

Thomas Gentinetta<sup>1,2</sup>, Oliver Hausmann<sup>1</sup> und Werner Pichler<sup>1,2</sup>

# Basophilen-Aktivierungstest an der Schnittstelle von Serologie und zellulärer Diagnostik

**Fortschritte in der serologischen Diagnostik beruhen häufig auf sensitiveren Testverfahren, besseren Antigenen und Automatisierung. Selten werden neue Testprinzipien angewandt und die Flowzytometrie fristet immer noch ein bescheidenes Dasein in der Labordiagnostik. Wir haben zwei neue Testsysteme etabliert, welche die Vorteile der Serologie mit einem funktionellen zellulären System verbindet – den Basophilen-Aktivierungstest mit humanen basophilen Granulozyten von gut charakterisierten Spendern und Patientenserum.**

## Das Prinzip des Basophilen-Aktivierungstests

Der Basophilen-Aktivierungstest (BAT) mit basophilen Granulozyten, kurz Basophile genannt, spiegelt nach Zusatz des vermuteten Allergens im Reagenzglas die allergische Soforttypreaktion

dem BAT steht neu eine Methodik zur Verfügung, mit welcher im Gegensatz zur Standardserologie, die lediglich den gelösten, biologisch nicht aktiven IgE-Serum-Anteil erfassen kann, der biologisch aktive, zellmembranständige IgE-Anteil erfasst wird.

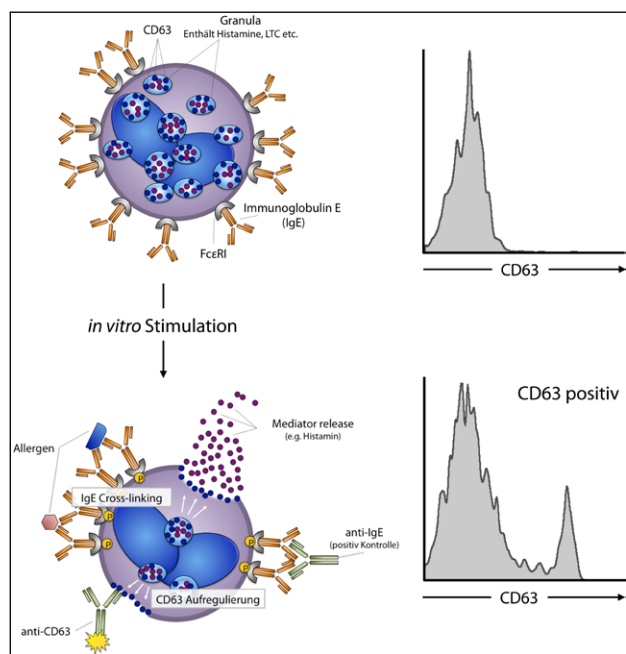


Abb. 1: Nach Vernetzung der Membran-gebundenen IgE (Cross-linking) wird die Aktivierungskaskade initiiert. Die Zellen degranulieren und es kommt zur Histamin-Ausschüttung sowie zur Expression des spezifischen Aktivierungsmarkers CD63 auf der Membranoberfläche.

wider und ähnelt damit der Reaktion beim Hauttest, jedoch mit dem Vorteil, unabhängig von Antihistaminikaeinnahme, urtikariellem Dermographismus und anderen beeinflussenden Hauttestfaktoren zu sein.

Das Grundprinzip des BAT beruht auf der Beobachtung, dass bei der Degranulation neben den freigesetzten Substanzen (v.a. Histamin) diverse Oberflächenproteine, u.a. CD63, aufreguliert werden [1]. Letztere können mittels Flowzytometrie gemessen werden (Abb. 1). Mit

