. 285 Patienten mit CF ambulant bzw. stationär behandelt. Davon waren 185 Patienten über 18 Jahre alt, 100 Patienten waren Kinder und Jugendliche. In die Beobachtungsstudie eingeschlossen wurden nur solche Patienten, die mindestens vier intravenöse antibiotische Behandlungskurse absolviert hatten. Von den 285 Patienten erfüllten 125 Kinder und Erwachsene das Einschlusskriterium. Von diesen 125 Patienten willigten 100 Patienten bzw. deren Sorgeberechtigte in die Teilnahme an der Studie ein. Die Beobachtungen wurden auf parenteral verabreichte Antibiotika beschränkt, da dieser Verabreichungsweg mit Abstand am häufigsten mit HRP A einhergeht (Wills et al. 1998). Im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen (Burrows et al. 2007; Pleasants et al. 1994; Koch et al.

1991), die ihre Beobachtung auf  $\beta$ -Lactam beschränkten, wurden in der vorliegenden Beobachtungsstudie auch andere Klassen von intravenösen Antibiotika mit einbezogen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin genehmigt.

### 3.1.3. Ausgestaltung der Studie

#### *Fragebogen und Patientenakte*

Die in der Beobachtungsstudie gesammelten Informationen wurden anhand von Fragebögen und der Auswertung der Patientenakten generiert. In einem ersten Schritt wurden die Patienten - nachdem sie schriftlich ihre Zustimmung erteilt hatten - mit einem halboffenen strukturierten Fragebogen interviewt (siehe Fragebogen im Anhang). Damit konnten Informationen zu folgenden Aspekten gewonnen werden:

- bisherige Behandlungszentren für Mukoviszidose
- aktuelle Lungenfunktionswerte (FEV1)
- Genotyp der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Mutation
- Alter bei Erstdiagnose von CF
- allgemeine Anamnese von Allergien und atopischer Diathese
- Historie der bisherigen intravenösen Antibiotikabehandlung
- bisherige Überempfindlichkeitsreaktion auf parenterale Antibiotika
- Behandlung der möglichen Überempfindlichkeitsreaktion

Diese Angaben wurden durch Daten aus den Patientenakten ergänzt:

- Alter
- Geschlecht
- aktuelle FEV1
- $\Delta$ F508 Genotyp
- Allergianamnese, inklusive
  - aktueller Resultate von Standard IgE-Screeningtests für Aeroallergene
  - aktueller Resultate von spezifischem IgE gegen Aspergillus
  - aktueller Resultate des Gesamt-IgEs im Serum
  - Historie von allergischer bronchopulmonaler Aspergillose (ABPA)

- Anzahl der Jahre mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa* (PA)-Besiedlung (Eine PA-Besiedlung wurde dann als chronisch definiert, wenn sie mindestens zweimal pro Jahr im Sputum nachgewiesen wurde)
- bisherige parenterale Antibiotikabehandlungen
- bisherige Überempfindlichkeitsreaktionen auf parenterale Antibiotika

### *Einteilung der Patienten in Gruppen*

Um den unterschiedlichen Umfang der Dokumentation in den Patientenakten zu berücksichtigen, wurden die Patienten für die statistische Auswertung in drei Gruppen unterteilt. Die gesamte Kohorte von 100 Patienten wurde im Weiteren als Gruppe **“gesamt”** bezeichnet. Die Gruppe **“gesamt”** bestand damit aus allen Patienten, die zum Zeitpunkt der Beobachtungsstudie am Christiane-Herzog-Zentrum unter Behandlung waren, das Einschlusskriterium erfüllten, in die Teilnahme an der Studie eingewilligt und an der Befragung teilgenommen hatten.

Von diesen 100 Patienten wurden diejenigen Patienten selektiert, für die mindestens über fünf Jahre eine ausführliche und kontinuierliche Dokumentation über Behandlung und HRP in unserem Zentrum vorlagen. Die Gruppe wurde im Weiteren als Gruppe **“5-Jahre-Dok”** bezeichnet. Die Gruppe **“5-Jahre-Dok”** umfasste 66 Patienten.

Von diesen 66 Patienten wiederum wurden diejenigen in die dritte Gruppe sortiert, für die eine ausführliche und kontinuierliche Dokumentation für das gesamte Leben vorlag, sofern die Dokumentation am Christiane-Herzog-Zentrum durchgeführt wurde. Diese Gruppe umfasste 50 Patienten und wurde im Weiteren als Gruppe **“Lebenslang”** bezeichnet.

Für die Gruppen **“5-Jahre-Dok”** und **“Lebenslang”** wurde jede parenterale Antibiotikabehandlung erfasst. Hierbei wurde dokumentiert, welches Antibiotikum verabreicht wurde, die Länge des Behandlungskurses, die tägliche Dosis des Antibiotikums und die Verwendung von vorbeugenden Maßnahmen, wie die vorherige Gabe von Antihistaminika oder Corticosteroiden oder Schnelldesensibilisierung (Legere et al. 2009; Whitaker et al. 2011).

### *Definition und Dokumentation von HRPAs*

In der Beobachtungsstudie wurde eine Überempfindlichkeit gegenüber parenteral verabreichten Antibiotika (HRPA) definiert als jegliche Form der Überempfindlichkeitsreaktion, die während eines intravenösen antibiotischen Behandlungskurses auftrat und eine konsekutive medizinische Intervention, wie die Beendigung oder Veränderung der antibiotischen Behandlung oder die Verabreichung von Antihistaminika oder Corticosteroiden, nach sich zog. Des Weiteren wurde gefordert, dass sich im zeitlichen Zusammenhang mit der HRPAs die sonstige medikamentöse Behandlung der Mukoviszidose nicht wesentlich verändert hatte. Als das Risiko für das Auftreten einer Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber einem Antibiotikum wurde der Anteil der aufgezeichneten antibiotischen Behandlungskurse eines gegebenen Medikamentes mit HRPAs an allen aufgezeichneten Behandlungskursen mit dem gegebenen Medikament bezeichnet.

Eine Vorselektion im Sinne von Allergiesymptomen wurde nicht durchgeführt, es wurden vielmehr alle Symptome erfasst. Um ein Antibiotikum bei Mehrfachbehandlung für eine Reaktion verantwortlich zu machen, wurde einerseits das Auftreten der Reaktion im zeitlichen Zusammenhang zur Infusion und andererseits das Vertragen der anderen Antibiotika nach der Beendigung der beschuldigten herangezogen (in 69% der Fälle war Tobramycin eines der beiden Antibiotika). Wenn sich im Rahmen von mehrfach-antibiotischer Behandlung die aufgetretenen Reaktionen nicht eindeutig einem Antibiotikum zuordnen ließen, wurde diese Reaktion von den Beobachtungen ausgeschlossen.

Zu Hause durchgeführte parenterale antibiotische Behandlungskurse wurden nur dann dokumentiert, wenn eine ausführliche Beschreibung der Behandlung und der gegebenenfalls auftretenden HRPAs zur Verfügung stand. Reaktionen, die das bronchopulmonale (z.B. akuter Bronchospasmus) oder das kardiovaskuläre (z.B. arterielle Hypotension) System betrafen, wurden als schwere Reaktionen bezeichnet. Diejenigen Reaktionen, die die World Allergy Organization (WAO)-Kriterien für Anaphylaxie erfüllten (Simons et al. 2011) wurden als anaphylaktisch bezeichnet. Unter Berücksichtigung des zeitlichen Auftretens wurden die Reaktionen in Anlehnung an das "European Network of Drug Allergy" (Romano et al. 2004) folgendermaßen klassifiziert: Reaktionen, die sofort oder innerhalb einer Stunde nach Medikamentengabe auftraten wurden als "Sofortreaktion" (immediate) bezeichnet, alle anderen als "Nicht-Sofort-

Reaktion“ (non-immediate). Angelehnt an Hjortlund (Hjortlund et al. 2012; Hjortlund et al. 2013) wurden Reaktionen, die innerhalb einer Stunde nach Medikamentengabe erfolgten, immer als Sofortreaktionen klassifiziert, unabhängig davon an welchem Tag des Behandlungskurses diese Reaktion auftrat.

### *Datengrundlage*

Die Datengrundlage war dreigeteilt: Es lagen Informationen zu Stammdaten der Patienten, Informationen zu den Behandlungskursen und Informationen zu den Reaktionen vor:

#### **Stammdaten der Patienten:**

- Geschlecht
- Alter
- Bisherige Behandlungszentren
- Alter bei Erstdiagnose
- CFTR Genotyp
- letzte FEV1
- Für die Patienten, für die keine detaillierte Dokumentation in unserem Zentrum vorlag, wurde erfragt, seit wann intravenöse (iv) Antibiotika gegeben wurden.
- Aktuelle Keimbesiedelung inklusive Beginn der chronischen Besiedelung für *Pseudomonas aeruginosa*, *Burgholderia spc.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Staphylokokkus aureus*, Methicillin resistente *Staphylokokkus aureus (MRSA)*, *Hämophilus influenzae* und atypische Mykobakterien.
- Atopiemarker in Form des Ergebnisses des letzten SX1, des Tests nach spezifischen IgE für Aspergillus, Vorliegen (aktuell oder anamnestisch) einer ABPA und letzter Wert des Gesamt IgE (kU/l) im Serum.
- Diese Stammdaten wurden anhand einer persönlichen Identifikationsnummer anonymisiert.

#### **Behandlungskurse**

Im Rahmen der Datenerhebung wurden die Stammdaten der Patienten um die Daten der Behandlungskurse und der Reaktionen ergänzt. Die Antibiotikabehandlungskurse wurden in einer Datenbank jeweils mittels der Identifikationsnummer sowie mittels des

Startdatums und des verwendeten Antibiotikums eindeutig identifiziert und als separater Eintrag erfasst. Die Reaktionen waren den Behandlungskursen über die persönliche Identifikationsnummer, über das Datum des Kursbeginns sowie über das Medikament zuordenbar.

Pro Kurs und Medikament lagen vor:

- Persönliche Identifikationsnummer
- Datum Kursbeginn
- Medikament
- Tagesdosis
- Dauer des Kurses in Tagen
- Kombinationstherapie (ja/nein)
- Reaktion (ja/nein)
- Medikamentenschutz (Antihistaminika oder Corticoide) und
- Durchführung als „Rush Hyposensibilisierung“ (ja/nein).

### **Reaktionen**

Pro Reaktion lagen vor:

- persönliche Identifikationsnummer
- Datum des Kursbeginns
- Medikament
- Tag des Kurses bei Auftreten der HRPA
- Zeitlicher Bezug zur Infusion der HRPA (sofort, weniger als eine Stunde, mehr als eine Stunde)
- Lebensbedrohlich (ja/nein)
- Behandlung der Reaktion bzw. Fortsetzen mit antiallergischer Medikation oder Ändern oder Absetzen der antibiotischen Therapie
- Symptome (bis zu fünf verschiedene) eindeutig gekennzeichnet und jeweils als separater Eintrag erfasst.

### 3.1.4. Statistische Analyse

Die deskriptive Statistik der drei ineinander geschachtelten Patientenpopulationen basierte auf dem Ausmaß der Daten, die für die jeweilige Gruppe zur Verfügung standen. Für kontinuierlich verteilte Variablen wurde der Student's t-Test und für dichotome Variablen Chi-Quadrattests durchgeführt und die dazugehörigen 95%-Konfidenzintervalle und p-Werte berechnet.

Zur Identifikation von Risikofaktoren wurden univariate Analysen durchgeführt. Um den Einfluss von multiplen Risikofaktoren auf das Auftreten von HRPAs zu analysieren, wurde ein logistisches Regressionsmodell in der Gruppe "Lebenslang" entwickelt. Anhand einer logistischen Regression kann die Abhängigkeit der Verteilung einer dichotomen Variable E (Ereignis ist eingetreten vs. Ereignis ist nicht eingetreten) von simultanen Einflussgrößen modelliert und erklärt werden. Als Einflussgrößen (unabhängige Variablen) werden Größen aufgenommen, von denen man einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit  $P(E)$  des Ereignisses E vermutet. In einer logistischen Regression ist die link-Funktion, die die Wahrscheinlichkeit  $P(E)$  mit den unabhängigen Variablen verknüpft, die log odds Funktion (genannt logit) (Hosmer et al. 2005):

$$\log [P(E)/(1-P(E))] = \text{const.} + \text{Linearkombination der unabhängigen Variablen.}$$

Die Koeffizienten der Linearkombination werden gemäß dem Maximum-Likelihood-Prinzip geschätzt.

Im vorliegenden logistischen Regressionsmodell wurde HRPAs als (abhängige) dichotome Variable verwendet (stellte also das Ereignis E dar) und Alter, Geschlecht, Anzahl der Jahre seit Beginn der parenteralen Antibiotikatherapie, FEV1 und Jahre der PA-Besiedlung als unabhängige Variable. Anhand eines zweiten logistischen Regressionsmodells wurden diese Risikofaktoren nur für schwere Reaktionen analysiert.

Für die Gruppe "Lebenslang" wurde die spezifische kumulative Antibiotikaexposition in Gramm pro Jahr und die spezifische Lebenszeitdosis der beiden Antibiotika, die am häufigsten zu HRPAs führen, analysiert. Hierzu wurden pro Medikament die kumulative Antibiotikaexposition sowie die Lebenszeitdosis der Subgruppen von Patienten mit und ohne HRPAs miteinander verglichen. Aufgrund offensichtlicher Abweichungen von der Normalverteilung wurde vorliegend eine nicht-parametrische Schätzung der Abweichungen mit dazugehörigen Konfidenzintervallen vorgezogen. Dies konnte umgesetzt werden, indem eine Methode von (Hollander & Wolfe 1999) angewendet

wurde: Alle Abweichungen  $\{x_i - y_j \mid i=1, \dots, m; j=1, \dots, n\}$  der Beobachtungen in Gruppe X und Gruppe Y werden sortiert und verwendet als shifts  $\delta$  in Paaren von Null- und Alternativhypothesen  $H_0(\delta): X \leq Y - \delta$  versus  $H_1(\delta): X > Y - \delta$  unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests (WMW) zur Berechnung von p-Werten. Der sogenannte Hodges-Lehmann Schätzer für die Abweichung ist der shift  $\delta_M$ , für den der WMW Test einen p-Wert von 0,05 für die Nullhypothese  $H_0(\delta_M): X \leq Y - \delta_M$  berechnet. Die Untergrenze  $\delta_l$  und die Obergrenze  $\delta_u$  des 95% Konfidenzintervall werden berechnet (unter Verwendung des WMW Test) als shifts, die in p-Werten 0,025 bzw. 0,975 resultieren.

Für alle Berechnungen wurde die Statistiksoftware R verwendet (The R Project for Statistical Computing, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Für die Graphiken wurde das R-Paket “ggplot2” verwendet (Wickham 2009).

## **3.2. Pilotstudie**

### **3.2.1. Überblick**

In der Pilotstudie wurden die zellulären Allergietestverfahren Basophilenaktivierungstests (BAT) und Lymphozytentransformationstests (LTT) für die Diagnostik von Überempfindlichkeiten gegenüber parenteralen Antibiotika angewendet. Hierfür wurden Patienten, die bereits an der Beobachtungsstudie teilgenommen hatten, rekrutiert. Für die aufgrund von finanziellen Einschränkungen zunächst auf dreizehn Patienten und zwei Probanden limitierte Studie wurden Patienten ausgewählt, die HRP A hatten und daraus folgend klinisch für ein oder mehrere Antibiotika als allergisch eingestuft wurden und welche die jeweiligen Antibiotika seit der letzten Reaktion auch nicht mehr erhalten hatten.

Für die Durchführung der zellulären Allergietests wurden den Patienten im Rahmen der Routinediagnostik Blutproben in der Regel zu Beginn oder auch während der stationären Behandlung einer pulmonalen Exazerbation abgenommen und anschließend vom Studienarzt (Doktoranden) persönlich in das Allergielabor der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin gebracht. Unmittelbar nach Erhalt der Blutproben wurde mit den zellulären Allergietests begonnen. Nach einer Aufbereitung der Proben erfolgte die Inkubation der lebenden Zellen mit den jeweils zu untersuchenden Antibiotika in Verdünnungsreihen. Die Verdünnungen wurden jeweils von maximal der  $10^{-4}$ -fachen Konzentration der empfohlenen maximalen Wirkstoffkonzentration im Serum bis zur maximal empfohlenen

Wirkstoffkonzentration angelegt (siehe Tabelle 1: Verdünnungsreihen der Medikamente), höhere Konzentrationen wurden ebenfalls geprüft, führten jedoch in keinem Fall zu einer höheren Proliferation. Für den BAT wurden nach Aktivierung der basophilen Granulozyten im Flowcytometer mittels gefärbter Antikörper Oberflächenmarker quantitativ und qualitativ bestimmt. Der LTT beruht auf einer quantitativen Beurteilung der Proliferation von Lymphozyten nach Stimulation mittels Messung der Inkorporation von radioaktivem  $H^3$ -Thymidin.

Für jeden Patienten wurden bei beiden Testverfahren jeweils mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt, um die Validität der Untersuchungsergebnisse sicherzustellen. Diese Kontrollen wurden grundsätzlich durchgeführt, um einerseits die technische Zuverlässigkeit des Testverfahrens und andererseits die Qualität der Probe zu evaluieren. Die Zellen wurden unter gleichen Bedingungen wie unter dem Test keinem Agens (Negativkontrolle) bzw. einem Agens, das mit einem hohen Prozentsatz zu einer Aktivierung bzw. Proliferation der Zellen führen sollte (Positivkontrolle), ausgesetzt. Details zu Positiv- und Negativkontrolle bei den durchgeführten zellulären Allergietests werden in Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 dargestellt.

Die Wertung der Tests erfolgte anhand von Indizes: Für den BAT der Aktivierungsindex (AI) und für den LTT der so genannten Stimulationsindex (SI). Die Aktivierung (BAT) und die Proliferation (LTT) der Negativkontrollen wurden zu denen der Testergebnisse ins Verhältnis gesetzt.

