

## **Bedeutung von Epikutantest und Lymphozytentransformationstest für die Diagnostik von Typ IV-Sensibilisierungen. Stellungnahme des Deutschen Berufsverband der Umweltmediziner.**

Significance of the patch test and the lymphocyte transformation test in the diagnostic of type IV-sensitization.

Statement of the German professional association for environmental medicine

Frank Bartram<sup>1</sup>, Hans-Peter Donat<sup>2</sup>, Kurt E. Müller<sup>3</sup>, Claus-Hermann Bückendorf<sup>4</sup>, Peter Ohnsorge<sup>5</sup>, Wolfgang Huber<sup>6</sup>, Volker von Baehr<sup>7</sup>

1 Praxis für Allgemeinmedizin/Umweltmedizin, Augustinergasse 8, 91781 Weissenburg

2 Praxis für Allgemeinmedizin/Umweltmedizin, Saarbrücker Strasse 9, 66679 Losheim am See

3 Praxis für Dermatologie/ Umweltmedizin, Scherwiesenweg 16, 88316 Isny

4 Praxis für Allgemeinmedizin/Umweltmedizin, Wolfsbrook 2, 24113 Kiel

5 Praxis für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Umweltmedizin, Juliuspromenade 54, 97070 Würzburg

6 Praxis für Innere Medizin/Umweltmedizin, Maaßstraße 28, 69123 Heidelberg-Wieblingen

7 Institut für Medizinische Diagnostik, Abteilung Immunologie, Nicolaistraße 22, 12247 Berlin

Kurztitel: Diagnostik von Typ IV-Sensibilisierungen

### **Korrespondenzadresse:**

Dr. med. Volker von Baehr  
Institut für medizinische Diagnostik Berlin  
Abteilung Klinische Immunologie  
Nicolaistraße 22  
12247 Berlin

Tel. +49 30 77001-155  
Fax. +49 30 77001-236  
email: v.baehr@imd-berlin.de

### **Zusammenfassung**

Zum Nachweis einer Typ IV-Sensibilisierung auf Allergene und Haptene ist der Epikutantest die am häufigsten verwendete diagnostische Methode. Auch wenn dieser Test in der Hand erfahrener Untersucher in vielen Fällen für die Allergenidentifizierung bei Kontaktallergien sehr hilfreich ist, werden vom Kliniker dafür auch standardisierte in vitro Methoden, ganz besonders für die Testung potentiell sensibilisierender toxischer oder karzinogener Substanzen gefordert. Die Entwicklungen der Zellkulturtechniken in den letzten Jahren haben dazu geführt, dass die heute in spezialisierten Laboratorien durchgeführten zellulären Verfahren, insbesondere bei umweltmedizinisch vorbelastete Patienten, für den Nachweis von Typ IV-Sensibilisierungen eine sichere Alternative darstellen. Dabei sind die Möglichkeiten, aber auch die Grenzen derartiger in vitro-Verfahren zu berücksichtigen. Heute stellt der Lymphozytentransformationstest (LTT) eine wichtige Alternative und Ergänzung zum Epikutantest für den Nachweis einer spezifischen Typ IV-Sensibilisierung dar. Vor- und Nachteile beider Verfahren hinsichtlich ihrer diagnostischen Spezifität und Sensitivität sowie die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen für den Einsatz in der Routinediagnostik werden dargestellt.

### **Schlüsselworte**

Epikutantest, Lymphozytentransformationstest, Typ IV-Sensibilisierung, Allergen, Hapten

### **Summary**

The epicutaneous test is the most commonly used method for the detection of type IV sensitisation to allergens and haptens.

This test is in the hands of experienced investigators mostly very helpful for the evaluation of the role of allergens in contact allergies. However, standardised in-vitro methods are also required especially for the identification of potentially sensitising toxic or carcinogenic substances.

Recent developments in cell culture technology have led to the establishment of modern cellular techniques carried out in specialised laboratories particularly in environmentally-challenged patients as a powerful alternative for the assessment of type IV sensitisation.

At the same time as considering the potential of such in-vitro assays one should bear in mind their limitations too.

The lymphocyte transformation test (LTT) represents nowadays an important alternative for the detection of a specific type IV sensitisation. Advantages and disadvantages of both procedures regarding their diagnostic specificity and sensitivity and the arising conclusions for application in routine diagnostics will be discussed.

