

DOI: <https://doi.org/10.17816/mechnikov71585>

Новые возможности в диагностике бронхиальной астмы с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp.

© Я.И. Козлова, А.Е. Учеваткина, Л.В. Филиппова, О.В. Аак, В.Д. Кузнецов, Е.В. Фролова, Н.В. Васильева, Н.Н. Климко

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Обоснование. Диагностика бронхиальной астмы с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. приобретает все большее значение в связи с тяжелым, неконтролируемым течением заболевания и возможностью формирования аллергического бронхолегочного аспергиллеза.

Цель исследования — оценить возможность применения теста активации базофилов с использованием точной цитометрии для диагностики бронхиальной астмы с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp.

Материалы и методы. Проведено обследование 118 больных аллергической бронхиальной астмой. Уровни общего иммуноглобулина Е (IgE) и специфических IgE к аэроаллергенам определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом. Активацию базофилов изучали методом проточной цитометрии с помощью набора Allerginity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman-Coulter, США). Для стимуляции базофилов в работе использовали аллерген *Aspergillus fumigatus* («Алкор Био», Россия).

Результаты. Первую группу составили 57 больных бронхиальной астмой без сенсibilизации к *Aspergillus* spp. Во вторую группу вошли 36 больных бронхиальной астмой с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. Третью группу составили 25 больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом. Количество базофилов, активированных аллергеном *Aspergillus fumigatus*, у больных бронхиальной астмой с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом было достоверно больше, чем в группе пациентов с бронхиальной астмой, и составило 8,1 [5,2; 20,9] % и 84,6 [75,7; 94,0] % соответственно ($p < 0,001$). Индекс стимуляции в исследуемых группах варьировал от 0,7 до 72,6. Оптимальной диагностической точкой (cut off) для выявления больных бронхиальной астмой с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. было значение индекса стимуляции более 2,4, а для больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом — 15,95. Среди всех больных с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. установлена положительная корреляционная связь уровня специфических IgE к *Aspergillus* spp. с долей активированных аллергеном *Aspergillus fumigatus* базофилов ($r = 0,792$, $p < 0,001$) и индексом стимуляции ($r = 0,796$, $p < 0,05$).

Заключение. Тест активации базофилов может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики бронхиальной астмы с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и аллергического бронхолегочного аспергиллеза. Тест необходим для подтверждения микогенной сенсibilизации в случаях противоречивых или отрицательных результатов кожных тестов и специфических IgE, а также при отсутствии возможности проведения исследований *in vivo*.

Ключевые слова: *Aspergillus* spp.; астма; тест активации базофилов.

Как цитировать:

Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Кузнецов В.Д., Фролова Е.В., Васильева Н.В., Климко Н.Н. Новые возможности в диагностике бронхиальной астмы с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2021. Т. 13. № 2. С. 67–76. DOI: <https://doi.org/10.17816/mechnikov71585>

DOI: <https://doi.org/10.17816/mechnikov71585>

New opportunities in the diagnosis of asthma with sensitization to *Aspergillus* spp.

© Yana I. Kozlova, Alexandra E. Uchevatkina, Larisa V. Filippova, Oleg V. Aak, Valeriy D. Kuznetsov, Ekaterina V. Frolova, Natalia V. Vasilyeva, Nikolay N. Klimko

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

BACKGROUND: Diagnosis of asthma with sensitization to *Aspergillus* spp. is becoming increasingly important due to the severe, uncontrolled course of the disease and the possibility of the formation of allergic bronchopulmonary aspergillosis.

AIM: To evaluate the possibility of using the basophil activation test using flow cytometry for the diagnosis of asthma with sensitization to *Aspergillus* spp.

MATERIALS AND METHODS: 118 patients with asthma were examined. The levels of total IgE and specific IgE to aero-allergens were determined in the blood serum by the enzyme immunoassay. Basophil activation was studied by flow cytometry using the Allergen kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman-Coulter, USA). The allergen *Aspergillus fumigatus* (Alcor Bio, Russia) was used to stimulate basophils.