### **3.2.2. Basophilenaktivierungstests (BAT)**

Nach Inkubation der basophilen Granulozyten und weiterer Zellen mit den Medikamenten wurden nach Durchführung der weiteren notwendigen Schritte mittels eines kommerziell erhältlichen Flowcytometers (Shapiro 2005; Leysen et al. 2011) die basophilen Granulozyten anhand spezifischer Oberflächenmarker identifiziert und auf diesen die Expression von CD63 (CD = Cluster of Differentiation) als Aktivierungsmarker und CD203c als Marker für basophile Granulozyten gemessen (Trautmann & Kleine-Tebbe 2013; Mutius et al. 2013).

Für die BATs der Pilotstudie wurden pro Patient jeweils eine Negativkontrolle und zwei Positivkontrollen durchgeführt. Für die Positivkontrollen wurden Zellen jeweils mit FcεRI-Antikörper (anti-IgE-Rezeptor) (siehe Abbildung 3) und FMLP-Peptiden (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) inkubiert, die über verschiedene Mechanismen

zur Aktivierung der basophilen Granulozyten führten. Anschließend wurde die Expression von CD203c und CD63 auf basophilen Granulozyten nach Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern fluscytometrisch gemessen. Bei der Negativkontrolle wurden die Zellen unter identischen Bedingungen inkubiert. Der Unterschied von Positiv- und Negativkontrolle lag darin, dass für die Inkubation bei der Negativkontrolle keine aktivierenden Antikörper eingebracht wurden.

Um die dosisabhängige spezifische Reaktivität der basophilen Granulozyten der Patienten zu untersuchen, wurden diese in Verdünnungsreihen der vorher HRP A verursachenden Antibiotika inkubiert. Nach weiteren Schritten wurde unter gleichen Bedingungen wie bei Positiv- und Negativkontrollen fluscytometrisch die Expression von CD203c und CD63 gemessen. Anhand der Ergebnisse wurde der sogenannte Aktivierungsindex berechnet. Dieser gibt das Verhältnis der aktivierten basophilen Granulozyten bei der Messung mit Allergen gegenüber der Anzahl der aktivierten basophilen Granulozyten bei der Messung ohne Allergene (Negativkontrolle) an. Werte von größer gleich 2,5 sprechen für das Vorliegen einer spezifischen Überempfindlichkeit.

*Im Folgenden wird die Durchführung des BAT im Detail dargestellt.*

Folgende Lösungen und Stimulantien wurden für die Durchführung des BAT verwendet:

**Stimulantien:**

- **fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)**
- **anti-FcεRI (anti-IgE-Rezeptor)** Stimulation Kontrolle, 25µl, (-20°C tiefgekühlt, ohne IL 3)
- **Medikamente:** Antibiotika in Verdünnungsreihen von der max. Wirkstoffkonzentration im Serum bis maximal zur 10<sup>-4</sup> fachen Konzentration (Siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Verdünnungsreihen der Medikamente**

Medikament	Konzentrationen in µg/ml			
Piperacillin/ Tazobactam	1	10	100	1000
Ceftazidim	0,1	1	10	100
Meropenem	1	10	100	1000
Ampicillin/ Sulbactam	0,1	1	10	100
Aztreonam	-	1	10	100
Cefepime	-	1	10	100
Colistin	-	0,01	0,1	1

**Puffer:**

- **VLE RPMI 1640** (very low endotoxin)
- **PBS-Azid:** 500 ml PBS (PAA H15-002) + 0,1g NaN<sub>3</sub> + 0,186 g EDTA = 1mM
- **Lyse-Puffer (10x):** 82,9 g/l NH<sub>4</sub>CL + 10,2 g/l KHCO<sub>3</sub> + 292 mg/l EDTA (1:10 mit Aqua dest. Verdünnen)

Zur Durchführung der Stimulation wurden im Folgenden die Reagenzröhrchen

- für die Negativkontrolle als Reagenzröhrchen 1,
- für die Positivkontrolle mit fMLP als Reagenzröhrchen 2,
- für die Positivkontrolle mit anti-FcεRI als Reagenzröhrchen 3 und
- exemplarisch für die Röhrchen mit diversen Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen als Reagenzröhrchen x bezeichnet.

In einem ersten Schritt wurden 100µl Ammoniumheparin-Blut pro Reagenzröhrchen in jedes Röhrchen pipettiert. Im zweiten Schritt wurden die Stimulantien hinzugegeben:

- für Reagenzröhrchen 1 100µl RPMI,
- für Reagenzröhrchen 2 100µl fMLP 10<sup>-5</sup>M,
- für Reagenzröhrchen 3 25µl anti-FcεRI (10µg/ml) und
- für Reagenzröhrchen x jeweils 100µl Antibiotikallösung.

Jedes Röhrchen wurde nun mit der Pipette vorsichtig gemischt.

Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) im Wasserbad. Die Degranulation wurde gestoppt, indem die Röhren für fünf Minuten in ein Eisbad gestellt wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten (300g, 1200rpm Sorvall, 4°C mit Bremsung). Nach Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen (ca. 100µl) und verworfen. Die Färbung – eine Voraussetzung für die flusscytometrische Messung der Oberflächenmarker - erfolgte mit einem so genannten Antikörpermix.

Der Antikörper-Mix für beispielsweise sieben Reagenzröhrchen (tubes) in Cryotube (Lichtempfindlichkeit) kann so beschrieben werden:

- 80µl CD123 (PE Cy5), d.h. 10µl/tube
- 80µl CD63 (FITC), d.h. 10µl/tube
- 80µl CD203c (PE), d.h. 10µl/tube
- 20µl HLA-DR (PE Cy7), d.h. 2,55µl/tube
- 20µl CD45 (APC Cy7), d.h. 2,55µl/tube

Nachdem die Antikörper zusammen gegeben worden waren, erfolgte das Mischen per Schüttelgerät (Vortex) und anschließend eine kühle und dunkle Aufbewahrung. Anschließend erfolgte in dem gegenwärtigen Beispiel mit sieben Reagenzröhrchen die Pipettierung von 35µl Antikörper-Mix in Röhrchen 1 bis 7 (x). Jedes Röhrchen wurde vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Die gefärbten Reagenzröhrchen wurden für 25 Minuten - dunkel gelagert - im Kühlraum inkubiert. Danach erfolgte die Lyse, indem je Röhrchen 4 ml Lysepuffer vorsichtig mit der Pipettenspitze resuspendiert wurden. Diese wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert und dann zentrifugiert (10min, 1450 rpm, 4°C mit Bremse). Nun wurden die Zellen gewaschen indem zunächst die Überstände abgesaugt wurden, anschließend die Zellen mit 4ml PBS-azid resuspendiert und schließlich erneut zentrifugiert wurden (10 min, 400g (1450rpm), 4°C, mit Bremse). Danach wurden abermals die Überstände abgesaugt und die Zellen mit 100µl PBS-azid resuspendiert. Bis zur Messung im FACS Canto II Flowcytometer mussten die Proben bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Messungen erfolgten im FACS Canto II Flowcytometer (BD Biosciences), die Zellsortierung erfolgte mit den in Tabelle 2 angegebenen Parametern.

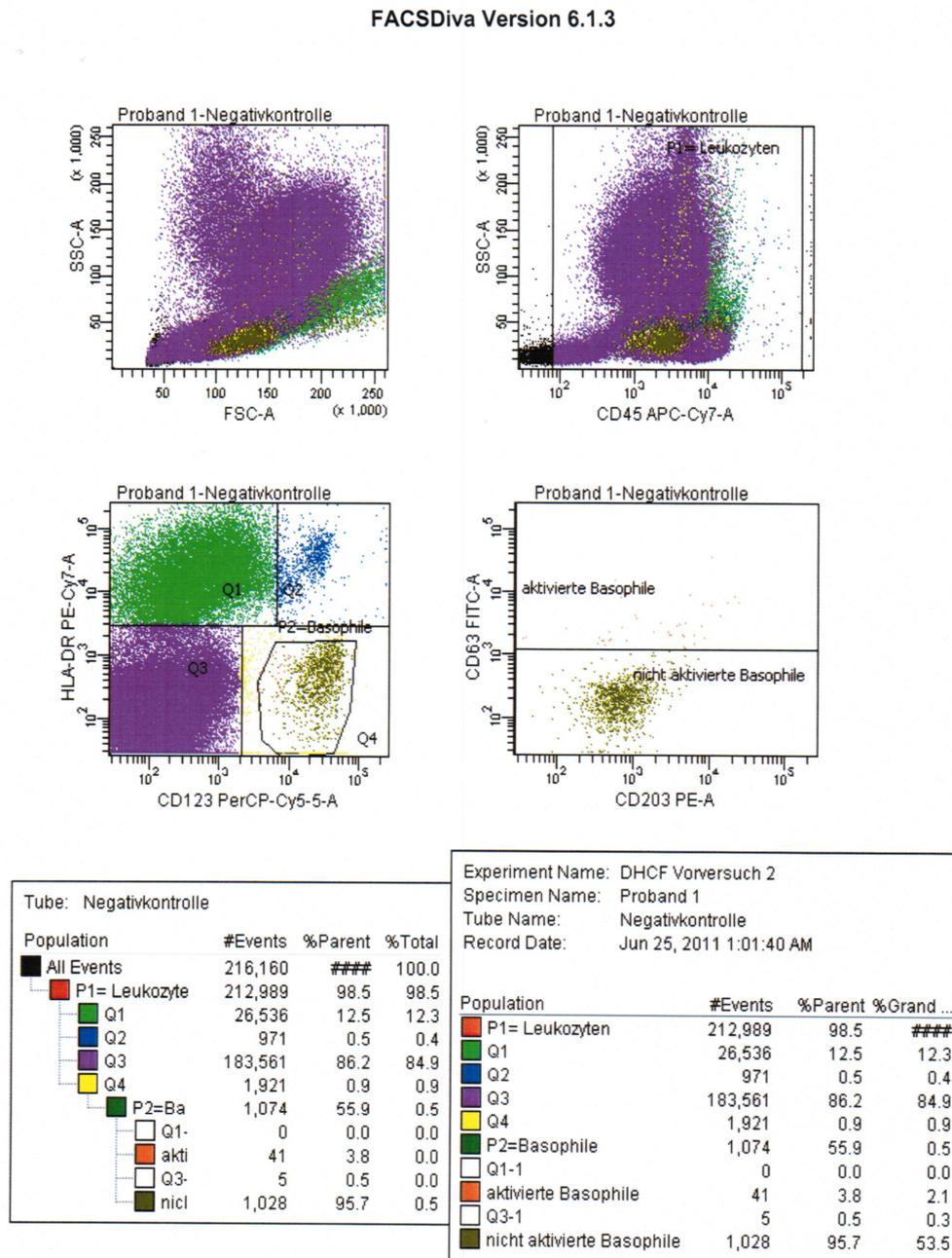
**Tabelle 2: Parameter der Flowcytometrie**

<b>Parameter</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Antikörper Produktbezeichnung BD = Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</b>
FSC (forward scatter)	Zellgröße	
SSC (sideward scatter)	Innere Komplexität/ Granularität der Zelle	
CD45	Leukozyten	APC -Cy7 BD #348815 Klon 2D1
CD123 (IL-3 Rezeptor)	Basophile, Mastzellen, Makrophagen, KM-Stammzellen , Lymphozyten	PE-Cy 5 BD #551065 Klon 9F5
HLA-DR (MHC II-R)	APCs (B-Zellen, Mono/Makrophagen, dendrit. Zellen), aktivierte T-Zellen, aktivierte NK-Zellen	PE-Cy7 BD #335830 Klon L 243
CD203c	Basophile, Myeloide Zellen (Uterus, Mastzellen), KM-Stammzellen (Basos und Mastz.) Aktivierungsmarker, keine Reaktion mit Thrombos	PE BCO –IM 3575 Klon 97176
CD63	Basophilen-Aktivierungsmarker Monocyten, Makrophagen aktivierte Thrombozyten,	FITC BD#557288 Klon H5C5

Die Darstellungen in den Abbildungen 2 und 3 (X - gegen Y-Achse) erfolgten zur Selektion der zu analysierenden basophilen Granulozyten in aktivierter und nicht aktivierter Form. In den Abbildungen lässt sich das im Folgenden beschriebene Vorgehen optisch nachvollziehen.

Zunächst erfolgte die Darstellung von FSC gegen SSC. Dann wurden von CD45 positive Zellen gegen SSC zur Identifikation der Leukozyten dargestellt. Das so genannte „Leukozytengate“ wurde gesetzt, d.h. der Bereich, der die CD45 positiven Zellen mit hoher Granularität (SSC) abbildet, wurde in der Auswertungssoftware manuell markiert (Leukozytengate = P1). Im Leukozytengate wurde CD123 gegen HLA-DR dargestellt, dies ermöglichte es, die Basophilen zu identifizieren. Das so genannte „Basophilengate“ (= P2) wurde gesetzt, indem die CD123 positiven und HLA-DR negativen Zellen markiert wurden. Im Basophilengate wurde CD203c gegen CD63 dargestellt. Nicht aktivierte Basophile waren CD203c positiv und CD63 negativ; aktivierte Basophile

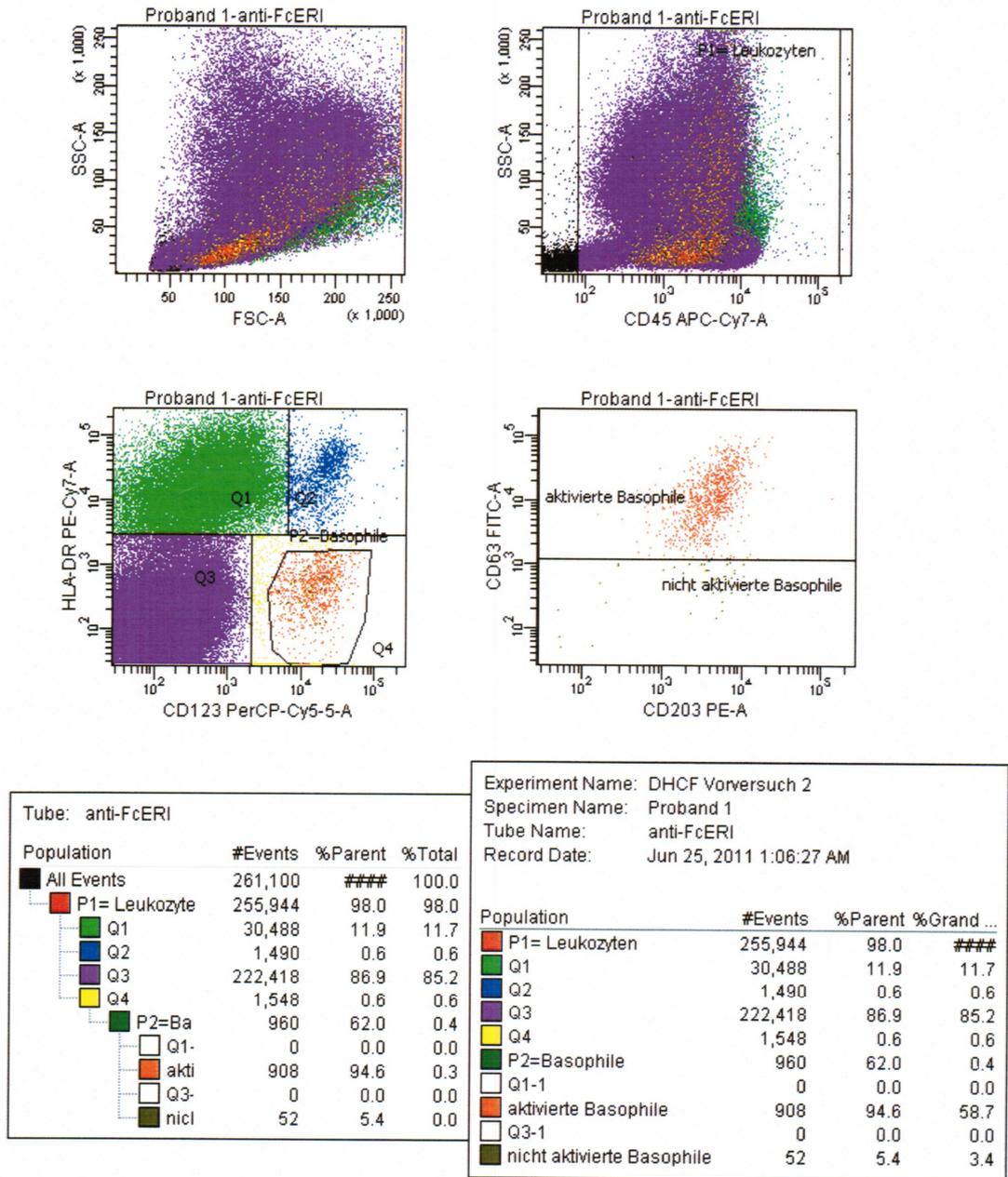
hingegen waren CD203c positiv und CD63 positive Zellen. In der anti-FcεRI Positivkontrolle (Abbildung 3) wurde die Grenze zwischen aktivierten und nicht aktivierten Basophilen für jeden einzelnen Patienten eingestellt.



**Abbildung 2: BAT Negativkontrolle**

Abbildung 2, eine Originalmessung aus unseren Untersuchungen, demonstriert das Prinzip des BAT und der vorangehenden Negativkontrolle. Die basophilen Granulozyten werden unter anderem anhand des Oberflächenmarkers CD123 erkannt und zeigen wie erwartet kaum Expression von CD63. 3,8% der Basophilen werden als aktiviert erkannt.

FACSDiva Version 6.1.3



**Abbildung 3: BAT Positivkontrolle**

Abbildung 3, ebenfalls eine Originalmessung aus unseren Untersuchungen, demonstriert das Prinzip des BAT und der vorangehenden Positivkontrolle. Die basophilen Granulozyten werden unter anderem anhand des Oberflächenmarkers CD123 erkannt und zeigen wie erwartet eine deutliche Expression von CD63, 94,6% der Basophilen werden als aktiviert erkannt

### 3.2.3. Lymphozytentransformationstests (LTT)

LTTs sind ein Verfahren mit Anwendung in der immunologischen Diagnostik, beispielsweise wenn der Verdacht auf einen Immundefekt vorliegt und in der Diagnostik von T-zellulären Allergien. Prinzipiell werden bei einem LTT Lymphozyten des Patienten mit Agenzien inkubiert, auf die bei vorheriger Sensibilisierung und intakter T-Zell Funktion eine Proliferation der spezifischen Lymphozyten erwartet wird. Für die vorliegende Pilotstudie wurden die Zellen dafür unter anderem mit radioaktivem H<sub>3</sub>-Thymidin inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 96-well Platten. Nach sechs Tagen wurde die T-Zell Proliferation quantitativ abgelesen, indem nach Waschen der Zellen die Radioaktivität auf jedem Well einzeln in „counts per minute“ (CPM) gemessen wurde. Die gemessene Radioaktivität korrelierte linear mit dem bei der zellulären Proliferation inkorporierten H<sub>3</sub>-Thymidin. Details siehe (Trautmann & Kleine-Tebbe 2013; Mutius et al. 2013).