### **Keywords**

epicutaneous test, lymphocyte transformation test, type IV sensitisation, allergen, hapten

## Epikutantest (ECT)

Bei der Diagnostik des allergischen Kontaktekzems (Typ IV-Allergie) kommt am häufigsten der Epikutantest (Pflastertest) zum Einsatz. Das Testprinzip beruht darauf, dass allergenspezifische T-Lymphozyten in das mit dem Testallergen versetzte Hautareal einwandern und damit eine makroskopisch wahrnehmbare Hautinfiltration nach 24 bis 72 Stunden hervorrufen. Bei der Beurteilung von positiven Testreaktionen muss zwischen allergischen und irritativen Reaktionen der Haut unterschieden werden. Viele Kontaktallergene besitzen, besonders bei Patienten mit empfindlicher Haut, auch hautreizende Eigenschaften. Bei der Bewertung eines Epikutantestes müssen vom Untersucher zur Vermeidung von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen einerseits die unterschiedliche Penetrierbarkeit und immunologische Reaktionsbereitschaft verschiedener Hauttypen sowie andererseits auch die unterschiedliche Sensitivität und Reproduzierbarkeit bei den einzelnen Testallergenen beachtet werden. Aus den genannten Gründen sollte die Durchführung von Epikutantestungen allergologisch versierten Untersuchern vorbehalten bleiben, denen die Grenzen dieses etablierten Routinetests bekannt sind.

## Der Lymphozytentransformationstest (LTT)

Der LTT ist die derzeit einzige umfangreich validierte in vitro-Methode zum Nachweis spezifischer zellulärer Sensibilisierungen. Er beruht auf dem Prinzip der Antigen-(Allergen)-induzierten Zellteilung von spezifischen T-Lymphozyten und der Analyse der induzierten DNA-Synthese. Eine positive Reaktion im LTT beweist das Vorhandensein von Allergen-spezifischen T-Gedächtniszellen im Patientenblut. Die seit 2002 verwendeten optimierten LTT-Varianten haben durch Zusatz von rekombinantem Interferon-alpha zur Lymphozytenkultur eine gesteigerte Sensitivität und Spezifität erlangt (1;2;3).

Bis vor wenigen Jahren hatte der LTT noch eine geringere Sensitivität und war dem Hauttest allenfalls gleichwertig. Die Spezifität war durch nicht seltene grenzwertige Reaktionen eingeschränkt. Die Diversität der Methoden und die damals fehlende Standardisierung erklären die sehr unterschiedliche Bewertung des LTT vor dem Jahr 2000. Neben Arbeiten die dem LTT schon damals eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie klinische Relevanz bescheinigen (4;5;6) finden sich Publikationen über falsch positive Ergebnisse (7;8).

Während der letzten 5 Jahre hat sich der Stellenwert des LTT sowie die Datenlage zur Sensitivität und Spezifität grundlegend geändert. Dazu haben die Weiterentwicklungen der Zellkulturtechniken, die Qualität der verwendeten Antigene und nicht zuletzt die verbesserten Messmethoden beigetragen. Die früher zur Tritiumbestimmung verwendeten Flüssigszintillations-Geräte sind durch hochsensitive automatisierte Festphase- $\beta$ -Counter ersetzt worden. Als Konsequenz der methodischen Entwicklungen wurde der LTT in der derzeit standardisierten Form durch Fachgutachter der DACH im Frühjahr 2003 nach DIN EN 17025 und seit Januar 2005 nach DIN EN 15189 als Prüfverfahren akkreditiert.

## „Unspezifisch mitogene Effekte“ sind im LTT auszuschließen

In der älteren Fachliteratur gibt es Diskussionsbeiträge (keine Studien), die postulieren dass beim LTT unspezifisch-mitogene Effekte bei der Testung auf Metalle auftreten. Dieses kann heute durch validierte standardisierte Konzentrationen der eingesetzten Allergene sicher ausgeschlossen werden. Zudem handelt es sich nicht um „mitogene Effekte“, da die im LTT proliferierenden Zellen ausschließlich CD4-T-Helferzellen sind. Positive LTT-Reaktionen ohne klinisch vorhandene Kontaktallergien beruhen auf balancierten Sensibilisierungen, wobei durch CD25+ regulatorische T-Zellen eine Immuntoleranz aufrechterhalten wird (9). Daneben sind auch IL10-sezernierende CD4-Zellen beteiligt (10). Die postulierten „unspezifischen Aktivierungen“ im LTT sind zudem nicht zu verwechseln mit den bei Hauttestungen auftretenden toxisch-irritativen Entzündungsreaktionen, da unspezifische Effekte im LTT durch den Einsatz standardisierter Testkonzentrationen und parallele Antigen-Hemmversuche ausgeschlossen werden können (11).

## Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Epikutantestes

Trotz großer Fortschritte bei der Standardisierung der Testallergene liegen die „Schwachstellen“ des Epikutantest in der subjektiven Testbewertung und der unterschiedlichen Hautbeschaffenheit der Testpersonen. Die noch heute häufig geäußerte Meinung, dass der Epikutantest dem LTT in der Aussage prinzipiell überlegen sei, muss kritisch betrachtet werden.

Mehrere klinische Studien zeigen, dass die Sensitivität des Epikutantestes für einen „Goldstandard“ zu gering ist. Negative Epikutanteste bei bestehender klinisch gesicherter Sensibilisierung sind mehrfach beschrieben (12;13;14). Rustemeyer zeigte für Nickel, dass von 74 Patienten mit klinisch gesicherter Nickel-sensibilisierung lediglich 40 eine positive Reaktion der Haut aufwiesen, was einer Sensitivität von lediglich 54 % entspricht (10). Bourke zeigte, dass Epikutanteste mit verschiedenen Kontaktallergenen, jeweils zweifach zeitgleich beiderseits der Wirbelsäule auf dem Rücken eines Patienten durchgeführt, eine Intra-assay-Reproduzierbarkeit von ca. 92 % aufwiesen (15). Multicenter-Studien ergaben Zahlen von 84% (16) oder lediglich 56 % (17). In dieser von Gollhausen an der Dermatologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführten Studie wurden die Patienten im Abstand von einer Woche zweimal untersucht. In einem 2004 von Iris Ale publizierten Review wird die Ratio nicht reproduzierbarer Reaktionen bei neun erfassten Studien mit 4,2 bis 43,8 % angegeben (18). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese in kontrollierten Studien ermittelten „Abweichungen“ in der klinischen Routinediagnostik noch höher sind.

## Einsatz und wissenschaftliche Reputation des Lymphozytentransformationstest (LTT)

Der LTT hat sich in der Diagnostik von immunologisch bedingten Arzneimittelreaktionen im Vergleich zum Epikutantest in der Spezifität als gleich und in der Sensitivität als überlegen erwiesen (19;20;11). Dieses führte für diese Fragestellung zur positiven Bewertung durch das Robert Koch-Institut (21). In der gleichen

Stellungnahme wurde hingegen der Nachweis allergischer Reaktionen gegenüber Umweltschadstoffen (einschließlich Metallen) kritisch gesehen, „da kein ausreichendes Untersuchungsmaterial vorliegt“. Dass hier dem identischen Test für Haptene wie Medikamentenderivate eine hohe Sensitivität zugeschrieben wird, für andere wie Metalle dagegen nicht, ist unverständlich. Gerade für Metalle wie Chrom, Nickel und Kobalt zeigen neuere Untersuchungen, dass der LTT eine höhere Sensitivität im Vergleich zur Epikutantestung hat (22;23).

In der genannten Stellungnahme des RKI wird zudem postuliert, dass positive LTT-Befunde „lediglich eine Exposition anzeigen“, die nicht immer mit einer klinischen Symptomatik verbunden sein muss. Eine im LTT (aber auch im Hauttest !) nachgewiesene Sensibilisierung muss tatsächlich nicht zwingend mit einer klinischen Symptomatik assoziiert sein, was aber die vorliegende Sensibilisierung nicht in Frage stellt. Es ist bekannt, dass nicht jede Sensibilisierung eine Allergie zur Folge hat. Dass positive LTT-Befunde „lediglich eine Exposition anzeigen“ ist auch deshalb nicht schlüssig, da in diesem Fall zweifelsohne die Rate positiver Reaktionen auf Dentalmetalle, Nickel oder auch Cadmium (im Zigarettenrauch enthalten) weit höher als nachgewiesen sein müsste. Die Prävalenz positiver Reaktionen im LTT liegt weit unter der hohen Zahl entsprechend exponierter Personen (4;22).