RESULTS: The first group consisted of 57 patients with asthma without sensitization to *Aspergillus* spp. The second group included 36 patients with asthma with sensitization to *Aspergillus* spp. The third group consisted of 25 patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. The number of basophils activated by the *Aspergillus fumigatus* allergen in patients with asthma with sensitization to *Aspergillus* spp. and allergic bronchopulmonary aspergillosis was significantly higher than in the asthma group and amounted to 8.1 [5.2; 20.9]% and 84.6 [75.7; 94.0]%, respectively ($p < 0.001$). The stimulation index in the study groups ranged from 0.7 to 72.6. The optimal diagnostic point (cut off) for identifying patients with asthma with *Aspergillus* spp. sensitization there was a stimulation index value of more than 2.4, and for patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis — 15.95. Among all patients with sensitization to *Aspergillus* spp. a positive correlation was established between the level of specific IgE to *Aspergillus* spp. and the percentage of basophils activated by the allergen *Aspergillus fumigatus* ($r = 0.792$, $p < 0.001$) and stimulation index ($r = 0.796$, $p < 0.05$).

CONCLUSIONS: The basophil activation test can be used as an additional diagnostic method for asthma with sensitization to *Aspergillus* spp. and allergic bronchopulmonary aspergillosis.

Keywords: *Aspergillus* spp.; asthma; basophil activation test.

To cite this article:

Kozlova YaI, Uchevatkina AE, Filippova LV, Aak OV, Kuznetsov VD, Frolova EV, Vasilyeva NV, Klimko NN. New opportunities in the diagnosis of asthma with sensitization to *Aspergillus* spp. *Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2021;13(2):67–76. DOI: <https://doi.org/10.17816/mechnikov71585>

ОБОСНОВАНИЕ

Бронхиальную астму (БА) относят к наиболее распространенным заболеваниям дыхательной системы среди взрослого населения с высокой социально-экономической значимостью. В настоящее время во всем мире отмечена тенденция к росту распространенности тяжелых форм заболевания [1]. В структуре тяжелой БА важное место занимает БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. [2, 3].

Согласно результатам некоторых исследований до 50 % взрослых с недостаточно контролируемой БА, несмотря на максимальные дозы ингаляционных глюкокортикоидов, сенсibilизированы к *Aspergillus* spp. [4]. Признание важной роли плесневых грибов в патогенезе БА привело к возникновению термина «тяжелая БА с микогенной сенсibilизацией» (severe asthma with fungal sensitisation, SAFS). Это группа больных БА с неконтролируемым течением заболевания и сенсibilизацией к антигенам грибов, отсутствием бронхоэктазов, скоплений слизи и уровнем общего IgE менее 1000 МЕ/мл [5].

По расчетным данным, количество больных тяжелой БА с микогенной сенсibilизацией может достигать 6,5 млн человек в мире и 231 000 человек в Российской Федерации [6, 7].

Кроме того, пациенты с БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. составляют группу риска развития такого тяжелого хронического заболевания легких, как аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА). В то время как, по оценке экспертов, АБЛА страдают около 5 млн человек в мире, заболевание часто не распознают вовремя [6]. Прогрессирование АБЛА ведет к развитию фиброза, дыхательной недостаточности и инвалидизации больных [8, 9].

Для подтверждения гиперчувствительности немедленного типа к *Aspergillus* spp. используют методы *in vivo*, для которых существует ряд противопоказаний, а результаты могут быть противоречивы. В связи с этим в последние десятилетия большое внимание уделяют методам *in vitro*, преимущество которых заключается в безопасности для пациента, специфичности и возможности стандартизации.

Наряду с высокой потребностью в системных глюкокортикоидах, тяжелая БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. ассоциирована с частыми жизнеугрожающими состояниями и высоким риском смерти [10, 11], что позволяет отнести своевременную диагностику данного фенотипа к одной из актуальных проблем современной медицины.

Цель исследования — оценить возможность применения теста активации базофилов с аллергеном *Aspergillus fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для диагностики БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 118 взрослых больных аллергической БА. Уровни общего иммуноглобулина E (IgE) и специфических IgE к грибковым, бытовым и эпидермальным аллергенам в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного анализа, используя тест-систему (ООО «Полигност», Россия) и панель биотинилированных аллергенов («Алкор Био», Россия).