Auch beim LTT wurden für jeden Patienten einzeln jeweils zwei Positiv- und eine Negativkontrolle (Medium) durchgeführt. Bei den Positivkontrollen wurde einerseits mit einem Antigen (in der vorliegenden Studie Tetanustoxoid) und andererseits mit einem unspezifischen Mitogen (Phytohämagglutinin) stimuliert.

Anhand der Ergebnisse wurde der sogenannte Stimulationsindex bestimmt. Zur Berechnung des Index wurde der Quotient aus den „counts per minute“ mit dem Allergen und den „counts per minute“ ohne das Allergen (Negativkontrolle) gebildet. Werte größer oder gleich drei wurden als positiv gewertet, 2 – 3 als grenzwertig und kleiner als 2 als negativ.

*Im Folgenden wird die Durchführung des LTT im Detail dargestellt:*

Die Patientenprobe, das Lithium-Heparinblut, wurde 1:8 mit VLE RPMI verdünnt (VLE RPMI ohne Zusätze). Von dem verdünnten Blut wurden 100 µl zu 100 µl Mitogen- bzw. Antigen- oder Medikamentenlösung gegeben. Diese wurden in Zellkulturplatten (96-well, round-bottom) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach sechs Tagen Inkubation wurden die einzelnen Wells mit 0,0185 MBq = 0,5µCi <sup>3</sup>H-Thymidin/well markiert, dann erneut im Brutschrank inkubiert und nach ca. 24h bei -20°C eingefroren, um die Erythrozyten zu lysieren. Nun wurden die Platten bei Raumtemperatur für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Zuletzt wurden die Zellen geerntet und am Beta-Counter die Radioaktivität gemessen.

**Verwendete Reagenzien:**

- VLE (Very Low Endotoxin) RPMI ohne Zusätze enthält 2g NaHCO<sub>3</sub>, ohne Glutamine
- Methyl-3H-Thymidin  
Stocklösung: 37MBq (1mCi)/ml; Stocklösung. 1:50 verdünnen mit PBS, davon 25µl/well pipettieren, 0,0185 MBq/ well = 0,5µCi/well

**Stimulantien:**

- Mitogene: PHA (Phythämagglutinin ) Endkonzentration: 2, 6 und 20 µg/ml
- Antigene: Tetanus-Toxoid Endkonzentration 20 Lf/ml

**Tabelle 3: Liste der für BAT und LTT verwendeten Chemikalien (Antikörper siehe Tabelle 2)**

Chemikalie	Verwendung	Hersteller
fMLP = (N-formyl-Methionyl-leucyl-phenylalanine)	Stimulanz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
anti-FcεRI (anti-IgE-Rezeptor) Antikörper	Stimulanz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
RPMI 1640 VLE	Puffer	Biochrom GmbH, Berlin
PBS-Azid	Puffer	Biochrom GmbH, Berlin
Lyse-Puffer	Puffer	Biochrom GmbH, Berlin
Methyl-3H-Thymidin	Radioaktive Proliferationsmarkierung	Amersham Buchler, Braunschweig
PHA = Phythämagglutinin	Mitogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Tetanus-Toxoid	Antigen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Beobachtungsstudie

#### 4.1.1. Überblick über die Patientencharakteristika

Von den 125 Patienten, die das Einschlusskriterium erfüllten, willigten 100 Patienten (80%) mit folgenden Charakteristika ein, an der Studie teilzunehmen (siehe Tabelle 4). Die in der Tabelle 4 aufgeführte Gruppe “pädiatrisch” umfasst alle Patienten aus der Gruppe “gesamt”, die zum Beobachtungszeitpunkt unter 18 Jahre alt waren.

**Tabelle 4: Patientencharakteristika**

Gruppe	“gesamt”	“5-Jahr-Dok”	“Lebenslang”	“pädiatrisch”
N (Anzahl der Patienten)	100	66	50	8
Alter Ø in Jahren	27,9 SD 10,8	28,5 SD 11,6	28,1 SD 13	9 SD 5,1
Anteil männlich in %	38	36	39	50
FEV1 Ø, in %	52,3 SD 2,3	54,4 SD 26,1	55 SD 27,1	71,7 SD 39,2
Anzahl Kurse Ø	NA	NA	50,5 SD 31,6	21,5 SD 14,4
PA-Besiedlung Ø in Jahren	16,1 SD 6,6	17,4 SD 6,0	16,7 SD 6,3	5,8 SD 7,7
Allergie screen+ in %	29	29	32	0
≥1 HRP in %	60	65	65	38

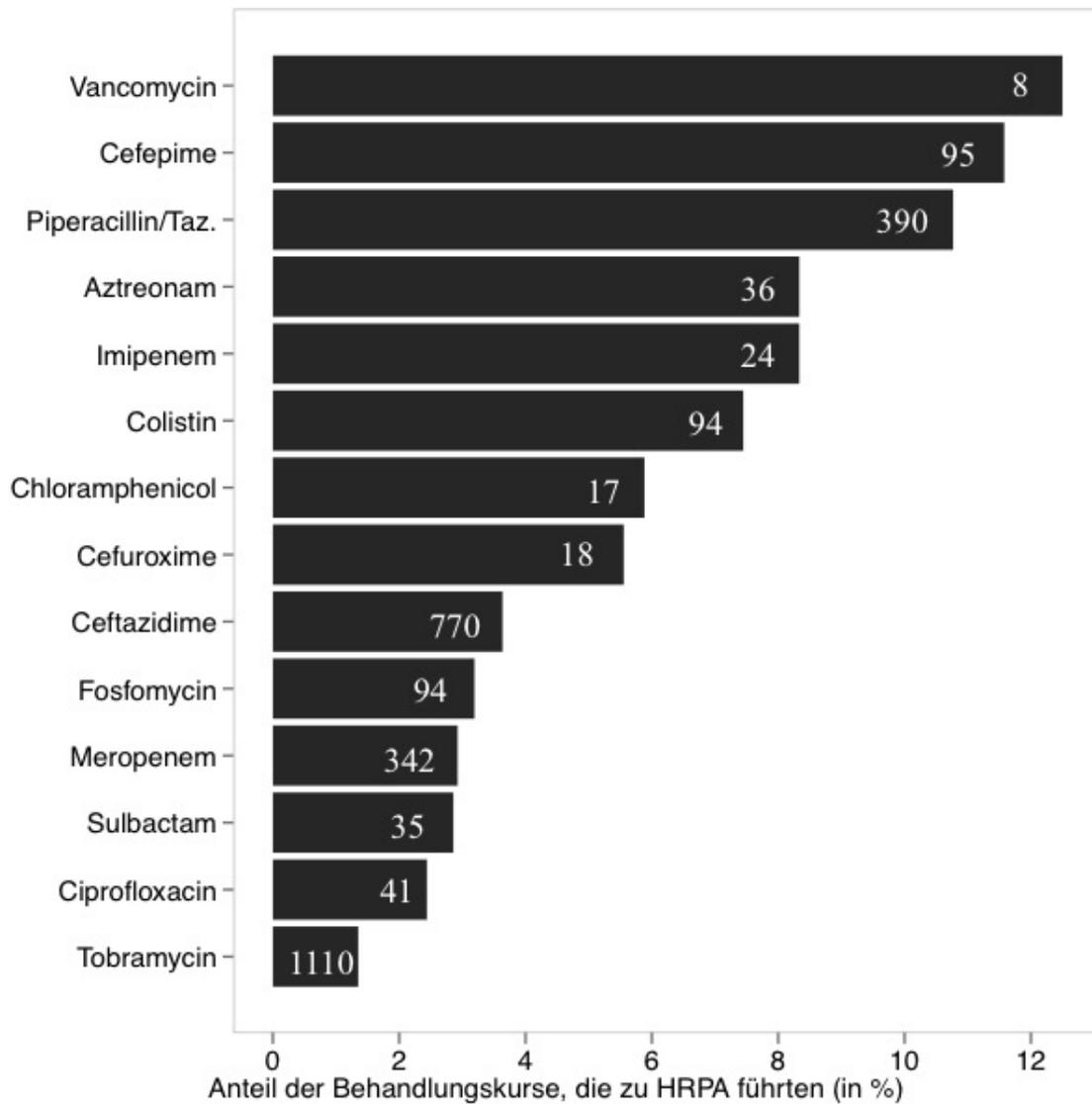
FEV1 = aktuelle FEV1 in %; PA-Besiedlung in Jahren = *Pseudomas aeruginosa* (PA) Besiedlungsdauer in Anzahl von Jahren; Allergie screen + = Standard IgE-Screeningtests für Aeroallergene positiv; Anzahl Kurse = Anzahl der intravenösen antibiotischen Behandlungskurse; ≥1 HRP = Anteil der Patienten mit mindestens einer HRP

### 4.1.2. Prävalenz der HRPAs

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zur Prävalenz von HRPAs basieren auf der Auswertung der Gruppe „gesamt“ (N=100). Insgesamt wurden 185 HRPAs mit 376 Symptomen bei 60 betroffenen Patienten beobachtet. Im Durchschnitt wurden entsprechend 3,1 Reaktionen pro betroffenem Patienten dokumentiert. 65% aller HRPAs führten zu einer Veränderung der Therapie oder zur Beendigung des antibiotischen Behandlungskurses. Von den Patienten mit HRPAs hatten 46% zwei oder mehr Reaktionen und 31% drei oder mehr Reaktionen. Bezüglich pädiatrischer Patienten (N=8) wurden insgesamt vier Reaktionen bei drei betroffenen Patienten beobachtet. Eine Analyse der Antibiotikaklassen ergab, dass in der Gruppe „gesamt“ Penicilline für 35,5 % der Reaktionen verantwortlich waren, Cephalosporine für 34,6%, Carbapeneme für 9,6%, Chinolone für 4,3% und Polypeptide für 4,3%. 79% aller dokumentierten Reaktionen traten nach Gabe von  $\beta$ -Lactam Antibiotika auf.

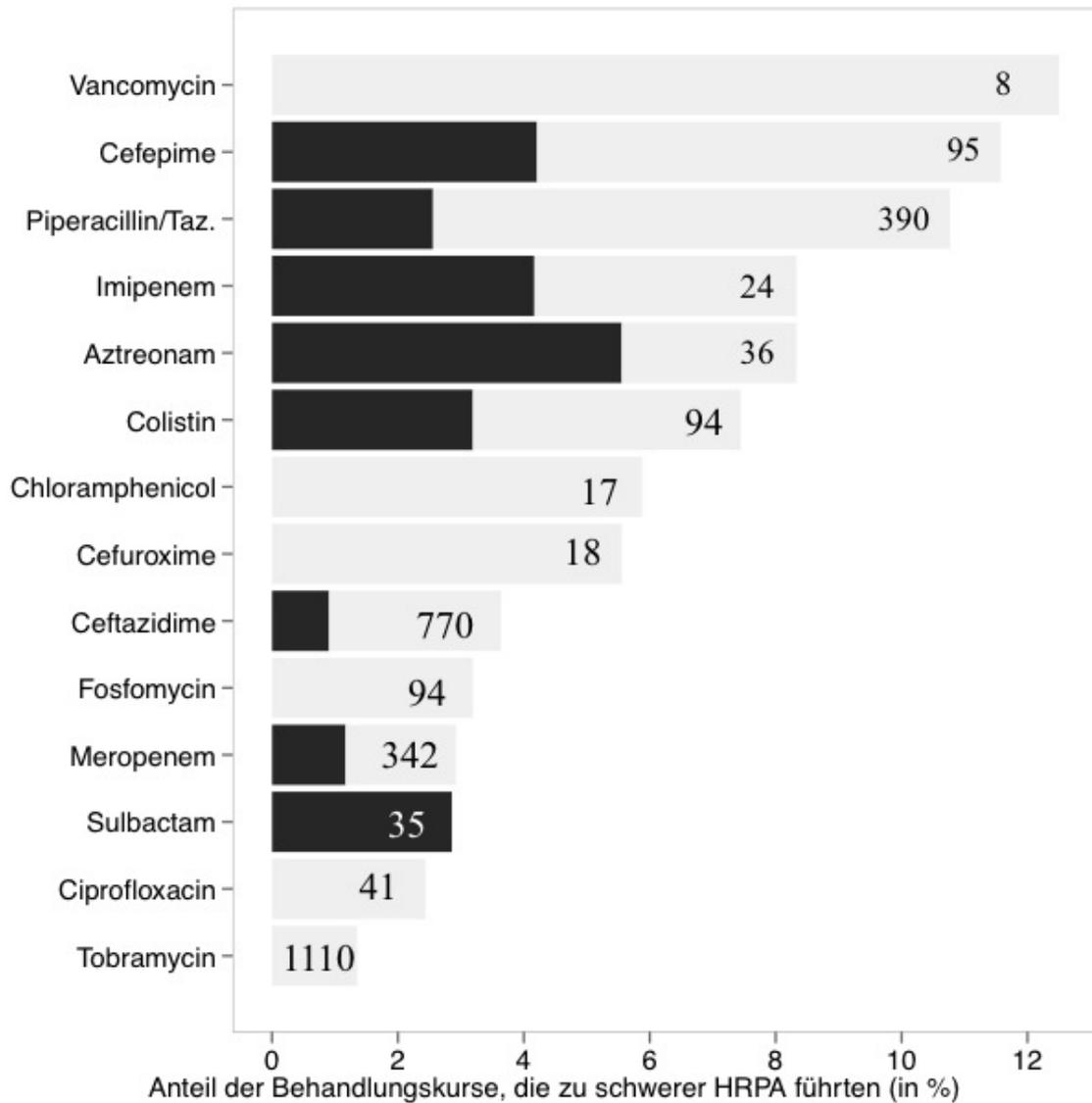
### 4.1.3. Risiko der Antibiotika für HRPAs

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zum Risiko der einzelnen Antibiotika basieren auf der Auswertung der Gruppe „5-Jahre-Dok“ (N=66). Es wurden 3205 einzelne antibiotische Behandlungskurse analysiert. Es zeigt sich, dass Piperacillin/Tazobactam (N=63) und Cefprozid (N=50) die beiden Antibiotika waren, die die absolut höchste Anzahl von HRPAs verursachten. Die beiden Antibiotika verursachten außerdem die meisten anaphylaktischen HRPAs (Piperacillin/Tazobactam N=9 und Cefprozid N=7). Das höchste Risiko wurde für Vancomycin festgestellt, da 12% aller Behandlungskurse mit Vancomycin zu HRPAs führten. Für *antipseudomonale* Medikamente war das Risiko für HRPAs am höchsten für Cefepim (11%) und Piperacillin/Tazobactam (10%). Das höchste Risiko für anaphylaktische HRPAs hatten Aztreonam (6%) und Cefuroxim (6%). In den Abbildung 4 bis 6 werden für die einzelnen Antibiotika das Risiko aller HRPAs (Abbildung 4), nur der schweren HRPAs (Abbildung 5) sowie nur der anaphylaktischen Reaktionen (Abbildung 6) dargestellt.



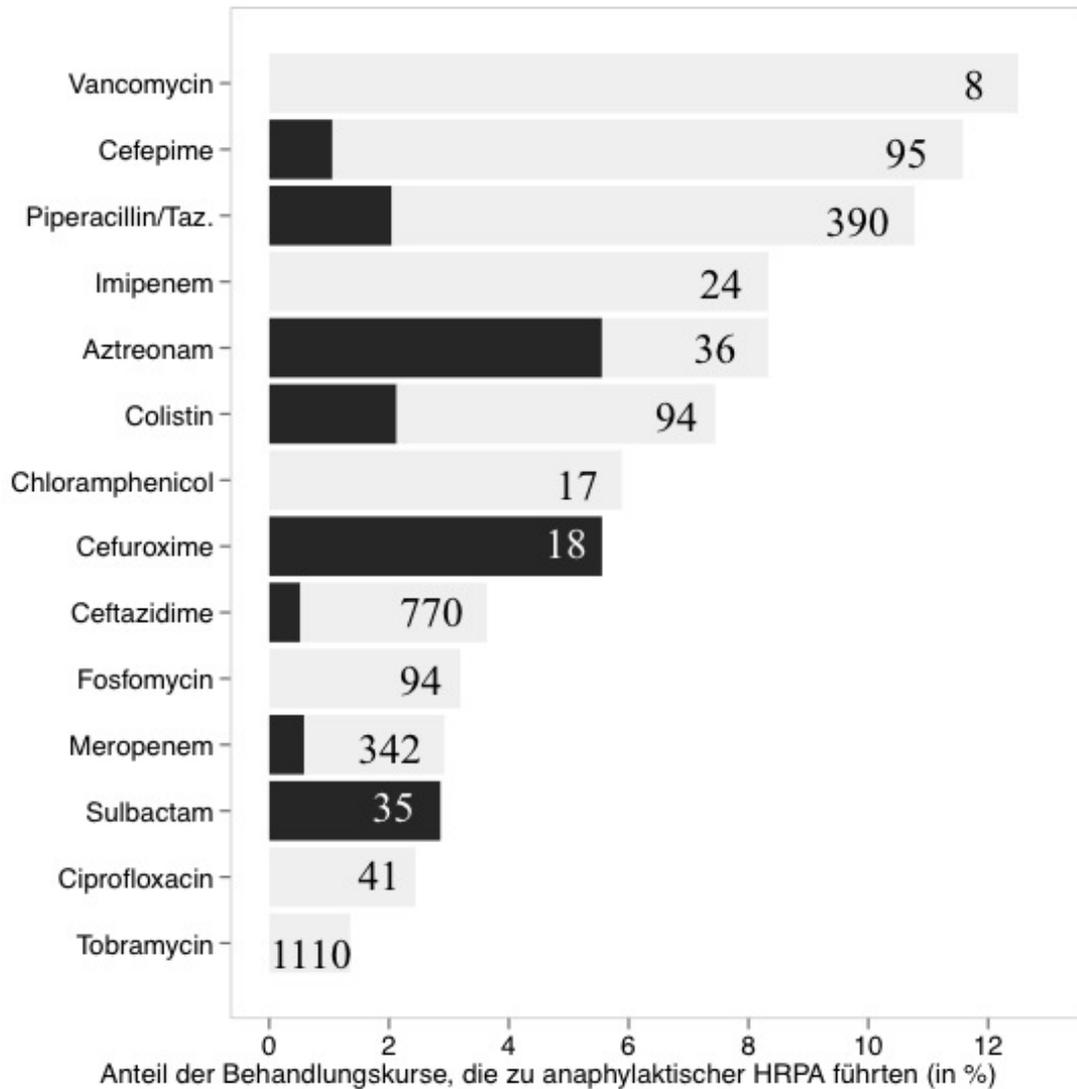
**Abbildung 4: Anteil der Behandlungskurse mit HRA.**

Abgebildet ist der Anteil in Prozent der Behandlungskurse, die zu einer HRA führten, an allen Behandlungskursen mit dem jeweiligen Antibiotikum. Die angegebene Zahl stellt die Anzahl aller Behandlungskurse mit dem jeweiligen Antibiotikum dar. Ausgewertet wurde die Gruppe "5-Jahre-Dok" (N=66).