Der BAT in seiner direkten Form (mit Patienten-Basophilen) hat bereits eine breite Anwendung in der allergologischen Diagnostik gefunden, wobei die Verbindung von IgE-Nachweis mit der Aktivierung von Basophilen als wichtige Zellgruppe der allergischen Soforttypreaktion eine neue, funktionelle Dimension in die Diagnostik einbrachte. Zur Abklärung von Akutreaktionen, für die derzeit keine *In-vitro*-Testmethoden vorliegen (z.B. die meisten Medikamentenallergien) oder bei denen aufgrund der Reaktionsschwere eine Provokationstestung nicht in Frage kommt, stellt der BAT eine neue Möglichkeit dar [2, 3]. Weiter kann diese Aktivierung nicht nur

## Summary

The indirect BAT provides a novel instrument in the diagnostic management of immediate-type allergies that involve IgE-dependent mast cell and basophil activation. Especially the transfer of patient IgE to donor basophils, which cannot be done *in vivo*, provides an instrument to prove IgE dependence, whereas such an involvement with the conventional BAT cannot be clarified beyond doubt. This is important for prognosis and avoidance strategies, as IgE-mediated reactions are generally more dangerous and potentially life-threatening. Furthermore, it is of particular interest in those cases where current *in vitro* routine diagnostics do not provide alternative tests, and confirmation of clinical suspicion would require a potentially dangerous provocation test. Additionally, donor basophils can be used for the identification of activating serum factor in patients with chronic spontaneous urticaria and might replace the problematic autologous serum skin test (ASST).

durch Vernetzung zellgebundener IgE durch Allergene ausgelöst werden, sondern auch durch aktivierende Serumfaktoren (z.B. IgG-Autoantikörper gegen Fc-IgE-R), wie sie bei Patienten mit chronischer Urtikaria eine Rolle spielen und mit dem BAT erfasst werden [4]. Wir gehen nun einen Schritt weiter: Im Gegensatz zum direkten BAT, wie er oben beschrieben ist und auf frischen Blutproben (Verarbeitung <24h nach Blutentnahme) von Patienten basiert, setzen wir seit kurzem Serumproben des Patienten ein, mit denen wir gut charakterisierte Spender-Basophile «sensibilisieren». Dieser sogenannte «indirekte BAT» hat viele Vorteile gegenüber dem direkten BAT (Tab. 1). In den folgenden Abschnitten werden

<sup>1</sup> Department of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergy, Inselspital, University Bern, Bern

<sup>2</sup> ADR-AC GmbH, Holligenstrasse 91, CH-3008 Bern, Switzerland

zwei Anwendungsmöglichkeiten des indirekten BAT vorgestellt:

### ***In-vitro*-Sensibilisierung von Spender-Basophilen**

Der Nachweis eines IgE-vermittelten Mechanismus ist von grosser Bedeutung für den einzelnen Patienten betreffend Prognose, Kreuzreaktionen und Vermeidungsstrategien. Die Diagnostik beruht hier üblicherweise auf Anamnese, Hauttestung sowie der Bestimmung allergen-spezifischer IgE-Antikörper.

Je nach Fragestellung sind zusätzlich Provokationstests mit dem vermuteten Auslöser oder in der Medikamentenallergie möglichen Alternativsubstanzen notwendig. Der indirekte BAT mit resensibilisierten, gut charakterisierten Spender-Basophilen kann hier als *In-vitro*-Korrelat zur berühmten *In-vivo*-Prausnitz-Küstner-Reaktion [5] verstanden werden (Abb. 2).

### «Bestimmung von medikamentenspezifischen IgE-Antikörpern»

Wir verwenden den BAT momentan routinemässig bei Insektengift- und gewissen Medikamentenallergien. Bei Letzteren ist der BAT oft der einzige *In-vitro*-Test zum Nachweis von medikamentenspezifischen IgE. Bei Insektengiftallergien konnte gezeigt werden, dass der BAT in diagnostisch schwierigen Fällen die Identifizierung des auslösenden Insektengifts erleichtern kann [6].