Zum Nachweis einer Typ IV-Sensibilisierung auf Beryllium stellt der LTT unbestritten das Mittel der Wahl dar (24;21). Eine schlüssige Erklärung, warum dieses für Beryllium nicht aber andere Metalle der Fall sein sollte, gibt es nicht. Gerade Metalle eignen sich sehr gut für die LTT-Testung, da diese im Vergleich zu Medikamenten nicht metabolisiert werden. Am Institut für Klinische Immunologie der Universitätsklinik Essen wurde kürzlich die Korrelation der verschiedenen Testmethoden LTT, Epikutantest und Zytokinanalysen untereinander und zum klinischen Befund untersucht (25). Es zeigte sich eine gute Korrelation der Ergebnisse des LTT, des Epikutantest und der Zytokinanalysen. Im Vergleich zum klinischen Bild zeigten sowohl der LTT als auch der Epikutantest eine Korrelation (Epikutantest,  $r=0,73$ ,  $p<0,0001$ ; LTT  $r=0,74$ ,  $p<0,0001$ ).

Bei Duftstoffunverträglichkeiten (26), jodhaltigen Kontrastmittel (27) und Methacrylaten (28) ist belegt, dass der LTT für die häufig problematische Differenzierung zwischen allergischen und irritativen Reaktionen hilfreich ist.

Alle neueren Studien zeigen, dass die Validität der ermittelten LTT-Ergebnisse vielmehr von der Qualität der Testdurchführung abhängt, als vom methodischen Verfahren an sich. Hier besteht jedoch kein Unterschied zu anderen Labormethoden. Die häufig aus älteren Publikationen herrührende undifferenzierte Skepsis gegenüber dem LTT ist unter Berücksichtigung der methodischen Entwicklungen sowie aktueller Studien heute nicht mehr gerechtfertigt.

### **Eine Sensibilisierung muss nicht in jedem Fall mit einer lokalen Symptomatik an der Kontaktstelle einhergehen.**

Vor allem in der zahnärztlichen Praxis wird häufig angenommen, dass eine klinisch relevante Sensibilisierung zwingend mit einer oralen Symptomatik einhergehen muss. Dieses ist nicht der Fall, da sich die Haptenaufbereitung der oralen Mukosa und der Epidermis auf

Grund immunologischer Besonderheiten unterscheiden (29;13). Ursächlich sind unterschiedliche Lipidzusammensetzungen von Mukosa und Epidermis (30), der schnellere Abtransport von Allergenen durch die starke Durchblutung des Stratum reticulare der oralen Mukosa (31) sowie eine durch ca. 400 Bakterienarten im Mundraum beeinflusste primäre Immunantwort (32). Die hauptsächlich für die initiale lokale Entzündungsreaktion verantwortlichen Langerhanszellen zeigen funktionelle Unterschiede zwischen Epidermis und Mukosa. Langerhans-Zellen der Mukosa exprimieren vermehrt den Fc epsilon RI-Rezeptor (33;34) und sind zu einer allogeenen T-Zell-Stimulation in vitro fähig (35). Vergleichende Provokationstestungen zeigten, dass die zur Auslösung einer Schleimhautreaktion notwendigen Allergenkonzentrationen 5-12-mal höher sind als an der Haut (36).

Für die Entwicklung einer allergischen Schleimhautreaktion gegen eine Fremdschubstanz ist es zudem entscheidend, ob der Primärkontakt, das heißt der prägende immunologische Erkennungsprozess, über die Schleimhaut, die Haut oder das Intestinum stattgefunden hat. Sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen kann die Reaktivität der oralen Mukosa durch vorherige intestinale Allergenexposition unterdrückt werden (37;38).

Die genannten Unterschiede erklären, warum einerseits positive Epikutantestreaktionen nicht immer auch mit oralen Manifestationen einhergehen, andererseits aber auch, dass kontaktallergische Schleimhautreaktionen sich nicht in jedem Fall im Epikutantest manifestieren (16).

### **LTT und Epikutantest können nur eine Sensibilisierung, nicht aber eine Allergie beweisen.**

Der Nachweis einer immunologischen Sensibilisierung, wie er mittels LTT und Hauttest erfolgt, ist nicht obligat mit einer klinischen lokalen oder systemischen Symptomatik verbunden. Die Allergiediagnose kann nur in Kenntnis des klinischen Befundes und der Anamnese gestellt werden. Allergietests stützen die Diagnose, da eine Sensibilisierung zwingende Voraussetzung einer Allergie ist. Aus unserer Sicht stellen der Epikutantest und ein in einem dafür spezialisierten Zellkulturlabor durchgeführter LTT zwei Methoden dar, die sich bei schwierigen Fragestellungen sehr gut ergänzen.