**Abbildung 5: Anteil der Behandlungskurse mit schwerer HRPAs.**

Abgebildet in schwarz ist der Anteil in Prozent der Behandlungskurse, die zu einer schweren HRPAs führten, an allen Behandlungskursen mit dem jeweiligen Antibiotikum. Die angegebene Zahl stellt die Anzahl aller Behandlungskurse mit dem jeweiligen Antibiotikum dar. Zur Illustration ist in grau der Anteil der Behandlungskurse angegeben, die insgesamt zu einer Reaktion geführt hat. Ausgewertet wurde die Gruppe "5-Jahre-Dok" (N=66). Definition schwere HRPAs: Beteiligung von bronchopulmonalem und/oder kardiovaskulärem System.



**Abbildung 6: Anteil der Behandlungskurse mit anaphylaktischer HRPAs.**

Abgebildet in schwarz ist der Anteil in Prozent der Behandlungskurse, die zu einer anaphylaktischen HRPAs führten, an allen Behandlungskursen mit dem jeweiligen Antibiotikum. Die angegebene Zahl stellt die Anzahl aller Behandlungskurse mit dem jeweiligen Antibiotikum dar. Zur Illustration ist in grau der Anteil der Behandlungskurse angegeben, die insgesamt zu einer Reaktion geführt hat. Ausgewertet wurde die Gruppe "5-Jahre-Dok" (N=66).

Definition anaphylaktische HRPAs: siehe Kriterien der WAO (Simons et al. 2011).

#### 4.1.4. Charakteristika der HRPA

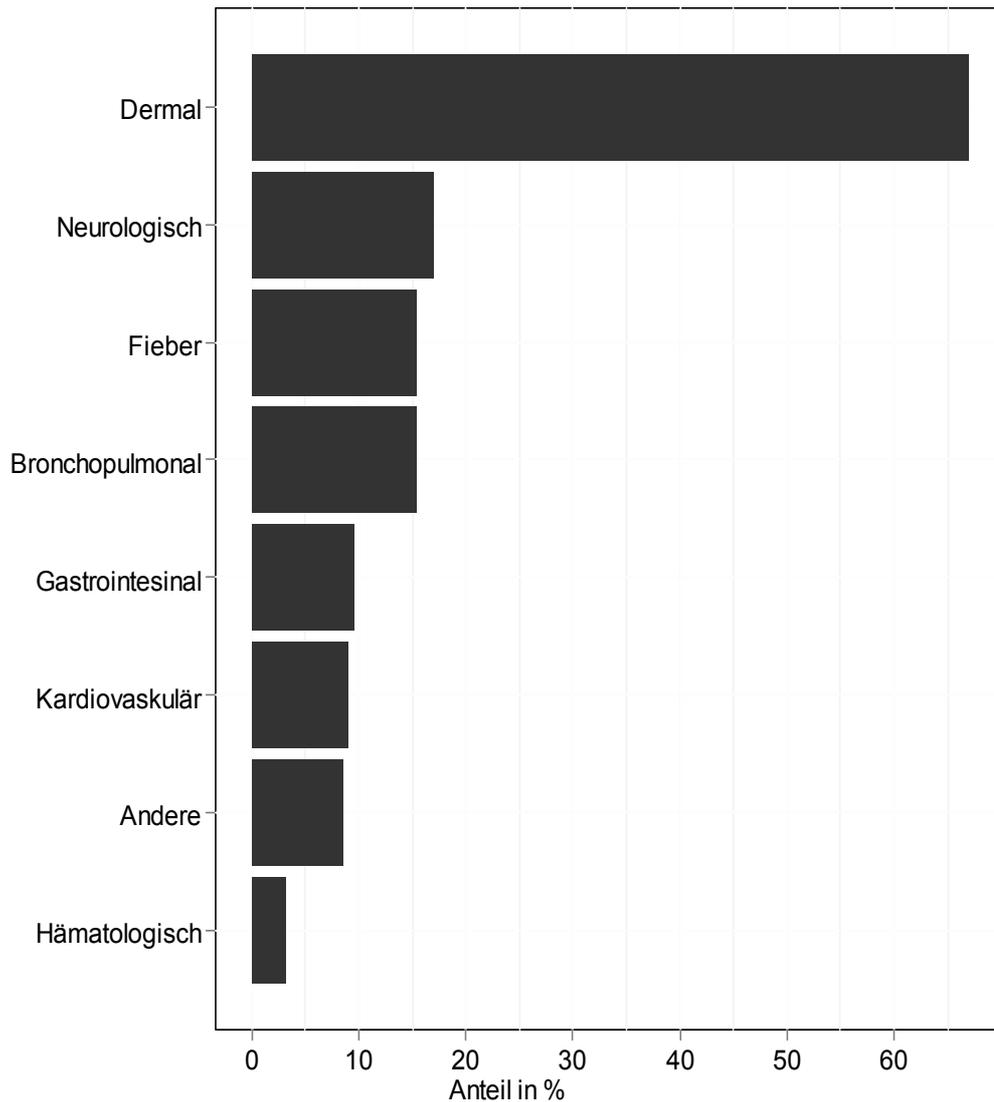
Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zu den einzelnen Symptomen von HRPA basieren auf der Auswertung der Gruppe "gesamt" (N=100). Eine Reaktion bestand in der vorliegenden Auswertung aus einem bis maximal fünf Symptomen. Für die Gruppe "gesamt" (N=100) wurden insgesamt 376 Symptome bei 180 Reaktionen beobachtet. Da eine große Bandbreite verschiedener Symptome beobachtet werden konnte, wurden diese in acht Symptomgruppen unterteilt, um eine pathophysiologische Beurteilung zu ermöglichen: Insgesamt 53% der beobachteten Symptome waren dermale Symptome, 10% waren Medikamentenfieber (drug fever), 9% Bronchospasmus, 9% neurologische Symptome, 7% gastrointestinale Symptome, 4% kardiovaskulär, 3% hämatologisch und 4% andere. In Tabelle 5 werden für alle Symptomgruppen die jeweils drei häufigsten Symptome innerhalb der Symptomgruppe genannt. Die angegebenen Prozentwerte geben den Anteil des jeweiligen Symptoms an den Symptomen aller Symptomgruppen an. Die Anteile addieren sich entsprechend zu 100%. Insgesamt wurden 24% der Reaktionen als schwer klassifiziert, 15% als anaphylaktisch. Keine der Reaktionen erforderte eine Behandlung auf der Intensivstation.

In Abbildung 7 wird der Anteil der HRPA für die jeweiligen Symptomgruppen dargestellt. Da pro HRPA mehrere Symptome, auch verschiedener Symptomgruppen, beobachtet werden können, addieren sich die Anteile – im Gegensatz zu Tabelle 5 – zu mehr als 100%.

**Tabelle 5: Verteilung der HRPAsymptome**

<b>Derm</b>	<b>Drug Fever</b>	<b>BP</b>	<b>Neuro</b>	<b>Gastro</b>	<b>Kardio</b>	<b>Hema</b>	<b>Other</b>
<b>53%</b>	<b>10%</b>	<b>9%</b>	<b>9%</b>	<b>7%</b>	<b>4%</b>	<b>3%</b>	<b>4%</b>
Juckreiz		Bronchospasmus	Schwindel	Übelkeit	Tachykardie	Thrombo- penie	Gelenkschmerzen
18%		5,8%	4,4%	4,4%	3%	1,5%	1,0%
Exanthem/ "Flush"		Atemnot	Parästhesie	Erbrechen	art. Hypo- tension	Lympho- penie	Lokale Schmerzen
9,3%		1,7%	2,5%	1,8%	0,7%	0,9%	1,0%
Urtikaria		Thorakales Engegefühl	Cephalgien	Diarrhoe	art. Hyper- tension	Erythro- penie	Hyperhidrose
9,3%		1,5%	2,3%	0,5%	0,2%	0,3%	1,0%

Für die Gruppe „gesamt“ (N=100) wurden insgesamt 376 Symptome in 180 Reaktionen beobachtet. Alle beobachteten Symptome wurden in acht Symptomgruppen eingeteilt: dermale Symptome (Derm), Drug Fever, Bronchospasmus (BP), neurologische Symptome (Neuro), gastrointestinale Symptome (Gastro), kardiovaskuläre Symptome (Kardio), hämatologische Symptome (Hema) und andere Symptome (Other). Berichtet wird in der ersten Zeile der Anteil der beobachteten Symptome der einzelnen Symptomgruppen an allen Symptomen. Die Anteile addieren sich entsprechend zu 100%. In den Zeilen 2 – 4 werden für die jeweils häufigsten drei Einzelsymptome der genannten Symptomgruppen darüber der Anteil des Einzelsymptoms an allen Symptomen (symptomgruppenübergreifend) dargestellt. Alle in den Zeilen 2-4 dargestellten Anteile addieren sich damit zu weniger als 100%, da jeweils nur die drei häufigsten Einzelsymptome dargestellt sind.



**Abbildung 7: Anteil der HRPAs mit den entsprechenden Symptomgruppen.**

Abgebildet wird für die Gruppe „gesamt“ ( $N=100$ ) der Anteil der HRPAs (in Prozent), bei denen mindestens ein Symptom der jeweiligen Symptomgruppe beobachtet wurde. Da pro HRPAs mehrere Symptome (auch verschiedener Symptomgruppen) beobachtet werden konnten, addieren sich die Anteile zu mehr als 100%. Die Abbildung 7 zeigt beispielsweise, dass in 67% aller HRPAs mindestens ein dermales Symptom zu beobachten war.

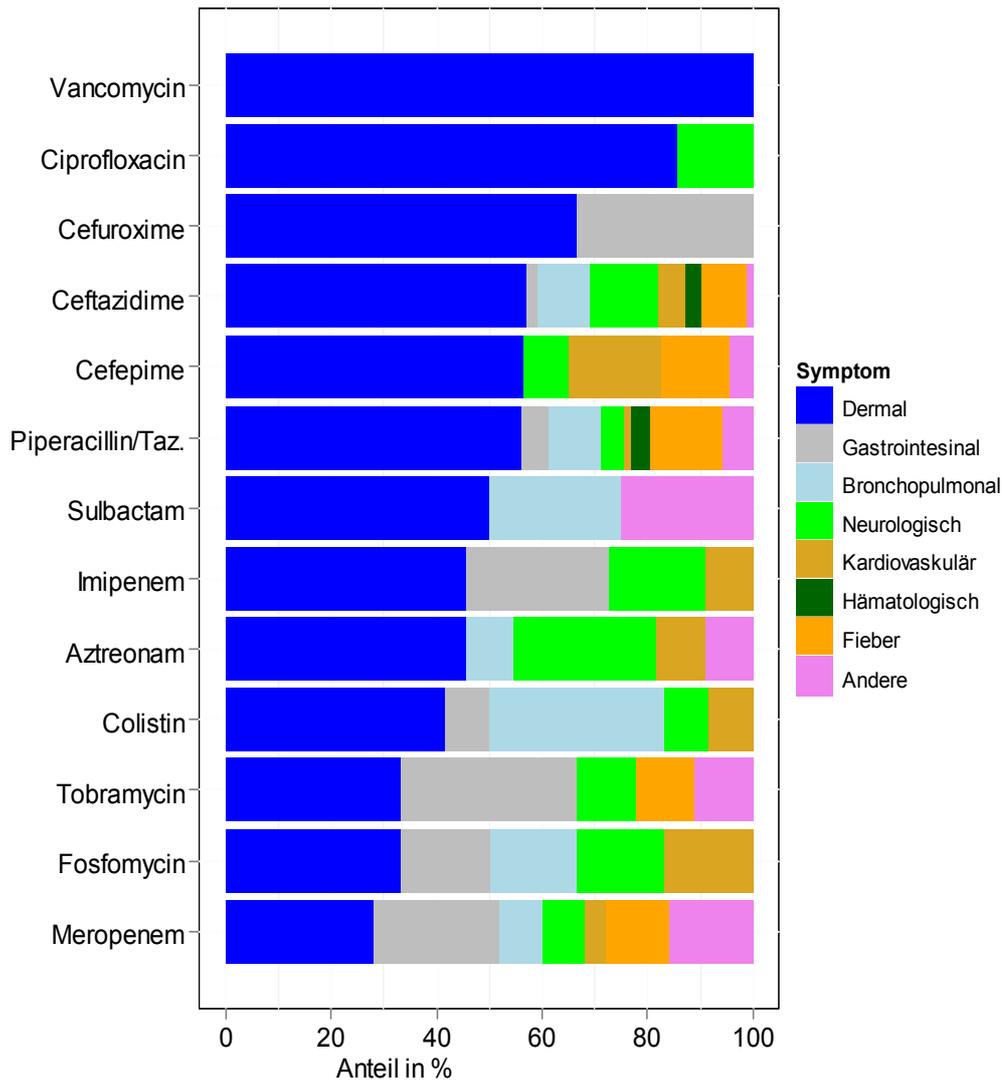
Wie oben ausgeführt, konnten im Rahmen einer HRPAs mehrere Symptome beobachtet werden. Hierbei war es interessant zu analysieren, ob bestimmte Symptome besonders häufig in Zweierkombinationen auftraten. Aufgrund der Vielzahl der verschiedenen Symptome wurde hier wiederum auf die Symptomgruppen zurückgegriffen. Am häufigsten trat die Zweierkombination dermalen Symptome mit Bronchospasmus auf (9%). In Tabelle 6 werden die häufigsten Zweierkombinationen von Symptomen dokumentiert.

**Tabelle 6: Verteilung der Symptomkombination der HRPAs**

Symptomgruppe 1	Symptomgruppe 2	Anteil aller HRPAs mit Symptomgruppe 1 und 2
Dermal	Bronchopulmonal	9,0%
Dermal	Neurologisch	6,4%
Dermal	Fieber	4,8%
Kardiovaskulär	Neurologisch	4,8%
Andere	Dermal	4,3%
Gastrointestinal	Fieber	3,2%
Hämatologisch	Fieber	1,6%

*Berichtet werden für die Gruppe „gesamt“ (N=100) die häufigsten Symptomkombinationen. Der angegebene Wert stellt dar, bei wie viel Prozent aller HRPAs die genannte Symptomkombination beobachtet wurde. Die Zahlen addieren sich nicht zu 100%, da auch HRPAs mit Symptomen nur einer Symptomgruppe beobachtet wurden.*

In Abbildung 8 wird die Häufigkeit der Symptomgruppen pro Antibiotikum dargestellt, d.h. es wird der prozentuale Anteil der Symptome je Antibiotikum dargestellt. Zur Übersichtlichkeit wurden die Symptome gruppiert, z.B. sind Urtikaria, Erythrodermie und Exanthem etc. in dermale Symptome eingruppiert worden.



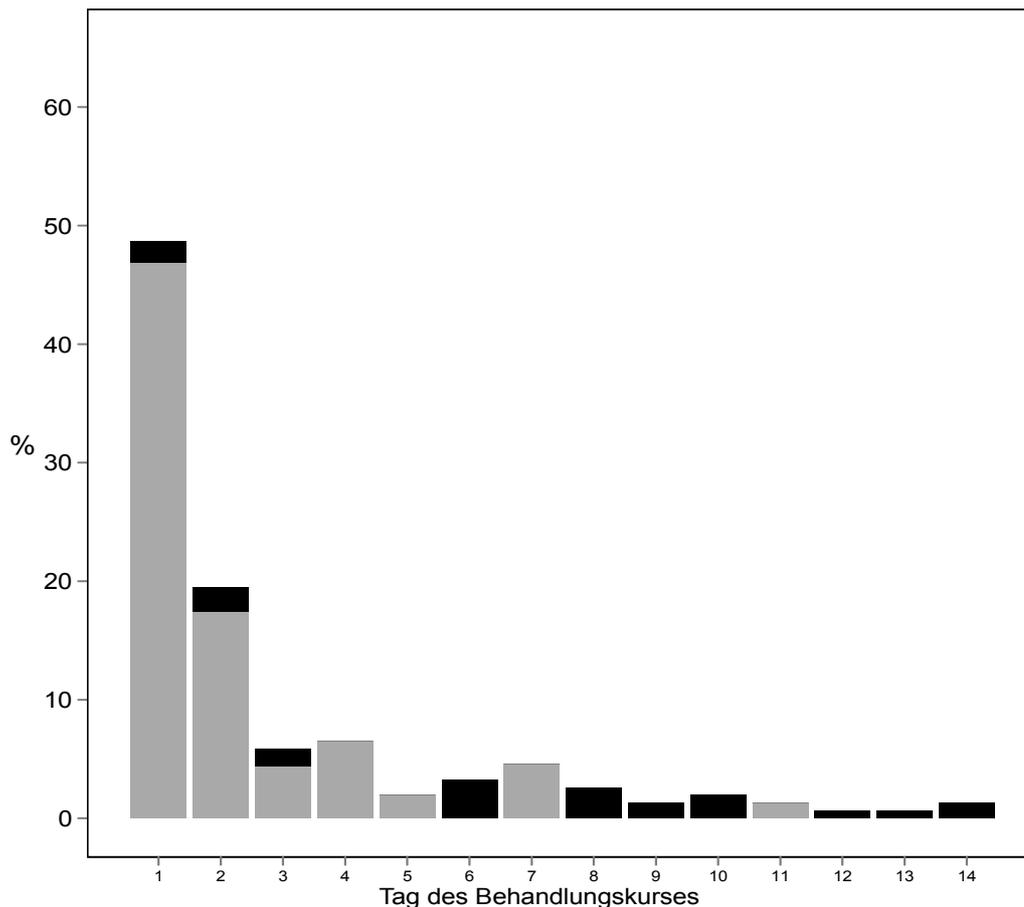
**Abbildung 8: Verteilung der Symptome pro Antibiotikum.**

Berichtet wird für die Gruppe „gesamt“ (N=100) die Verteilung der Symptomgruppen bei den einzelnen Antibiotika. Für jedes Antibiotikum wird der Anteil der Symptomgruppen an allen Symptomen bei HRPAs gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum angegeben. Die Anteile addieren sich daher für jedes Antibiotikum zu 100%.