### Identifizierung von aktivierenden Serum-Komponenten bei chronischer Urtikaria

Chronische Urtikaria (CU) manifestiert sich als juckende Quaddelbildung über einen Zeitraum von mehr als sechs aufeinanderfolgenden Wochen, ohne offensichtliche Ursache. CU hat einen erheblichen Effekt auf die Lebensqualität. Bei ca. 1/3 der Patienten finden sich im

Serum Faktoren, die eine Mastzelldegranulation bewirken können, z.T. zurückzuführen auf funktionelle Autoantikörper gegen den IgE-Rezeptor an der Mastzell- und Basophilenoberfläche (Fc-IgE-RI). Momentan ist der Autologe-Serum-Hauttest (ASST) empfohlen, um diese Faktoren zumindest indirekt nachzuweisen, jedoch mit den Nachteilen eines *In-vivo*-Testes: teuer, schwierig abzulesen, wenig geeignet zur quantitativen Erfassung des Autoantikörpers und in manchen Ländern gesetzlich verboten, da eine Verwechslung einer Serumprobe ein nicht unerhebliches Infektionsrisiko birgt. Ganz wesentlich ist auch der Nachteil, dass der ASST unter Antihistaminika-Therapie überhaupt nicht durchgeführt werden kann. Als *In-vitro*-Alternative zum nicht unproblematischen ASST konnten wir in einer breit angelegten Untersuchung einen Test mit vergleichbarer Spezifität, aber einer im Vergleich zum ASST wahrscheinlich besseren Sensitivität etablieren [4].

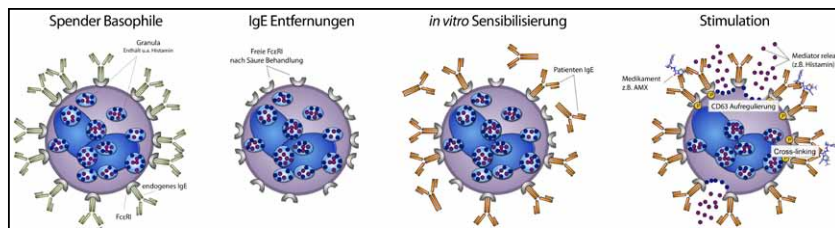


Abb. 2: ***In-vitro*-Sensibilisierung – ein mehrstufiges Verfahren**

**Spender-Basophile:** PBMCs eines gut charakterisierten (Fc-IgE-R Dichte, Reaktion auf IL-3, Anzahl Zelle im peripheren Blut) Spenders werden durch einen Ficoll-Gradienten isoliert. **IgE Entfernung:** PBMCs werden für 5 min mit Laktat (pH 3,9) inkubiert, um die Bindung von IgE an seinen Rezeptor (FcεRI) zu lösen. ***In-vitro*-Sensibilisierung:** Patientenserum wird mit den «gestrippten» Basophilen für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. IgE im Serum wird mit hoher Affinität an die freien Rezeptoren binden. **Stimulation:** Basophile werden anschliessend mit seriellen Verdünnungen der entsprechenden Allergene stimuliert und die Degranulation wird mit Hilfe von Durchflusszytometrie gemessen.

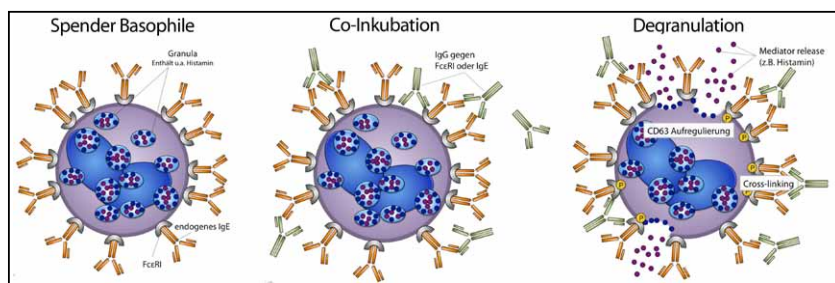


Abb. 3: **Testprinzip zur Identifizierung von aktivierenden Komponenten in Patientenseren**

**Spender-Basophile:** PBMCs aus einem gut charakterisierten (Fc-IgE-R Dichte, Reaktion auf IL-3, Anzahl Zelle im peripheren Blut) Spender werden durch einen Ficoll-Gradienten isoliert. **Co-Inkubation:** PBMCs werden entweder mit Patientenserum, gesundem Kontrollserum oder Medium (negative Kontrolle) und anti-IgE (positive Kontrolle) für 30 min bei 37 °C co-inkubiert. **Degranulation:** Basophilenaktivierung und Degranulation wird durch Durchflusszytometrie gemessen.