Die von uns in den vergangenen vier Jahren gesammelten Erfahrungen zeigen, dass ein standardisiert durchgeführter LTT vor allem bei folgenden Fragestellungen wichtig ist:

1. negatives Epikutantestergebnis bei dringendem klinischen Verdacht auf eine Kontaktallergie.
2. fraglich positive Ergebnisse im Epikutantest (toxische Reaktionen?).
3. präventive Testung vor Einbringung von Zahnersatzmaterial oder berufsgenossenschaftliche Fragestellungen.
4. Testung von potentiell sensibilisierenden oder karzinogenen Substanzen.

### **Bei präventiven Fragestellungen sollte der LTT verwendet werden.**

Prinzipiell sollte bei präventiven Fragestellungen bezüglich bestehender Typ-IV-Sensibilisierungen, wie sie vor allem im Bereich der Zahnmedizin durchgeführt werden, der Epikutantest zurückhaltend eingesetzt

werden, da durch die Applikation der Testsubstanz auf die Haut eine potentielle Sensibilisierungsgefahr besteht (39;40). Agrup zeigte in einer Studie mit zweimaliger Durchführung des Epikutantestes auf Standardallergene, dass es bei der wiederholten Testung nach 6 Monaten zu einer signifikanten Anzahl von „Neusensibilisierungen“ gekommen war. Die Prävalenz der iatrogenen Sensibilisierungen betrug für Kobalt 5 %, p-Phenylendiamin 4,6 %, Chrom 2,3 % und p-Aminoazobenzene 9,9 % (39). Weitere Falldarstellungen gibt es zu Benzoylperoxid, Butylhydrochinon, Kompositen-Mix (41), para-tertiärem Butylcatechin (42), diversen Pflanzenextrakten (43), Budesonide (44), Formaldehyd (45), Nickel (10) und Acrylate (46). Für Penicillin gilt bis heute aufgrund der Sensibilisierungsgefahr die therapeutische kutane Applikation als Kunstfehler (41). In Tierversuchen ließen sich Sensibilisierung zum Beispiel auf Chrom, Quecksilber und Nickel induzieren (47). Mit diesem Wissen ist die häufig praktizierte routinemäßige Epikutantestung der kompletten Standard-Allergenreihe als kritisch zu bewerten.

Die Verfahrensweise, ein positives LTT-Ergebnis durch einen Epikutantest zu bestätigen, sollte deshalb nur in Ausnahmefälle, z.B. bei grenzwertigen Ergebnissen, erfolgen, da eine Verstärkung der klinischen Symptomatik durch Exposition mit dem Test-Kontaktallergen für verschiedene Kontaktallergene gezeigt worden ist (48;49;50). Ohnehin schränkt die eingeschränkte Sensitivität und die mangelnde Reproduzierbarkeit (12;13) die Indikationen derartiger „Nachttestungen“ ein.

### **Aus der Sicht der kurativ tätigen Umweltmedizin sind für die Bewertung positiver Testergebnisse folgende Schlussfolgerungen zu empfehlen:**

1. Bei präventiven Untersuchungen mit potentiell sensibilisierenden Substanzen, allen Testungen mit karzinogenen Stoffen und der Untersuchung von Patienten mit prädisponierenden immunologischen Erkrankungen sollte der LTT als nicht belastendes Verfahren dem Epikutantest vorgezogen werden.
2. Ein sicher positives Ergebnis im Epikutantest stellt eine Sensibilisierung sicher. Fraglich positive und vermutlich durch toxische Reaktionen bedingte Resultate im Epikutantest sollten auch bei kurativen Fragestellungen durch den LTT bestätigt werden.

### **Der Qualitätsanspruch muss bei zellulären Laborverfahren hoch sein!**

Der Einsatz des LTT in der klinischen Diagnostik stellt hohe Anforderungen an den behandelnden Arzt für die Indikationsstellung und an das ausführende Labor für die Gewährleistung einer konstant hohen Qualität der Testdurchführung. Der LTT bleibt, wegen seiner im Vergleich zum Epikutantest höheren Kosten, speziellen Fragestellungen vorbehalten. Unter Berücksichtigung der dargestellten Studienlage wäre es aber falsch, diese moderne diagnostische in vitro-Methode nicht einzusetzen.