#### 4.1.5. Zeitlicher Verlauf der HRPAs

Die dargestellten Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der HRPAs basieren auf der Auswertung der Gruppe „gesamt“ (N=100). Es wurde der zeitliche Zusammenhang des Auftretens des Symptoms der Reaktion mit der Infusion des Antibiotikums analysiert. Dabei zeigte sich, dass 53% der Reaktionen während der Verabreichung des Antibiotikums auftraten, 35% binnen einer Stunde nach der Infusion und 12% später als eine Stunde nach der Infusion. Hierbei wurde nicht nach dem Tag der Infusion innerhalb

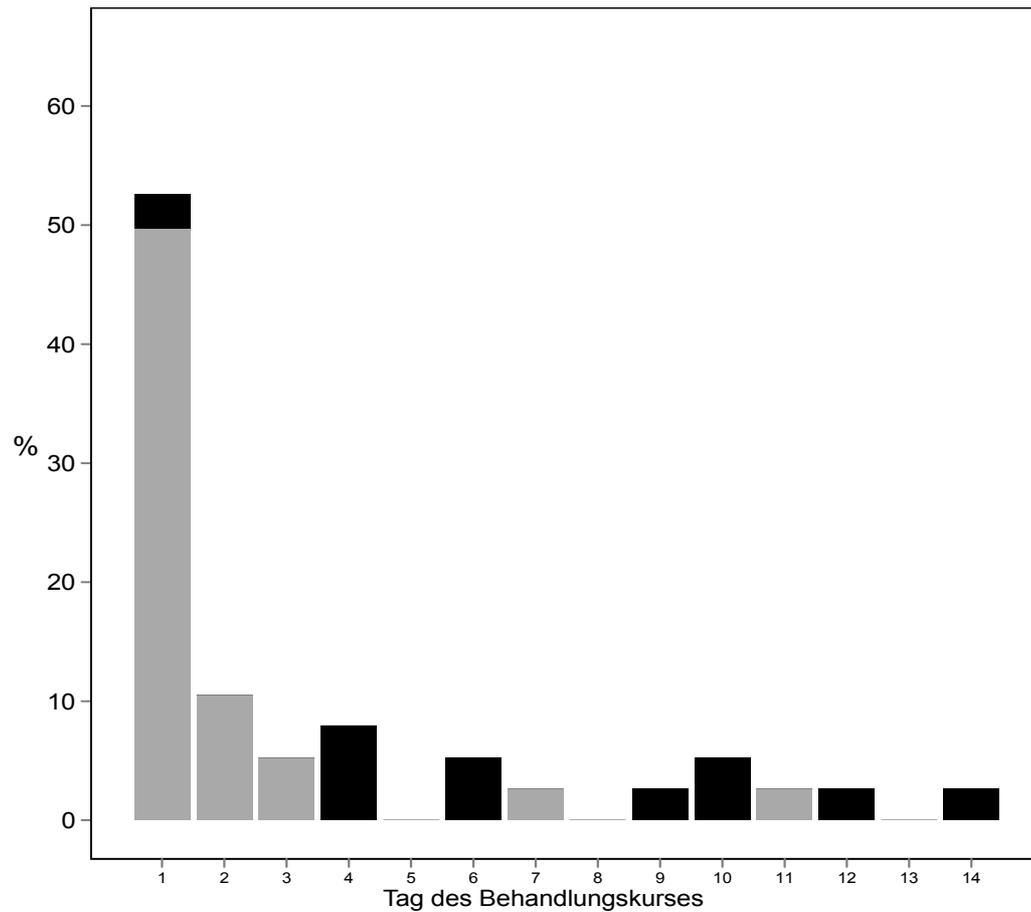
des Behandlungskurses differenziert. Betrachtete man hingegen das Auftreten der Reaktion in zeitlichem Zusammenhang mit dem Tag des Behandlungskurses, dann traten 81% aller Reaktionen, 84% der schweren Reaktionen und 80% der anaphylaktischen Reaktion zwischen dem ersten und vierten Tag des Behandlungskurses auf. Für eine detaillierte Analyse der Anteile der HRPAs in Abhängigkeit des Behandlungstages siehe Abbildung 9 - 11.



**Abbildung 9: Anteil der HRPAs in Abhängigkeit des Behandlungstages.**

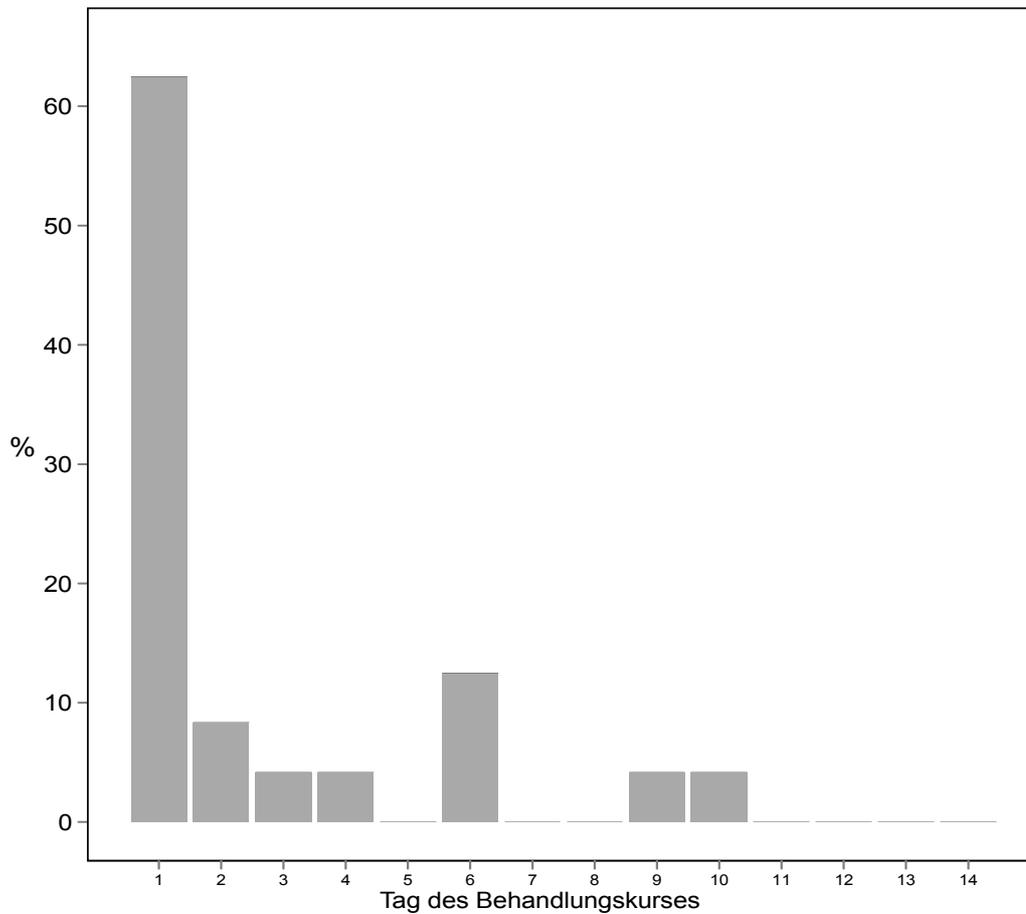
Für die Gruppe „gesamt“ ( $N=100$ ) ist für alle HRPAs dokumentiert, an welchem Behandlungstag die Reaktion aufgetreten ist. Die Höhe des Balkens insgesamt (also grauer und schwarzer Anteil) zeigt den Anteil aller HRPAs in Prozent an den einzelnen Behandlungstagen. Die Höhe aller Balken addieren sich entsprechend zu 100%.

Der schwarze Teil des Balkens stellt dabei den Anteil der HRPAs dar, der non-immediate, also später als eine Stunde nach Gabe des Antibiotikums, zu beobachten war. Der graue Teil des Balkens stellt entsprechend den Anteil der HRPAs dar, der immediate, also bei Gabe des Antibiotikums bzw. innerhalb einer Stunde nach Gabe, zu beobachten war.



**Abbildung 10: Anteil der schweren HRPAs in Abhängigkeit des Behandlungstages.**

Für die Gruppe „gesamt“ ( $N=100$ ) ist für nur die schweren HRPAs dokumentiert, an welchem Behandlungstag die Reaktion aufgetreten ist. Die Höhe des Balkens insgesamt (also grauer und schwarzer Anteil) zeigt den Anteil aller schweren HRPAs an den einzelnen Behandlungstagen. Die Höhe aller Balken addieren sich entsprechend zu 100%. Der schwarze Teil des Balkens stellt dabei den Anteil der schweren HRPAs dar, der non-immediate, also später als eine Stunde nach Gabe des Antibiotikums, zu beobachten war. Der graue Teil des Balkens stellt entsprechend den Anteil der schweren HRPAs dar, der immediate, also bei Gabe des Antibiotikums bzw. innerhalb einer Stunde nach Gabe, zu beobachten war. Definition schwere HRPAs: Beteiligung von bronchopulmonalem und/oder kardiovaskulärem System.



**Abbildung 11: Anteil der anaphylaktischen HRPAs in Abhängigkeit des Behandlungstages**

Für die Gruppe „gesamt“ ( $N=100$ ) ist für die anaphylaktischen HRPAs dokumentiert, an welchem Behandlungstag die Reaktion aufgetreten ist. Die Höhe des grauen Balkens zeigt den Anteil aller anaphylaktischen HRPAs an den einzelnen Behandlungstagen. Die Höhe der Balken addieren sich entsprechend zu 100%. Zur Definition einer anaphylaktischen HRPAs wurden die Kriterien der WAO herangezogen. (Simons et al. 2011).

#### 4.1.6. Risikofaktoren für HRPAs

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zu Risikofaktoren der HRPAs basieren auf der Auswertung der Gruppe „Lebenslang“ ( $N=50$ ). In einer univariaten Analyse wurden folgende Risikofaktoren für HRPAs als signifikant identifiziert: reduzierte FEV<sub>1</sub>, lange Dauer der PA-Besiedlung und die Anzahl der Jahre mit intravenösen antibiotischen Behandlungen. Im Gegensatz dazu waren der  $\Delta F508$  Genotyp, das Geschlecht und Marker der Atopie, wie zum Beispiel ein Standard-IgE-Screeningtest für Aeroallergene und die Gesamt IgE Konzentration im Serum keine signifikanten Risikofaktoren. Die Anzahl von antibiotischen Behandlungskursen und dichotomer Variablen wie „kleiner 20

Behandlungskurse“ unterschieden sich nicht signifikant zwischen Patientengruppen mit und ohne HRP. Für die Analyse von allen HRP in einem multivariaten Regressionsmodell zeigten sich keine signifikanten Risikofaktoren außer der Variablen Dauer der PA-Besiedlung (siehe Tabelle 7).

Für die Analyse von schweren HRP zeigten sich ausgeprägtere Ergebnisse. Folgende Faktoren waren signifikante Prädiktoren für HRP: Weibliches Geschlecht, reduzierte FEV1 und lange Dauer der PA-Besiedlung. Die Hinzunahme der Variablen “Anzahl der antibiotischen Behandlungskurse“ verbesserte die Schätzung nicht. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der beiden logistischen Regressionsanalysen für das Risiko, HRP oder schwere HRP zu entwickeln, dargestellt.

**Tabelle 7: Risikofaktoren der HRP: Regressionsergebnisse**

<b>Variable</b>	<b>p-Wert alle HRP</b>	<b>p-Wert nur schwere HRP</b>
Dauer der PA-Besiedlung (Jahre)	<b>0,0399</b>	<b>0,0324</b>
reduzierte FEV1	0,5947	<b>0,0259</b>
Weibliches Geschlecht	0,1023	<b>0,0375</b>
Steigendes Alter (stetige Variable)	0,2848	0,3376
Anzahl Jahre Antibiotischer Behandlung	0,9130	0,7301
Anzahl Behandlungskurse	0,4621	0,4801
Allergie Screen +	0,6791	0,7501

*Dargestellt ist für die Gruppe „lebenslang“ (N=50) die p-Werte der logistischen Regression zur Identifikation der Risikofaktoren für das Auftreten einer HRP bzw. einer schweren HRP. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt. Allergie screen + = Standard IgE-Screeningtests für Aeroallergene positiv.*

#### 4.1.7. Kumulative Dosis als Risikofaktor für HRP A

Die dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung der Gruppe “Lebenslang” (N=50). Es wurde sowohl die Lebenszeitdosis als auch die kumulative Dosis pro Zeiteinheit als Risikofaktor für HRP A untersucht. Die Lebenszeitdosis wurde dabei definiert als insgesamt dokumentierte Menge des verabreichten Antibiotikums. Die kumulative Dosis pro Zeiteinheit hingegen maß für Patienten mit HRP A die Dosis pro Jahr bis zur ersten Reaktion gegenüber dem spezifischen Antibiotikum. Bei Patienten ohne HRP A maß die kumulative Dosis pro Jahr die Menge pro Jahr, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums verabreicht wurde.

Die Ergebnisse der Beobachtungsstudie zeigten, dass sich Patienten mit und ohne HRP A nicht signifikant hinsichtlich der Lebenszeitdosis der beiden am häufigsten verabreichten *antipseudomonalen* Antibiotika Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam unterschieden. Die kumulative Dosis pro Zeiteinheit der einzelnen Antibiotika war jedoch signifikant höher bei den von HRP A betroffenen Patienten, als bei Patienten ohne HRP A. Tabelle 8 stellt die Ergebnisse zur kumulativen Dosis pro Jahr und die Lebenszeitdosis als Risikofaktoren dar.

**Tabelle 8: Kumulative Dosis als Risikofaktor**

Betroffene Patienten*	Patienten	Lebenszeitdosis	p-Wert	Kumulierte Dosis /Jahr	p-Wert
N=48 Cefotaxim	mit	876	0,92	106	<b>0,012</b>
	ohne	860		62	
N=43 Pip/ Taz	mit	366	0,063	235	<b>0,011</b>
	ohne	702		107	

Pip/Taz = Piperacillin/Tazobactam; mit: mit HRP A; ohne: ohne HRP A

Lebenszeitdosis: Angabe in g

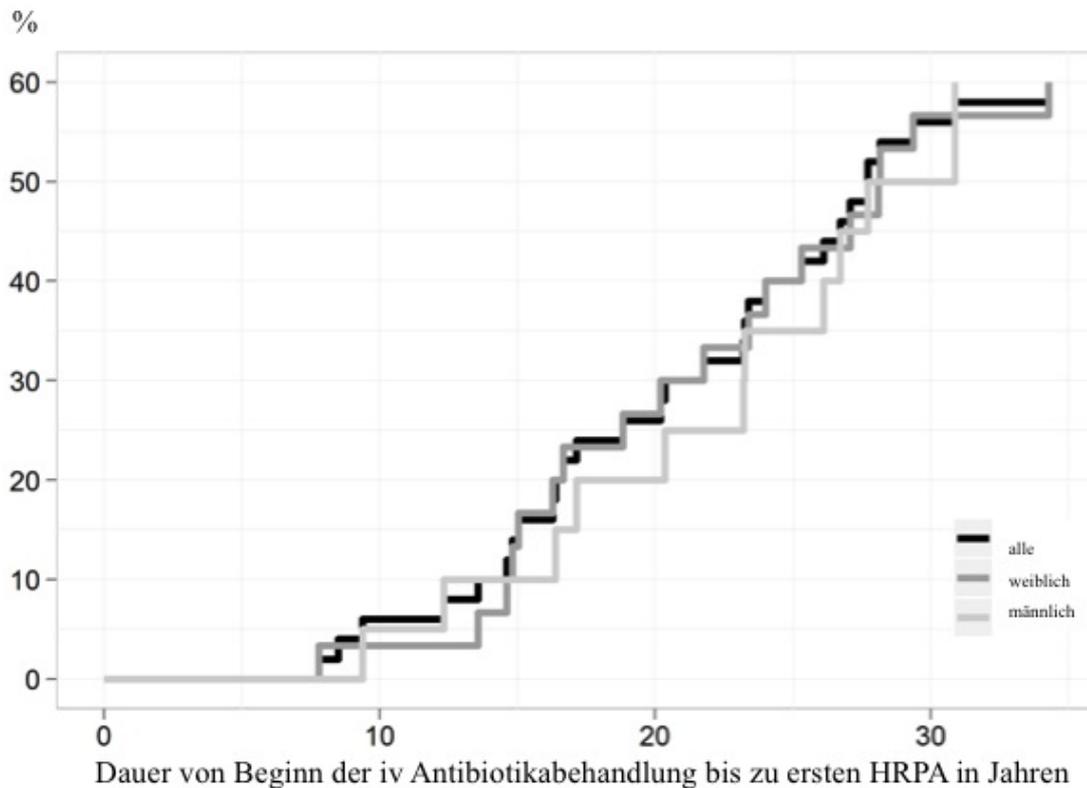
Kumulierte Dosis/Jahr = Median der kumulierten Dosis pro Jahr bis zur ersten HRP A (bei Patienten mit HRP A) bzw. bis zum Ende des Beobachtungszeitraum (bei Patienten ohne HRP A), Angabe in Gramm