### «Vereinfachte *In-vitro*-Alternative zum schwierigen Hauttest»

Diese Alternative hat wesentliche Vorteile gegenüber dem Hauttest (Tab. 2). Auch in diesem Verfahren verwenden wir gut definierte Spender-Basophile, welche direkt mit dem Patientenserum co-inkubiert werden. Potentiell aktivierende Serumkomponenten führen in der Folge zur Basophilen-Aktivierung, welche wiederum wie oben beschrieben flowzytometrisch gemessen wird. CU hat höchstwahrscheinlich mehr als einen pathogenetischen Faktor. Unser optimierter Assay scheint jedoch in der Lage zu sein, die meisten dieser Serumfaktoren zu identifizieren. Deren Differenzierung – entsprechende Studien sind im Gange – sollte helfen, auch die Therapie der CU zu optimieren bzw. zu individualisieren.

Korrespondenz:  
Thomas Gentinetta, MSc  
Tel. +41 31 371 86 40  
Fax +41 31 371 86 41  
E-Mail: thomas.gentinetta@adr-ac.ch

Dieser Artikel ist mit der kooba Paperboy Bilderkennung verknüpft. Mit der App lassen sich Zusatzinfos und Links direkt auf Ihr Smartphone bringen.

**Tabelle 1: Die Vorteile und Fakten des indirekten Basophilen-Aktivierungstests**

	Direkter BAT	Indirekter BAT
Menge von Probematerial	5–10 ml EDTA Blut	min. 1 ml Serum
Lagerung von Probematerial	keine. Blut muss innerhalb von 24h nach Abnahme verarbeitet werden	bei 4 °C für kurze Perioden, langfristige Lagerung bei min. –20 °C
Transport von Probematerial	Blut sollte schnellstmöglich ins Labor versendet werden	Serumproben können bei 4 °C aufbewahrt werden und erst bei Bedarf verschickt werden
Test Wiederholung	nur bei wiederholter Blutentnahme möglich	möglich
Test Performance	abhängig von den Eigenschaften des Patienten	optimal – da gut charakterisierte Spenderzellen verwendet werden
Fehleranfälligkeit in Präanalytik	mässig	gering, da höhere Stabilität im Vergleich zu den zellulären Blutbestandteilen

**Tabelle 2: Vergleich ASST und BAT in der CU-Diagnostik**

	ASST	BAT
Infektionsrisiko für Patienten	möglich	kein Risiko
Antihistaminika-Einnahme	beeinflusst das Testresultat	keine Beeinflussung
Testinterpretation	oft schwierig	einfacher
Therapieüberwachung	schwierig	möglich
Faktoren, die Testresultat beeinflussen	Haut-Dermographismus	keine
Kosten	hoch	gering, da mehrere Patientenproben gleichzeitig analysiert werden können
Aufwand	hoch	

**Referenzen**

- Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 Sep.;88(3 Pt 1):328–338.
- de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;146(3):177–189.
- Hausmann OV, Gentinetta T, Bridts CH, Ebo DG. The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2009 Aug.;29(3):555–566.
- Gentinetta T, Pecaric-Petkovic T, Wan D, Falcone FH, Dahinden CA, Pichler WJ, et al. Individual IL-3 priming is crucial for consistent in vitro activation of donor basophils in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Aug. 18;
- PRAUSNITZ C. The passive transfer of allergy. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1955;6(4-6):260–269.
- Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Hymenoptera venom allergy: taking the sting out of difficult cases. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2007;17(6):357–360.