Zu fordern ist allerdings, dass diese anspruchsvolle Zellkulturmethode ausschließlich von akkreditierten medizinischen Instituten durchgeführt werden sollte, die über ausreichend Erfahrungen mit dieser Methode verfügen. Die für ein nach DIN ISO 15189 akkredi-

tiertes Labore zwingend vorgeschriebenen Ring- und Vergleichsuntersuchungen mit Prüflaboratorien sind eine entscheidende Voraussetzung für ein effizientes Qualitätsmanagement und die verlässliche Berücksichtigung der Testergebnisse in der klinischen Praxis.

## Literatur

1. von Baehr V et al. Improving the in vitro antigen specific T cell proliferation assay: the use of interferon-alpha to elicit antigen specific stimulation and decrease bystander proliferation. *J Immunol Methods*. 2001;251:63-71.
2. Paquette, R.L. et al. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 1998;64:358-67
3. Marrack P., Kappler J., Mitchell T.. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med.* 1999; 189:521-30Marrack P., Kappler J., Mitchell T.. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med.* 1999; 189:521-30
4. Vamnes JS, Gjerdet NR, Morken T, Moe G, Matre R. In vitro lymphocyte reactivity to gold compounds in the diagnosis of contact hypersensitivity. *Contact Dermatitis*. 1999;41:156-60.
5. Rasanen L, Tuomi ML. Diagnostic value of the lymphocyte proliferation test in nickel contact allergy and provocation in occupational coin dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1992;27:250-4
6. Everness KM, Gawkrödger DJ, Botham PA, Hunter JA. The discrimination between nickel-sensitive and non-nickel-sensitive subjects by an in vitro lymphocyte transformation test. *Br J Dermatol*. 1990;122:293-8.
7. Cederbrant K, Hultman P, Marcusson JA, Tibbling L. In vitro lymphocyte proliferation as compared to patch test using gold, palladium and nickel. *Int Arch Allergy Immunol*.1997;112:212-217
8. Cederbrant K, Gunnarsson LG, Hultman P, Norda R, Tibbling-Grahn L. In vitro lymphoproliferative assays with HgCl<sub>2</sub> cannot identify patients with systemic symptoms attributed to dental amalgam. *J Dent Res*. 1999;78:1450-8.
9. Cavani A. et al. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J. of Immunology* 2003;171:5760-8.
10. Rustemeyer T. Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1458-66.
11. Hagemann T, Schlutter-Bohmer B, Allam JP, Bieber T, Novak N. Positive lymphocyte transformation test in a patient with allergic contact dermatitis of the scalp after short-term use of topical minoxidil solution. *Contact Dermatitis*. 2005;53:53-5.
12. Lyzak W. et al. Diagnosis and treatment of an oral base-metal contact lesion following negative dermatological patch test. *Ann Allergy* 1994;73:161-5
13. Moneret-Vautrin D.A. Allergy to nickel in dental alloys. *Europ. Annals of Allergy and Clin Immunol* 2004;36:311-2
14. Rietschel RL. et al. Practical aspects of patch testing. In Fisher's Contact Dermatitis (Rietschel RL, Fowler JF, eds.) 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:9-26
15. Bourke J.F., Batta K, Prais L, Abdullah A, Foulds I. The reproducibility of patch test. *Br J Dermatol*. 1999;140:102-5
16. Brasch J. et al. Reproducibility of patch tests. *J Acad Dermatol* 1994;31:584-91
17. Gollhausen R. Reproducibility of patch tests. *J Acad Dermatol* 1989;21:1196-202
18. Iris Ale S. et al. Reproducibility of patch test results : a concurrent right-versus left study using TRUE Test. *Contact Dermatitis* 2004;50:304-12.
19. Pichler WJ et al. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*. 2004;59:809-20
20. Merk HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. *Toxicology* 2005;209:217-20
21. RKI-Empfehlung, Diagnostische Relevanz des Lymphozytentransformationstest in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 2002;45:745-49.
22. Hallab NJ. et al. Lymphocyte transformation testing for quantifying metal-implant-related hypersensitivity responses. *Dermatitis*. 2004;15:82-90.
23. Hallab NJ. et al. Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Res*. 2005;23:384-91