\* analysiert wurden die beiden absolut am meisten HRP A auslösenden *antipseudomonalen* Antibiotika

#### **4.1.8. Auftreten von HRPAs in Bezug auf den Beginn der antibiotischen Behandlung**

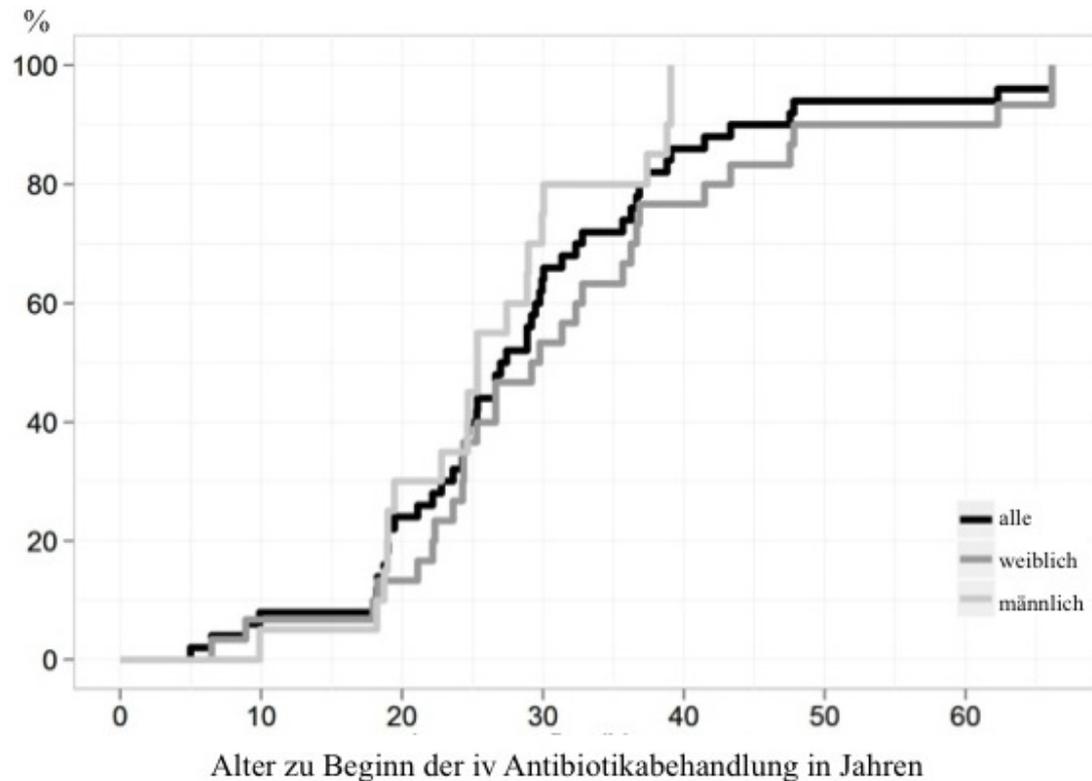
Die dargestellten Ergebnisse basieren auf der Auswertung der Gruppe "Lebenslang" (N=50). Das Durchschnittsalter der Patienten zu Beginn der intravenösen Behandlung mit Antibiotika war 12,9 Jahre (Standardabweichung 11,6) (siehe Abbildung 13). Für die Subgruppe der Patienten mit mindestens einer HRPAs (N=31) war das Durchschnittsalter zu Beginn der Behandlung ebenfalls 12,9 Jahre (Standardabweichung 10,3). Die durchschnittliche Dauer von Beginn der ersten intravenösen Antibiotikaexposition bis zur ersten Reaktion waren 8,4 Jahre (Standardabweichung 5,6), siehe dazu Abbildung 12.

Für Patienten mit zwei oder mehr HRPAs lag das Durchschnittsalter bei der ersten Reaktion bei 13,7 Jahre (Standardabweichung 8,2). Die Dauer vom Beginn der intravenösen Antibiotikaexposition bis zur ersten Reaktion lag durchschnittlich bei 7,1 Jahren (Standardabweichung 5,1). Im Durchschnitt lagen zwischen der ersten und zweiten Reaktion 2,2 Jahre (Standardabweichung 2,7). Die Zeit von Beginn der Antibiotikaexposition bis zur ersten Reaktion war signifikant kleiner ( $p < 0,001$ ) als die Zeit zwischen der ersten und zweiten Reaktion.



**Abbildung 12: Verteilung der Dauer von Beginn der iv Antibiotikabehandlung bis zu ersten HRP**

*In Abbildung 12 wird die Verteilung der Dauer in Jahren von der ersten parenteralen Behandlung bis zur ersten HRP dargestellt. So haben 20 Jahre nach Beginn der parenteralen Antibiotikabehandlungen 30% aller Patienten mindestens eine HRP gehabt und 30 Jahre nach Beginn 50% der Patienten.*



**Abbildung 13: Altersverteilung zu Beginn der iv Antibiotikabehandlung**

Abbildung 13 zeigt die Verteilung des Alters bei welchem mit der parenteralen Antibiotikabehandlung begonnen wurde. So waren beispielsweise 5% der Patienten bei Beginn der Behandlung 10 Jahre oder jünger und ca. 30% der Patienten 18 Jahre oder jünger.

#### 4.1.9. Therapeutische Strategien bei HRP A

Von den 3205 ausgewerteten Behandlungskursen wurden bei 34 Fällen entweder vorbeugende Medikamente in Form von Antihistaminika und/oder Corticosteroiden (N=20) gegeben oder Schnelldesensibilisierungen (N=14) (Legere et al. 2009) angewendet. Hiermit sollte das Risiko für erneute HRP A bei anamnestisch bereits vorliegenden HRP A gesenkt werden. Insgesamt führten neun von 34 Behandlungen erneut zu Reaktionen. Vier von den vorbeugenden Medikamentengaben und fünf von den durchgeführten Schnelldesensibilisierung führten zu erneuten HRP A.

## 4.2. Pilotstudie

### 4.2.1. BAT

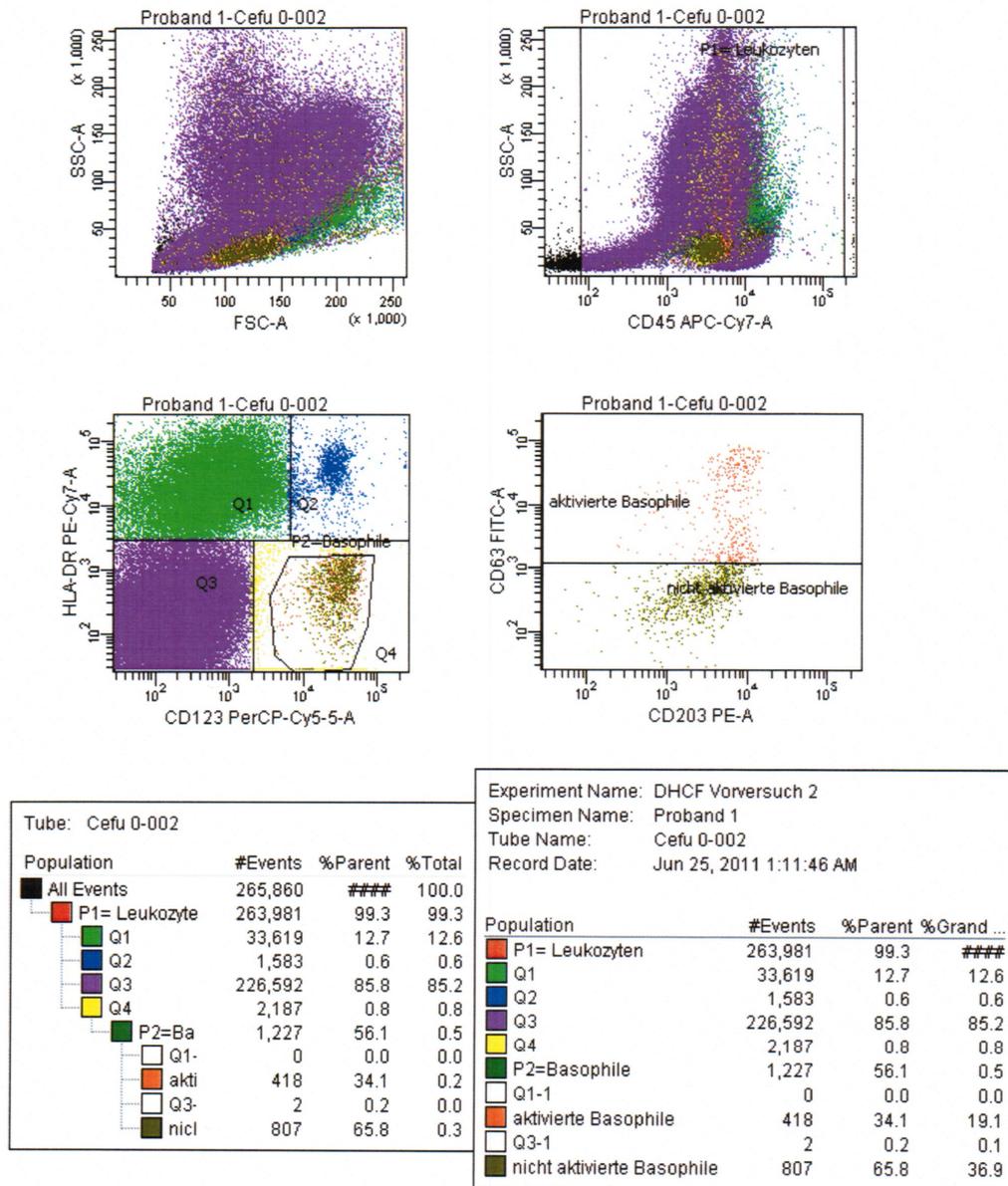
Insgesamt konnten bei fünfzehn Personen, davon dreizehn Patienten mit Mukoviszidose und anamnestisch bekannten HRPA sowie bei zwei Probanden BATs durchgeführt werden. Die Messungen wurden pro Person für diejenigen Medikamente durchgeführt, die in der Beobachtungsstudie zu HRPA führten. Pro Person wurden am Flowcytometer zwei Positiv- und eine Negativkontrolle gemessen. Darüber hinaus wurden pro Person und Medikament sechs Messungen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Durchführung der BATs ergab drei positiv gewertete Befunde, d.h. es wurden Aktivitätsindizes größer gleich 2,5 gemessen. Positive Befunde wurden bei Patient 6 (AI 3,1) und Patient 8 (AI 2,7), jeweils bei der Messung mit Piperacillin/Tazobactam gefunden. Angegeben wurden jeweils der maximale AI für die Verdünnungsreihe. Bei einer nicht-CF Probandin mit der klinischen Anamnese einer anaphylaktischen Reaktion gegen Cefuroxim sah man einen maximalen Aktivierungsindex von 12,5 im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese starke Aktivierung konnte bereits in einer  $10^{-2}$ -fachen Verdünnung der empfohlenen therapeutischen Serumkonzentration beobachtet werden. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Basophilenaktivierungstests dargestellt.

**Tabelle 9: Ergebnisse der Basophilenaktivierungstests**

DHCF Nummer	Medikament BAT (Aktivierungsindex)				
Proband 1	Cefuroxim (0,5)				
Proband 2		Unacid (0,3)			<b>Cefuroxim 12,5</b>
Patient 1	Ceftazidim (0,4)	Piperacillin/ Tazobactam (0,9)	Meropenem (1,0)	Sulbactam (2,2)	
Patient 2	Piperacillin/ Tazobactam (1,3)	Sulbactam (1,0)			
Patient 3	Piperacillin/ Tazobactam (2,1)	Unacid (0,8)			
Patient 4	Caspofungin (0,8)	Ceftazidim (0,6)			
Patient 5	Piperacillin/ Tazobactam (0,8)	Ceftazidim (0,8)	Cefuroxim (0,9)	Cefepim (0,6)	
Patient 6		Colistin (1,9)	Tobramycin (1,3)		<b>Piperacillin/ Tazobactam (3,1)</b>
Patient 7	Piperacillin/ Tazobactam (1,5)	Ceftazidim (1,5)	Cefepim (1,8)	Aztreonam (2,3)	
Patient 8		Ceftazidim (1,2)	Meropenem (2,0)	Cefepim (1,3)	<b>Piperacillin/ Tazobactam (2,7)</b>
Patient 9	NA				
Patient 10	Colistin (1,7)	Ceftazidim (1,3)			
Patient 11	Piperacillin/ Tazobactam (2,0)	Ceftazidim (1,0)	Cefepim (1,5)		
Patient 12	Piperacillin/ Tazobactam (0,5)	Cefepim (0,3)			
Patient 13	Piperacillin/ Tazobactam (0,7)				

Die Tabelle 9 stellt für jeden Patienten/Probanden die Ergebnisse der durchgeführten BATs dar. In der Spalte „Medikament“ werden die pro Patient/Proband verwendeten Medikamente aufgezählt. Der Wert in Klammern gibt den höchsten Aktivierungsindex (AI) je Medikament an. Positiv gewertete Befunde (AI > 2,5) werden fett dargestellt.

FACSDiva Version 6.1.3



**Abbildung 14: Beispiel eines positiven BAT**

*Aktivierung von 34% der basophilen Granulozyten nach Inkubation mit Cefuroxim in  $10^{-2}$ -facher Konzentration der therapeutischen Serumkonzentration.*

### 4.2.2. LTT

Die LTTs wurden bei dreizehn Patienten mit Mukoviszidose durchgeführt. Wiederum wurde für diejenigen Medikamente getestet, für die die Patienten in der Beobachtungsstudie HRP A aufwiesen. Die LTTs produzierten mit insgesamt sieben signifikanten Proliferationen deutlich mehr positive bzw. grenzwertige Befunde (Stimulationsindex  $\geq 2$  grenzwertig;  $\geq 3$  positiv) als der BAT.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Lymphozytentransformationstests dargestellt.

**Tabelle 10: Ergebnisse der Lymphozytentransformationstests**

DHCF Nummer	Medikament (Stimulationsindex-Mittelwert)			
Patient 1	Piperacillin/ Tazobactam (1,1)	Ceftazidim (0,7)	Meropenem (1,0)	<b>Sulbactam (8,7)</b>
Patient 2	NA	NA		
Patient 3	Piperacillin/ Tazobactam (0,8)	Unacid (1,4)		
Patient 4	Casposfungin (0,8)	Ceftazidim (1,1)		
Patient 5	Piperacillin/ Tazobactam (0,4)	Ceftazidim (0,6)	Cefuroxim (0,5)	Cefepim (0,8)
Patient 6	Piperacillin/ Tazobactam (1,3)	Colistin (1,0)	Tobramycin (1,1)	
Patient 7	Piperacillin/ Tazobactam (1,0)	Ceftazidim (1,2)	Aztreonam (1,8)	<b>Cefepim (3,0)</b>
Patient 8	Meropenem (1,3)	<b>Ceftazidim (2,1)</b>	<b>Piperacillin/ Tazobactam (76,6)</b>	<b>Cefepim (10,5)</b>
Patient 9	NA			
Patient 10	Colistin (1,6)	Ceftazidim (1,1)		
Patient 11		Cefepime (1,9)	Ceftazidim (1,2)	<b>Piperacillin/ Tazobactam (2,2)</b>
Patient 12	Piperacillin/ Tazobactam (1,1)			<b>Cefepime (2,4)</b>
Patient 13	Piperacillin/ Tazobactam (1,0)			

\*SI = Stimulationsindex

Die Tabelle 10 stellt für jeden Patienten/Probanden die Ergebnisse der durchgeführten LTTs dar. In der Spalte „Medikament“ werden die pro Patient/Proband verwendeten Medikamente aufgezählt. In Klammern steht der höchste mittlere SI des LTTs der Verdünnungen des jeweiligen Medikaments. Positive und grenzwertige Befunde ( $SI > 2$ ) werden fett dargestellt.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Beobachtungsstudie**

#### **5.1.1. Überblick**

Überempfindlichkeitsreaktionen auf parenteral verabreichte Antibiotika (HRPA) bei Patienten mit Mukoviszidose (CF) sind aus klinischer Perspektive hoch relevant. Patienten mit fortgeschrittener CF und dem dringenden Bedarf an wiederholten intravenösen antibiotischen Behandlungen leiden am häufigsten unter HRPA. Dies hat regelmäßig Unterbrechungen oder Veränderungen der antiinfektiven Therapie zur Folge, so dass die Behandlungen insuffizient sein können. HRPA scheinen bei Patienten mit Mukoviszidose häufiger als in der Gesamtbevölkerung zu sein (Torres & Blanca 2010). In der beobachteten Patientengruppe lag die Prävalenz von mindestens einer HRPA bei 60% und damit höher als in früheren Studien zu Mukoviszidose, bei denen die Überempfindlichkeit auf Antibiotika untersucht wurde: 29% bei Pleasants et al. (Pleasants et al. 1994), 33 % bei Wills et al. (Wills et al. 1998), 36% bei Burrows et al. (Burrows et al. 2007). Koch et al. (Koch et al. 1991) zeigten mit 61% eine ähnlich hohe Prävalenz wie in der vorliegenden Studie. Beim Vergleich der aufgeführten Studien mit der vorliegenden sollte berücksichtigt werden, dass sich die Einschlusskriterien und die Definition von HRPA deutlich unterscheiden und Vergleiche damit nur eingeschränkt möglich sind. Trotz dieser Einschränkung hatten unsere Patienten im direkten Vergleich mit der Studie von Koch et al. fast zweimal so viele Reaktionen pro Kopf (3,1 vs. 1,7). Berücksichtigt man, dass die Studie von Koch et al. aus dem Jahr 1991 stammt, unterstreicht dies die Aussage, dass HRPA ein zunehmendes Problem in der Behandlung von fortgeschrittener CF darstellen.

#### **5.1.2. Zeitlicher Verlauf der HRPA**

In der vorliegenden Studie traten 81% aller HRPA, 84% der schweren und 80% der anaphylaktischen HRPA während der ersten vier Tage des Behandlungskurses auf. Diese Resultate sind wichtig für ambulante parenterale Antibiotikabehandlungen der Patienten. Die stationäre Aufnahme zu Beginn der antibiotischen Behandlung bei gefährdeten Patienten könnte die Sicherheit der Behandlungen steigern, da Reaktionen häufig sofortige Behandlung erfordern.