**ADR-AC GmbH**

Unter Prof. Dr. med. W.J. Pichler wurde 2006 das Spin-off-Unternehmen ADR-AC (adverse drug reactions – analysis & consulting) gegründet. Die Kombination der klinischen und experimentellen Erfahrungen auf dem Gebiet der Arzneimittelallergie ist einzigartig und die Grundlage von ADR-AC. Momentan bieten wir Testungen für den IgE-Nachweis bei vermuteter Arzneimittelallergie an, Tests zur Identifizierung von aktivierenden Serumfaktoren bei Patienten mit chronischer Urtikaria und Testungen für weitere Abklärungen bei der Hymenopterengiftallergie. Weitere Informationen betreffend Vorgehen, Probematerial und Versendung des Untersuchungsmaterials befinden sich auf unserer Website ([www.adr-ac.ch](http://www.adr-ac.ch)).

[www.swissmedlab.ch](http://www.swissmedlab.ch)**Der gläserne Patient**

In der Labormedizin haben Geschlecht, Alter, soziale und kulturelle Faktoren einen erheblichen Einfluss auf die Messwerte.

Im Gesundheitswesen ist eine starke Tendenz zu personalisierter Medizin ersichtlich.

In der Gesellschaft zeigt sich ein zunehmend individualisierter Lebenswandel, Wahlfreiheit wird zum obersten Gebot.

**Herzlich willkommen am Swiss MedLab 12. bis 14. Juni 2012, in Bern**


Dr. Martin Risch  
Präsident SULM  
und OK Swiss MedLab



Prof. Andreas Huber  
Präsident wissenschaftliches Komitee  
Swiss MedLab

**Swiss MedLab-Highlights**

Dienstag, 12. Juni 2012  
Politics-Day

**Das Labor: Kompass auf Behandlungspfaden!?**

Mittwoch, 13. Juni 2012  
Science-Day

**Der gläserne Patient und seine Kompetenz**

Donnerstag, 14. Juni 2012  
Public-Day

**Der alternde Patient, Information vor Prävention**

Anmeldung und Programm:  
[www.swissmedlab.ch](http://www.swissmedlab.ch)

**Major Partners**

**SIEMENS**
**Vom Grundversorger zum Spezialisten**

Die SULM (Schweizerische Union für Labormedizin) ist Organisatorin des Swiss MedLab Kongress. Sie thematisiert alle vier Jahre die aktuellen Entwicklungen der Labormedizin im Rahmen von Swiss MedLab. Man trifft in Bern u.a. Klinische Chemiker, Mikrobiologen, Genetiker, Hämatologen, Endokrinologen, Biomedizinische Analytikerinnen, Med. Praxisassistentinnen und Hausärzte.



Die Labormedizin ist der wohl am stärksten automatisierte Bereich im Gesundheitswesen. Die Spannweite der Geräte reicht von komplexen Laborstrassen mit tausenden Analysen pro Tag bis zu originellen Apps für Smartphones.

**Zukunftsmodelle**

Es sind grosse Herausforderungen, die an Mitarbeitende im Laborbereich gestellt werden. Die Mittel werden knapper, deren Steuerung immer wichtiger. Doch DRG, E-Health, oder Managed Care sind (technische) Modelle, die letztlich nur Dank dem (persönlichen) Engagement der Beteiligten funktionieren werden.

**Zahlen und Fakten**

- Wie kann ein Bereich, der nur 3% der Gesundheitskosten verursacht, in bis zu 60% aller klinischen Diagnosen zu effizienten Ergebnissen führen?
  - Wie kommt es, dass eine Routine-Laboranalyse den DRG-Behandlungspfad aufzeigen kann?
  - Wie helfen Daten dem Patienten, im ausufernden Gesundheitswesen besser den Weg zu finden?
- Fragen wie diese werden am Swiss MedLab-Kongress während drei Tagen aus verschiedenen Perspektiven beleuchtet.

Freier  
Eintritt zur  
Ausstellung