24. Stange AW, Furman FJ, Hilmas DE. The beryllium lymphocyte proliferation test: Relevant issues in beryllium health surveillance. *Am J Ind Med*. 2004;46:453-62.
25. Lindemann M et al. ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin. Exp. Allergy* 2003;33:992-8
26. Sieben S, Herfl M, Al Masaoudi T, Merk HF, Blomeke B. Characterization of T cell responses to fragrances. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;172:172-8
27. Kanny G, Pichler W, Morisset M, Franck P, Marie B, Kohler C, Renaudin JM, Beaudouin E, Laudy JS, Moneret-Vautrin DA. T cell-mediated reactions to iodinated contrast media: evaluation by skin and lymphocyte activation tests. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:179-85.
28. Kanerva L, Jolanki R, Estlander T. 10 years of patch testing with the (meth)acrylate series. *Contact Dermatitis*. 1997;37:255-8
29. Temesvasi E et al. Nickel sensitivity from dental prothesis. *Contact Dermatitis* 1988;18:50-51.
30. Squierer CA. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2:13-32.
31. Scardina GA, Messina P. Study of the microcirculation of oral mucosa in healthy subjects. *Ital J Anat Embryol*. 2003;108:39-48.
32. Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H. Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res*. 2002;8:465-8.
33. Brasch J. Mundschleimhaut und Kontaktallergie *Allergo J* 2004;13:191-7
34. Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, Geiger E, Kochan JP, Bieber T. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcepsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:141-8.
35. Haseus B, Jontell M, Bergenholtz G, Eklund C, Dahlgren Ul. Langerhans cells from oral epithelium are more effective in stimulating allogeneic t-cells in vitro than Langerhans cells from skin epithelium. *J Dent Res*. 1999;78:751-8.
36. Nielsen C, Klaschka F. Test studies on the mouth mucosa in allergic eczema. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 1971;57:201-18
37. Ahlfors E, Czerkinsky C. Suppression of delayed-type contact sensitivity in the murine oral mucosa by prior intragastric administration of haptens. *Scand J Immunol*. 1997;46:268-73.
38. van Hoogstraten IM, Boden D, von Blomberg ME, Kraal G, Scheper RJ. Persistent immune tolerance to nickel and chromium by oral administration prior to cutaneous sensitization. *J Invest Dermatol*. 1992;9:608-16.
39. Agrup A., Sensitization induced by patch testing" *Br.J. Derm.* 1986; 80:631-634.
40. Merk K.H., Allergische Berufsdermatosen, Stellungnahme zur In vitro-Diagnostik, 2004. *Hautarzt* 55:31-34
41. Schröder C, John SM. Sensibilisierungen durch Epikutantest . 2002 *Dermatosen, Derm Beruf Umwelt* 49:269-72
42. Yu RC, Macfarlane AW, King CM. An unusual delayed patch test reaction to para-tertiary-butylcatechol. *Contact Dermatitis*. 1990;22:110-11
43. Aberer W, Hausen BM. Active sensitization to elecampene by patch testing with a crude plant extract. *Contact Dermatitis* 1990,22:53-55
44. Le Coz CJ, El Bakali A, Untereiner F, Grosshans E. Active sensitization to budesonide and para-phenylenediamine from patch testing. *Contact Dermatitis*. 1998 ;39:153-5
45. Massone L, Anonide A, Borghi S, Usiglio D. Sensitization to para-tertiary-butylphenolformaldehyde resin. *Int J Dermatol*. 1996;35:177-80.
46. Kanerva L, Estlander T, Jolanki R. Sensitization to patch test acrylates. *Contact Dermatitis*. 1988;18:10-5
47. Vreeburg KJ, de Groot K, van Hoogstraten IM, von Blomberg BM, Scheper RJ. Successful induction of allergic contact dermatitis to mercury and chromium in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991;96:179-83
48. Moller H, Larsson A, Bjorkner B, Bruze M, Hagstam A. Flare-up at contact allergy sites in a gold-treated rheumatic patient. *Acta Derm Venereol*. 1996;76:55-8.
49. Moller H, Bjorkner B, Bruze M. Clinical reactions to systemic provocation with gold sodium thiomalate in patients with contact allergy to gold. *Br J Dermatol*. 1996;135:423-7.
50. Ahnide I, Bjorkner B, Bruze M, Moller H. Exposure to metallic gold in patients with contact allergy to gold sodium thiosulfate. *Contact Dermatitis*. 2000;43:344-50.