Der große Anteil von HRPAs am ersten Tag der Behandlung während der Infusion bzw. bis einer Stunde nach Infusion könnte einen signifikanten Anteil von IgE bedingten Reaktionen suggerieren. Auch in der vorliegenden Studie waren, wie bereits in der Vergangenheit veröffentlicht (Wills et al. 1998; Koch et al. 1991; Burrows et al. 2007; Pleasants et al. 1994), Hautsymptome, wie Urtikaria und Juckreiz am häufigsten, die nach allergologischem Verständnis am ehesten zu den IgE-vermittelten Reaktionen zählen. Die negativen BATs unserer Pilotstudie und die Erfahrung, dass Hauttests eine niedrige Sensitivität für die Diagnostik von HRPAs bei Patienten mit CF im Gegensatz zu Patienten mit Betalactamallergie ohne CF haben (Whitaker et al. 2012) steht allerdings im Gegensatz dazu. Nach Einschätzung des Autors ist es auch möglich, dass IgE vermittelte Allergien eine untergeordnete Rolle bei dem Phänomen darstellen. Für das Auftreten von HRPAs und für das große Spektrum von Symptomen mit unterschiedlichen Zeitpunkten des Auftretens können auch andere immunologische oder nicht-immunologische Mechanismen verantwortlich sein. Einer dieser nicht-immunologischen Mechanismen könnte die direkte Freisetzung von Histaminen - auch Pseudoallergie genannt - sein (Bircher 1999). Diese wurde vor allem für Vancomycin ("red-man-syndrom") und Ciprofloxacin beschrieben. Ein weiteres häufiges Symptom war Medikamentenfieber ("drug-fever"). Medikamentenfieber hatte in der vorliegenden Studie einen Anteil von 10% an allen Reaktionen und eine Tendenz spät im Laufe der Behandlungskurse aufzutreten (Wills et al. 1998; Pleasants et al. 1994; Burrows et al. 2007; Koch et al. 1991). Spät in den Behandlungskursen traten deutlich weniger Reaktionen auf, diese allerdings mit einer größeren Variabilität von Symptomen im Sinne von zellulären, späten Überempfindlichkeitsreaktionen (Romano et al. 2004; Pichler 2003; Whitaker et al. 2012). Die Beobachtung dieser Studie und bisherige Forschungsergebnisse lassen folgende Überlegungen zu:

1. Zellulär vermittelte allergische Reaktionen könnten eine deutlich größere Rolle spielen als IgE-vermittelte Reaktionen.
2. Ein Teil der HRPAs tritt möglicherweise aufgrund von unspezifischen Nebenwirkungen auf und nicht durch spezifische immunologische Mechanismen mit dem Risiko des Wiederauftretens.

Die Beobachtung, dass die Zeit von der ersten bis zur zweiten Reaktion signifikant kürzer war als die Zeit von Beginn der Behandlung bis zur ersten Reaktion wurde in der Vergangenheit auch für Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber Penicillin in der

Allgemeinbevölkerung beschrieben (Sogn 1986). Somit war in der beobachteten Kohorte die erste HRPAs ein Risikofaktor für eine weitere HRPAs. Die Abbildung 12 und die Abbildung 13 beschreiben die Altersverteilung zu Beginn der parenteralen Antibiotikabehandlungen und die Verteilung der Zeit von Beginn der parenteralen Antibiotikabehandlungen bis zur ersten HRPAs. Das immer höher werdende Alter zu Beginn der parenteralen Antibiotikatherapien und die „Vorlaufzeit“ bis zur ersten Reaktion erklärt, warum Kinder und Jugendliche mit milden und normalen Krankheitsverläufen kaum von HRPAs betroffen sind.

### **5.1.3. Risiko der Antibiotika für HRPAs**

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde unter den *antipseudomonalen* Antibiotika ein moderates Risiko für das Auftreten von HRPAs für Cefotaxim und ein höheres Risiko für Piperacillin/Tazobactam und Cefepim beobachtet. Für Aztreonam wurde bemerkenswerterweise ein fast genauso hohes Risiko für das Auftreten von HRPAs wie für Piperacillin/Tazobactam beobachtet. Aztreonam hatte zusätzlich das höchste Risiko für das Auftreten von schweren HRPAs, da fast 6% aller Behandlungskurse mit Aztreonam zu schweren HRPAs führten. Dieses Ergebnis war unerwartet und steht im Gegensatz zu vorherigen Studien (Burrows et al. 2007; Koch et al. 1991; Jensen et al. 1987). Erwähnenswert ist auch, dass alle Patienten, die HRPAs aufgrund Aztreonam erlitten, vorher auch HRPAs gegenüber Cefotaxim aufwiesen (Pérez Pimiento et al. 1998). Diese Beobachtung könnte mit einer identischen Seitenkettenstruktur der Moleküle beider Substanzen erklärt werden (Parmar 2005).

### **5.1.4. Risikofaktoren für HRPAs**

Bezüglich von Risikofaktoren für HRPAs konnte die vorliegende Studie teilweise bisherige Studienergebnisse bestätigen (Burrows et al. 2007; Parmar 2005). In diesen - wie auch in der vorliegenden Studie - wurde gezeigt, dass der  $\Delta F508$  Genotyp und Marker für Atopie keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von HRPAs hatten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Burrows et al. und Koch et al. (Burrows et al. 2007; Koch et al. 1991) konnte anhand der vorliegenden Datengrundlage weder das Alter der Patienten noch die Anzahl der antibiotischen Behandlungskurse als signifikanter Risikofaktor für das Auftreten von HRPAs identifiziert werden. Es wurde hingegen gezeigt, dass die Dauer der PA-Besiedlung ein signifikanter Prädiktor für das Auftreten von HRPAs war. In der weiteren Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Dauer der PA-Besiedlung,

weibliches Geschlecht und niedriges FEV1 Risikofaktoren für das Auftreten *schwerer* HRPAs sind. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass FEV1 und Jahre mit PA-Besiedlung beide die Last der antibiotischen Behandlung pro Zeiteinheit teilweise abbilden. Das weibliche Geschlecht als Risikofaktor könnte durch das “Gender-Gap”-Phänomen (Davis 1999; Chotirmall et al. 2010) zu erklären sein: Da die Erkrankung bei Frauen schneller voranschreitet, ist es wahrscheinlich, dass sie auch eine höhere Exposition gegenüber intravenösen Antibiotika haben.

Im Gegensatz zu der Publikation von Burrows et al. (Burrows et al. 2007) zeigten sich in der vorliegenden Studie weder die komplette Anzahl der Behandlungskurse noch die Lebenszeitdosis spezifischer Antibiotika als signifikante Einflussgröße auf das Risiko von Auftreten von HRPAs. Dennoch zeigte eine Analyse der kumulativen Dosen spezifischer Antibiotika über die Expositionszeit bis zur ersten Reaktion bei Patienten mit HRPAs bzw. bis zum Ende der Beobachtung bei Patienten ohne HRPAs signifikante Ergebnisse: Für die beiden am häufigsten dokumentierten Antibiotika (Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam) war die kumulative Dosis des Antibiotikums pro Zeiteinheit signifikant höher unter den Patienten, die auf dieses Medikament reagierten, als bei den Patienten, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nicht auf das Antibiotikum reagierten. Der Fokus wurde auf die kumulative Dosis anstatt auf die Anzahl der Behandlungskurse gelegt, weil die Behandlungskurse sich sehr in Länge und täglicher Dosis unterscheiden können. Unsere Erkenntnisse könnten im Einklang mit einem in der Vergangenheit gemachten Hinweis stehen (Ramesh 2002). Hier wird formuliert, dass die wiederholte spezifische Exposition mit intravenösen Antibiotika das Risiko für HRPAs steigern könnte. Die vorliegenden Ergebnisse suggerieren, dass HRPAs durch eine spezifische, von der kumulativen Dosis abhängige, Sensibilisierung auftreten.

### **5.1.5. Stärken und Schwächen der Beobachtungsstudie**

Folgende Stärken und Schwächen der Beobachtungsstudie sollten berücksichtigt werden: Wir konnten komplette Datensätze über die gesamte Lebenszeit von 50 Patienten über intravenöse Antibiotikaexposition und HRPAs aufzeichnen. Diese 50 Patienten wurden von Geburt an ausschließlich in unserem Zentrum behandelt, was Follow-up Perioden von bis zu 25 Jahren bei einzelnen Patienten ermöglicht hat. Es ist nicht möglich, vergleichbare Daten über Antibiotikaexposition in einer prospektiven klinischen Studie zu gewinnen.

Zusätzlich wurden alle von den Patienten berichteten HRPAs in den medizinischen Akten verifiziert. Bei den Patienten ohne lebenslange Dokumentation in unserem Zentrum mussten wir auf Interviewdaten vertrauen, um vorherige (nicht dokumentierte) Antibiotikaexposition und HRPAs zu erfassen. Bei diesen Patienten könnte ein sogenannter Recall-Bias ein ernstzunehmendes Problem sein. Um diesem Problem zu begegnen, wurde die Studienpopulation in Anlehnung an die Vollständigkeit der Daten in den medizinischen Akten klassifiziert. Die Lebenszeitexposition gegenüber intravenösen Antibiotika wurde demnach auch nur für Patienten mit vollständiger, lebenslanger Dokumentation ausgewertet. Dies führte allerdings für die Auswertung der lebenslangen Antibiotikaexposition zu einer Halbierung der Stichprobe. Aus diesem Grund wurden für die Berechnung der kumulativen Dosis pro Zeiteinheit für spezifische Antibiotika als Risikofaktor nur für Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam hinreichend große Stichproben für die Auswertung erreicht.

Aufgrund von heutzutage immer gesünderen pädiatrischen Patienten mit CF und dementsprechend auch weniger intravenösen antibiotischen Behandlungen, konnten nur acht Patienten unter 18 Jahre in die Beobachtungsstudie eingeschlossen werden.

In der vorliegenden Studie zeigte sich HRPAs als ein diffuses klinisches Phänomen, mit einem breiten Spektrum von Symptomen und einer Reihe von möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismen. Mit der Schwierigkeit konfrontiert, zwischen Überempfindlichkeitsreaktionen und unspezifischen Nebenwirkungen zu unterscheiden, wurde entschieden, zunächst alle Symptome zu erheben, die dazu führten, dass ein Patient als überempfindlich gegenüber einem Antibiotikum bezeichnet wurde. Die Mehrzahl der beobachteten Symptome ist allerdings in den "WAO guidelines for anaphylaxis" aufgelistet (Simons et al. 2011). Dementsprechend wurde in Kauf genommen, dass unspezifische Nebenwirkungen unter Umständen mit erhoben wurden. Dies muss als Einschränkung der vorliegenden Studie gewertet werden, da somit möglicherweise die Häufigkeit von HRPAs überschätzt wird. Andererseits kann dies auch als Stärke bezeichnet werden, da die Daten ohne vorherige Selektion ergebnisoffen gesammelt wurden.

## **5.2. Pilotstudie**

### **5.2.1. BAT als diagnostisches Verfahren bei Überempfindlichkeit gegen parenterale Antibiotika**

Ziele der Pilotstudie waren einerseits, die Testverfahren BAT und LTT für den Einsatz mit Medikamenten bzw. Antibiotika in unserem Labor erstmalig zu etablieren und andererseits, die diagnostische Wertigkeit der Tests für Patienten mit CF, die unter HRPAs gegen multiple Antibiotika leiden, zu untersuchen. Die Etablierung der Verfahren wurde erfolgreich durchgeführt. Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten wir mittels BAT eine IgE vermittelte Allergie vom Soforttyp gegen Cefuroxim bei einer Probandin, die nicht an CF leidet, eindeutig nachweisen. Weiter konnten wir bei zwei von dreizehn Patienten, die anamnestisch HRPAs erlitten hatten, einen positiven Aktivierungsindex für Basophile nachweisen. Aufgrund der kleinen Stichprobe und in der Pilotstudie nicht eliminierten Störfaktoren wie z.B. Therapie mit Glucocorticoiden bzw. Antihistaminika im Rahmen einer pulmonalen Exazerbation und aufgrund der Tatsache, dass die Blutentnahmen nicht zu einem standardisierten Zeitpunkt während der Antibiotikatherapien stattfanden, lassen sich nach gegenwärtigen Untersuchungsstand noch keine eindeutigen Schlüsse ziehen. In Erwägung zu ziehende Interpretationen für die Tatsache, dass nur bei zwei von dreizehn Patienten jeweils ein positiver Befund festgestellt werden konnte, könnte einerseits ein geringer Anteil an IgE vermittelten allergischen Reaktionen vom Soforttyp sein. Dies steht allerdings im Gegensatz zu den am häufigsten in der Beobachtungsstudie dokumentierten Symptomen wie Juckreiz, Exanthem und Urticaria. Eine weitere mögliche Interpretation könnte sein, dass der verwendete BAT für diese Fragestellung nicht ausreichend sensitiv ist.

Um diese wichtige Frage zu klären, bedarf es einer Studie mit einer deutlich höheren Fallzahl, ggf. multizentrisch aufgebaut. Zusätzlich sollten die oben genannten Störfaktoren minimiert werden.

### **5.2.2. LTT als diagnostisches Verfahren bei Überempfindlichkeit gegen parenterale Antibiotika**

Die Ergebnisse der LTT Untersuchungen führten zu positiven Stimulationsindizes für sieben Medikamente bei fünf von 13 Patienten und deckten sich im Wesentlichen mit den klinischen Erkenntnissen aus der Beobachtungsstudie. Dieses Ergebnis ist gut vereinbar

mit diversen Publikationen (Whitaker et al. 2012; Jenkins et al. 2013; El-Ghaiesh et al. 2012), die während und nach Durchführung unserer Studie veröffentlicht wurden. Offensichtlich tragen antibiotikaspezifische T-Zellen zu der Entstehung von HRPAs bei. Auch für die LTT lässt sich aus unseren Daten aufgrund der geringen Stichprobe und des möglichen Einflusses von Störfaktoren keine Aussage über Sensitivität und diagnostischen Nutzen treffen. Es bedarf auch hier einer Studie mit einer deutlich höheren Fallzahl, ggf. multizentrisch aufgebaut, mit minimierten Störfaktoren.

Der Autor ist der Ansicht, dass diese Ergebnisse die diagnostischen Möglichkeiten der beiden zellulären Allergietestmethoden für diese Indikation noch nicht im vollen Ausmaß wiedergeben, da wie bereits erwähnt zum Teil mehrere Störfaktoren während der Pilotstudie, wie die Einnahme von Steroiden bzw. von Antihistaminika oder Behandlungen pulmonaler Exazerbationen mit anderen parenteralen Antibiotika zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorlagen. Dies ließ sich nicht verhindern, da die Patienten in der Regel zum Zeitpunkt einer klinischen Exazerbation rekrutiert wurden und somit die klinische Symptomverbesserung und nicht die Studienteilnahme, im Vordergrund der Behandlung standen.

### **5.3.     Ausblick**

Zusammenfassend ist das häufige Auftreten von HRPAs, wie in der vorliegenden Beobachtungsstudie gezeigt, ein ernstzunehmendes Problem, insbesondere vor dem Hintergrund der daraus resultierenden Einschränkungen der antibiotischen Behandlung von zukünftigen Exazerbationen durch multiresistente gram-negative Bakterien (Ren et al. 2012). Eine aus den vorliegenden Ergebnissen möglicherweise resultierende Strategie für die Vorbeugung von HRPAs, die allerdings der Bestätigung durch weitere Studien bedarf, wäre eine Rotation der *antipseudomonalen* Wirkstoffe, anstatt einer Wiederholung der gleichen Behandlungsregimes, die in der Vergangenheit gut toleriert wurden, um so die spezifische kumulative Dosis pro Zeiteinheit und Antibiotikum zu reduzieren. Dies wäre selbstverständlich nur unter Berücksichtigung der mikrobiologischen Gegebenheit durchführbar. Als eine weitere klinische Lösungsstrategie wurden mehrere Desensibilisierungsprotokolle als effektiv publiziert (Whitaker et al. 2011; Burrows et al. 2003; Legere et al. 2009). In der vorliegenden Studie waren allerdings nur 65% (9 von 14) der durchgeführten Desensibilisierungen erfolgreich.

Um Überdiagnosen von HRPAs zu reduzieren, sollten diagnostische Algorithmen, die sich einerseits einfach durchführen lassen und andererseits keine Gefährdung für den Patienten darstellen, für die tägliche klinische Routine entwickelt werden. In den letzten Jahren sind mehrere interessante Arbeiten zum Thema „antibiotikaspezifische Lymphozyten“ bei Patienten mit Mukoviszidose publiziert worden (Jenkins et al. 2013, El-Ghaiesh et al. 2012, Whitaker et al. 2011, Elsheikh et al. 2011). Die Pilotstudie dieser Arbeit konnte leider nur mit einer geringen Fallzahl durchgeführt werden, dennoch zeigt die Studie, dass sich zumindest ein Teil der für HRPAs verantwortlichen Mechanismen mit dem LTT darstellen lässt und demnach T-zellulär bedingt sind. Der Autor ist der Ansicht, dass eine weitere Erforschung der immunologischen Mechanismen von HRPAs bei Patienten mit Mukoviszidose, die sich auch mit Sofort- und Spätreaktionen und deren Diagnostik befassen, notwendig ist. Für dieses Ziel wäre eine größer angelegte Studie mit zellulären Allergietestverfahren, ggf. auch unter Anwendung des Lymphozytenaktivierungstests (LAT) anstatt des Lymphozytentransformationstests sinnvoll. Unter Anwendung des LAT wären Ergebnisse schon nach zwei Tagen anstatt nach sieben Tagen verfügbar. Zusätzlich wäre es sinnvoll, nach den Untersuchungen mit zellulären Allergietests graduelle Provokationen mit den Antibiotika, die jeweils HRPAs auslösten und fortan nicht mehr verabreicht wurden, durchzuführen. Dies wäre für Patienten indiziert, die im BAT/LTT kein eindeutiges Anaphylaxie- bzw. Reaktionsrisiko gezeigt haben. Dies könnte einerseits als diagnostische Provokation, ggf. doppelblind und placebokontrolliert, mit dem beschuldigten Antibiotikum analog zu doppelblinden, placebokontrollierten Nahrungsmittelprovokationen (Sampson et al. 2012), durchgeführt werden. Andererseits wäre auch im Rahmen von Exazerbationsbehandlungen eine Provokation mit einem beschuldigten Antibiotikum denkbar. Bei einer Provokation in dieser Situation müsste auf eine Testung gegen Placebo verzichtet werden. Denkbar wäre ein einfach blinder Vergleich von konventioneller Gabe des beschuldigten Antibiotikums mit der Gabe in Form eines „Rush Hypo“-Protokolls (Legere et al. 2009). Auf diesem Wege ließen sich Daten für klinische Schlussfolgerungen generieren, da die Informationen sowohl die klinische Beobachtung als auch die immunologischen Untersuchungen beinhalten würden.

In der vorliegenden Studie wurde für Patienten mit Mukoviszidose nach Kenntnis des Autoren erstmals gezeigt, dass bei Patienten mit Mukoviszidose die spezifische kumulative Dosis pro Zeiteinheit einen starken Prädiktor für das Entwickeln von HRPDA darstellt. Aufgrund der limitierten Fallzahl bedarf diese Erkenntnis einer Bestätigung durch weitere Studien.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agarwal, R. et al., 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clinical & Experimental Allergy*, 43(8), pp.850–873.
- Andersen, D., 1938. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *American Journal of Diseases of Children*, 56, pp.344–399.
- Aranda, A. et al., 2011. In vitro evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones. *Allergy*, 66(2), pp.247–254.
- Beeler, A. et al., 2008. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy*, 63(2), pp. 181–8.
- Bircher, A.J., 1999. Drug-induced urticaria and angioedema caused by non-IgE mediated pathomechanisms. *European journal of dermatology : EJD*, 9(8), pp.657–63– quiz 663.
- Blanca, M. et al., 2009. Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to betalactams. *Allergy*, 64(2), pp.183–193.
- Borowitz, D. & Gelfond, D., 2013. Intestinal complications of cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*, 19(6), pp.676–680.
- Burrows, J.A. et al., 2007. Beta-lactam allergy in adults with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 6(4), pp.297–303.
- Burrows, J.A., Toon, M. & Bell, S.C., 2003. Antibiotic desensitization in adults with cystic fibrosis. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 8(3), pp.359–364.
- Charmandari, E., Nicolaidis, N.C. & Chrousos, G.P., 2014. Adrenal insufficiency. *Lancet*.
- Chotirmall, S.H. et al., 2010. 17Beta-estradiol inhibits IL-8 in cystic fibrosis by up-regulating secretory leucoprotease inhibitor. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(1), pp.62–72.
- Cohen, T.S. & Prince, A., 2012. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature medicine*, 18(4), pp.509–519.
- Corey, M. et al., 1988. A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *Journal of clinical epidemiology*, 41(6), pp.583–591.
- Darling, R.C. et al., 1953. Electrolyte abnormalities of the sweat in fibrocystic disease of the pancreas. *The American journal of the medical sciences*, 225(1), pp.67–70.
- Davies, J.C., Alton, E.W.F.W. & Bush, A., 2007. Cystic fibrosis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 335(7632), pp.1255–1259.
- Davis, P.B., 1999. The gender gap in cystic fibrosis survival. *The journal of gender-specific medicine : JGSM : the official journal of the Partnership for Women's Health at*

- Columbia*, 2(2), pp.47–51.
- De Boeck, K. et al., 2014. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*.
- Diso, D. et al., 2013. Lung transplantation for cystic fibrosis: outcome of 101 single-center consecutive patients. *Transplantation proceedings*, 45(1), pp.346–348.
- Dodge, J.A. et al., 2007. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 29(3), pp.522–526.
- El-Ghaiesh, S. et al., 2012. Characterization of the antigen specificity of T-cell clones from piperacillin-hypersensitive patients with cystic fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 341(3), pp.597–610.
- Elsheikh, A. et al., 2011. Enhanced antigenicity leads to altered immunogenicity in sulfamethoxazole-hypersensitive patients with cystic fibrosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(6), pp.1543–51.e3.
- Gibson, L.E. & Cooke, R.E., 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 23(3), pp.545–549.
- Heijerman, H. et al., 2009. Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: A European consensus. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 8(5), pp.295–315.
- Henry, R.L., Mellis, C.M. & Petrovic, L., 1992. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 12(3), pp.158–161.
- Hjortlund, J. et al., 2013. Diagnosis of penicillin allergy revisited: the value of case history, skin testing, specific IgE and prolonged challenge. *Allergy*, 68(8), pp.1057–1064.
- Hjortlund, J. et al., 2012. One-week oral challenge with penicillin in diagnosis of penicillin allergy. *Acta dermato-venereologica*, 92(3), pp.307–312.
- Hollander, M. & Wolfe, D.A., 1999. *Nonparametric Statistical Methods, 2nd Edition* 2nd ed., Wiley-Interscience.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S. & Sturdivant, R., 2005. *Applied Logistic Regression* W. A. Shewhart & S. S. Wilks, eds., John Wiley & Sons.
- Jacquot, J., Tabary, O. & Clement, A., 2008. Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert review of molecular diagnostics*, 8(4), pp.359–363.
- Jenkins, R.E. et al., 2013.  $\beta$ -Lactam antibiotics form distinct haptenic structures on albumin and activate drug-specific T-lymphocyte responses in multiallergic patients with cystic fibrosis. *Chemical research in toxicology*, 26(6), pp.963–975.
- Jensen, T. et al., 1987. Aztreonam for cystic fibrosis patients who are hypersensitive to other

- beta-lactams. *Lancet*, 1(8545), pp.1319–1320.
- Kelly, A. & Moran, A., 2013. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 12(4), pp.318–331.
- Kerem, B. et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp.1073–1080.
- Koch, C. et al., 1991. Retrospective clinical study of hypersensitivity reactions to aztreonam and six other beta-lactam antibiotics in cystic fibrosis patients receiving multiple treatment courses. *Reviews of infectious diseases*, 13 Suppl 7, pp.S608–11.
- Konstan, M.W. et al., 2007. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics*, 151(2), pp.134–9– 139.e1.
- Leeuwen, L., Fitzgerald, D.A. & Gaskin, K.J., 2014. Liver disease in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 15(1), pp.69–74.
- Legere, H.J., III et al., 2009. A safe protocol for rapid desensitization in patients with cystic fibrosis and antibiotic hypersensitivity. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 8(6), pp.418–424.
- Leysen, J. et al., 2011. The basophil activation test in the diagnosis of immediate drug hypersensitivity. *Expert review of clinical immunology*, 7(3), pp.349–355.
- Liou, T.G. et al., 2007. Lung transplantation and survival in children with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*, 357(21), pp.2143–2152.
- Liu, J.C., Modha, D.E. & Gaillard, E.A., 2013. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 12(3), pp.187–193.
- Llanes, C. et al., 2013. Diversity of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(8), pp.1763–1771.
- Loubières, Y. et al., 2002. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest*, 121(1), pp.73–80.
- Luque, I. et al., 2001. In vitro T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy*, 56(7), pp.611–618.
- Mayorga, C. et al., 2010. In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *Journal of investigational allergology & clinical immunology : official organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología*, 20(2), pp.103–109.
- Máiz, L. et al., 2013. Inhaled antibiotics for the treatment of chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: systematic review of randomised controlled trials. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 14(9), pp.1135–1149.

- Moran, A. et al., 2009. Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes care*, 32(9), pp.1626–1631.
- Mutius, E. et al., 2013. *Pädiatrische Pneumologie*, Springer.
- Nyfeler, B. & Pichler, W.J., 1997. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clinical & Experimental Allergy*, 27(2), pp.175–181.
- Ode, K.L. & Moran, A., 2013. New insights into cystic fibrosis-related diabetes in children. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 1(1), pp.52–58.
- Parkins, M.D. et al., 2011. Changing epidemiology and clinical issues arising in an ageing cystic fibrosis population. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 5(2), pp.105–119.
- Parmar, J.S., 2005. Antibiotic allergy in cystic fibrosis. *Thorax*, 60(6), pp.517–520.
- Pérez Pimiento, A. et al., 1998. Aztreonam and ceftazidime: evidence of in vivo cross allergenicity. *Allergy*, 53(6), pp.624–625.
- Pichler, W., 2003. delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med*, (139), pp.683–693.
- Pichler, W.J. & Tilch, J., 2004. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*, 59(8), pp.809–820.
- Pleasant, R.A., Walker, T.R. & Samuelson, W.M., 1994. Allergic reactions to parenteral beta-lactam antibiotics in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 106(4), pp.1124–1128.
- Ramesh, S., 2002. Antibiotic hypersensitivity in patients with CF. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 23(1), pp.123–141.
- Ramsey, B.W. et al., 2011. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *The New England journal of medicine*, 365(18), pp.1663–1672.
- Ren, C.L. et al., 2012. Multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and lung function decline in patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 11(4), pp.293–299.
- Renz, H. et al., 2010. In-vitro-Allergiediagnostik. *Allergo Journal*, (19), pp.110–128.
- Riordan, J.R. et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp.1066–1073.
- Romano, A. et al., 2004. Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy*, 59(11), pp.1153–1160.
- Rommens, J.M. et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp.1059–1065.
- Rosenthal, M., 2014. Prognostication in cystic fibrosis: another futile pastime? *Archives of*

- disease in childhood*, 99(1), pp.2–3.
- Rowe, S.M. & Verkman, A.S., 2013. Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(7).
- Rowland, M. & Bourke, B., 2011. Liver disease in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*, 17(6), pp.461–466.
- Sampson, H.A. et al., 2012. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. In *The Journal of allergy and clinical immunology*. pp. 1260–1274.
- Sanz, M.L. et al., 2005. Drug hypersensitivities: which room for biological tests? *European annals of allergy and clinical immunology*, 37(6), pp.230–235.
- Sanz, M.L., Gamboa, P.M. & Mayorga, C., 2009. Basophil activation tests in the evaluation of immediate drug hypersensitivity. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 9(4), pp.298–304.
- Sawicki, G.S., Sellers, D.E. & Robinson, W.M., 2009. High treatment burden in adults with cystic fibrosis: challenges to disease self-management. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 8(2), pp.91–96.
- Schechter, M.S. et al., 2009. Association of socioeconomic status with the use of chronic therapies and healthcare utilization in children with cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics*, 155(5), pp.634–9.e1–4.
- Shapiro, H.M., 2005. *Practical Flow Cytometry*, John Wiley & Sons.
- Simons, F.E.R. et al., 2011. World Allergy Organization anaphylaxis guidelines: summary. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(3), pp.587–93.e1–22.
- Sogn, D.D., 1986. Prevention of allergic reactions to penicillin. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 78(5 Pt 2), pp.1051–1052.
- Sommerburg, O. et al., 2010. Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(Suppl 2), pp.S263–71.
- Stern, R.C., 1997. The diagnosis of cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*, 336(7), pp.487–491.
- Taylor-Robinson, D.C. et al., 2013. The effect of social deprivation on clinical outcomes and the use of treatments in the UK cystic fibrosis population: a longitudinal study. *The lancet. Respiratory medicine*, 1(2), pp.121–128.
- Torres, M.J. & Blanca, M., 2010. The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavams. *The Medical clinics of North America*, 94(4), pp.805–20, xii.

- Trautmann, A. & Kleine-Tebbe, J., 2013. *Allergologie in Klinik und Praxis*, Georg Thieme Verlag.
- Van Goor, F. et al., 2011. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), pp.18843–18848.
- van Raalte, D.H. & Diamant, M., 2014. Steroid diabetes: from mechanism to treatment? *The Netherlands journal of medicine*, 72(2), pp.62–72.
- Wagener, J.S. & Kupfer, O., 2012. Dornase alfa (Pulmozyme). *Current opinion in pulmonary medicine*, 18(6), pp.609–614.
- Waters, V., 2012. New treatments for emerging cystic fibrosis pathogens other than *Pseudomonas*. *Current pharmaceutical design*, 18(5), pp.696–725.
- Whitaker, P. et al., 2011. Rapid desensitization for non-immediate reactions in patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 10(4), pp.282–285.
- Whitaker, P. et al., 2011. Mass spectrometric characterization of circulating and functional antigens derived from piperacillin in patients with cystic fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(1), pp.200–211.
- Whitaker, P., Naisbitt, D. & Peckham, D., 2012. Nonimmediate  $\beta$ -lactam reactions in patients with cystic fibrosis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 12(4), pp.369–375.
- Wickham, H., 2009. *ggplot2*, Springer.
- Wills, R., Henry, R.L. & Francis, J.L., 1998. Antibiotic hypersensitivity reactions in cystic fibrosis. *Journal of paediatrics and child health*, 34(4), pp.325–329.

## 7. Anhang

### 7.1. Fragebogen

<b>Name, Vorname</b>				
Bisherige Zentren				
Geburtsdatum				
Identifikationsnummer				
Geschlecht				
FEV1				
CFTR/ ED CF	Mutationen:		ED	
Besiedlung	1. Keim: Seit wann?			
	2. Keim:			
Allergie/ Atopie:	SX1/ Heuschnupfen		Aspergillen	
	ABPA		Gesamt IgE	
IV Antibiotika	Seit wann?			
Karenz:	Welche?			
	Wie oft im Schnitt?			
	Details über die Kurse:			
Reaktionen	1 (Datum/ Medikament/ Symptome/ Behandlung)			
	2			
	3			
	4			
	5			
Ggf. Bereitschaft für Informationen zur klinischen Studie				

## 7.2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jobst Fridolin Röhmel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Überempfindlichkeit gegen parenterale Antibiotika bei Patienten mit Mukoviszidose: Prävalenz, Charakteristika, Risikofaktoren, Prävention und zelluläre in-vitro Allergietests als diagnostisches Verfahren“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### **Anteilerklärung an erfolgten Publikationen**

Jobst Fridolin Röhmel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Jobst Fridolin Roehmel, Carsten Schwarz, Anne Mehl, Philippe Stock , Doris Staab, „Hypersensitivity to antibiotics in patients with cystic fibrosis“, Journal of Cystic Fibrosis, 2014.

Beitrag im Einzelnen: Jobst Fridolin Röhmel führte die Literaturrecherche, die Entwicklung des Fragebogens, die Verfassung des Ethikantrages, die Entwicklung der Datenbank, die Datenerhebung (systematische Aktenauswertung & Interviews), die statistische Analyse und die Datenauswertung der publizierten Studie eigenständig (zu 100%) durch. Die Konzeption der Studie, die Dateninterpretation und das Anfertigen des Manuskripts führte Jobst Fridolin Röhmel weitgehend eigenständig (zu 85%) mit Unterstützung der betreuenden Hochschullehrerin und Co-Autorin Doris Staab und der weiteren Co-Autoren durch. Zusammenfassend hatte Jobst Fridolin Röhmel einen Anteil von 90% an der Studie sowie der Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

### **7.3. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **7.4. Publikationsliste**

### **1. Originalarbeiten:**

Roehmel, J.F. et al., 2014. Hypersensitivity to antibiotics in patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 13(2), pp.205–211.

### **2. Korrespondenz:**

Roehmel, J.F. & Staab, D., 2014. Answer to "Letter to the Editor" concerning the article "Hypersensitivity to antibiotics in patients with cystic fibrosis" by Roehmel et al. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 13(3), pp.355–356.

### **3. Posterbeiträge bei Konferenzen:**

- Deutsche Mukoviszidose Tagung in Würzburg 11/2011: „Erhebung der Prävalenz und Inzidenz von Reaktionen gegen Antibiotika bei Patienten mit Cystischer Fibrose und Identifikation von Risikofaktoren“ – ausgezeichnet mit dem 1. Posterpreis.
- Postervortrag bei der North American Cystic Fibrosis Conference in Orlando/ USA 10/2012: „Hypersensitivity to antibiotics in patients with Cystic Fibrosis“
- Postervortrag bei der Tagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie in Lübeck, 3/2013: Unverträglichkeit parenteraler Antibiotika bei Patienten mit Mukoviszidose - Risikofaktoren und Charakteristika
- Postervortrag bei dem Drug Hypersensitivity Meeting der EAACI in Bern/ Schweiz 4/2014: Hypersensitivity to parenteral antibiotics in patients with Cystic Fibrosis.

### **4. Vorträge:**

- Manangement von Pleuraempyemen bei Kindern, Pneumologische Summer School, Charite 10/2012
- Vortrag “First description of *Arxula adenivorans* causing an invasive pulmonary mycosis and sepsis in a 34-year-old patient with CF” in “Clinical grand rounds”, European Cystic Fibrosis Conference, Lissabon 6/2013
- Vortrag “Epidemiology and risk factors for CF Arthropathy” European Cystic Fibrosis Conference, Göteborg 6/2014

## **7.5. Danksagung**

Hiermit möchte ich meinen Geschwistern und meinen Eltern für ihre immer währende Unterstützung in meinen verschiedenen Lebensbereichen danken. Sie ermöglichten mir meinen schulischen, universitären und jetzt auch beruflichen Werdegang. Für die Promotion besonders hervorzuheben sind meine Schwester Justine Röhmel und mein Vater Joachim Röhmel, die mir wertvolle Ratschläge für das Gelingen der Studie gaben. Meiner Frau Luise Röhmel danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und das Verständnis für die Entbehrungen. Meinen Kindern Jakob und Juliane danke ich für die täglichen Inspirationen und für ihre endlose positive Energie.

Weiterhin gilt mein Dank der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pulmologie und Immunologie der Charité Berlin, Campus Mitte. Hier erhielt ich das Rüstzeug für wissenschaftliches Arbeiten, welches die vorliegende Dissertation erst möglich machte. Besonders hervorzuheben sind meine Doktormutter PD Dr. Doris Staab sowie Dr. Carsten Schwarz und Prof. Dr. Philippe Stock. Sie haben mich während der Planung der Studie und der Durchführung sowie für die Präsentationen der Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen kontinuierlich unterstützt. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ulrich Wahn, der mir 2010 die Tür zu meiner Doktorarbeit öffnete.

Von Herzen bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Patienten und den Mitarbeitern des Mukoviszidose Zentrums an der Charite; ohne deren begeisterte und verlässliche Mitarbeit wäre die Durchführung dieser Studien nicht möglich gewesen.