Тест активации базофилов выполняли методом проточной цитометрии с помощью набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman-Coulter, США). Уровень базофилов оценивали с помощью маркеров CD3⁻CRTH2⁺ (CRTH2-хемоаттрактантный рецептор). Количество активированных базофилов определяли по возрастанию экспрессии CD203c на клетках после стимуляции *in vitro*. С этой целью образцы цельной периферической крови окрашивали тройным коктейлем моноклональных антител CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7 в присутствии буферного раствора (отрицательный контроль), или моноклональных антител к IgE (положительный контроль), или аллергена *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия) в течение 15 мин при 37 °C в темноте. Оптимальная концентрация аллергена была установлена в предыдущих исследованиях [12]. Затем проводили лизис эритроцитов лизирующим фиксирующим реагентом, входящим в набор Allergenicity kit. На проточном цитометре Navios Beckman Coulter (США) подсчитывали не менее 500 базофилов в каждой пробе. Оценивали спонтанную активацию базофилов — долю клеток CD3⁻CRTH2⁺CD203c⁺⁺ от общего количества базофилов в пробе с буферным раствором, что позволяет разграничить уровень экспрессии молекул покоящихся клеток по сравнению с состоянием активации клетки. Подсчет числа активированных базофилов после инкубации с анти-IgE-антителами необходим для подтверждения способности базофилов к неспецифической активации для исключения ложноотрицательных реакций и повышения специфичности метода.

Диагноз устанавливали в соответствии с рекомендациями, изложенными в «Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы» (Global Initiative for Asthma, GINA, 2020 г.) [1]. Для выявления микогенной сенсibilизации использовали критерии, предложенные экспертами Международного общества микологии человека и животных (International Society for Human and Animal Mycology, ISHAM): положительный кожный прик-тест (≥ 3 мм) и/или определение в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу I и выше ($\geq 0,35$ МЕ/мл). Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев R. Agarwal и соавт. (2013) [13].

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10 и SPSS Statistics 23. Данные представляли в виде

медианы и нижнего и верхнего квартилей [$Me (Q_1; Q_3)$]. Для оценки различий между независимыми выборками применяли ранговый дисперсионный анализ по Краскелу – Уоллису и непараметрический критерий Манна – Уитни. Взаимосвязь показателей оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки диагностической значимости индекса стимуляции в выявлении микогенной сенсibilизации выполняли ROC-анализ (receiver-operator characteristic) с расчетом площади под ROC-кривой — AUC (area under curve), которая является одной из количественных оценок диагностической эффективности изучаемого показателя. Построение ROC-кривой заключается в расположении на осях X и Y частоты истинно положительных результатов (чувствительность) и ложноположительных результатов (специфичность) для каждой точки разделения. Для выбора оптимального значения точки разделения (порогового значения) использовали максимальное значение суммы чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании результатов клинико-инструментального обследования больные БА были разделены на три группы. Первую группу составили 57 больных БА без сенсibilизации к *Aspergillus* spp., средний возраст — 50 ± 15 лет (женщин — 80,7 %). Во вторую группу вошли 36 больных БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp., средний возраст — 49 ± 14 лет (женщин — 77,8 %). Согласно критериям R. Agarwal и соавт. выделили 25 больных, у которых на фоне

БА сформировался АБЛА. Средний возраст больных в третьей группе составил 45 ± 16 лет (женщин — 64 %). Группы не отличались между собой по полу и возрасту.

Всем больным провели тест активации базофилов с аллергеном *Aspergillus fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии. Результаты представлены в таблице.

Спонтанная активация базофилов у больных БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и в группах сравнения не различалась между собой и колебалась в пределах от 0,6 до 8,3 %. Степень IgE-опосредованной активации базофилов не различалась между группами и колебалась в пределах от 29,6 до 96,9 %.

Количество базофилов, активированных аллергеном *Aspergillus fumigatus*, у больных БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и АБЛА было достоверно больше, чем в группе пациентов с БА, и составило 8,1 [5,2; 20,9] % и 84,6 [75,7; 94,0] % соответственно ($p < 0,001$).

Принято учитывать уровень активации базофилов не только по числу клеток, у которых повысилась экспрессия маркера CD203c в ответ на инкубацию с аллергеном, но по индексу стимуляции (ИС). ИС рассчитывают как отношение доли активированных базофилов в пробе с аллергеном к доли базофилов со спонтанной активацией в отрицательном контроле. ИС в группе больных БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. составил 4,0 [2,5; 11,2]. Показатель достоверно отличался от групп сравнения и занимал промежуточное положение между показателями у больных БА и АБЛА ($p < 0,001$). Следует отметить, что максимальных значений ИС достиг в группе больных АБЛА — 27,7 [21,1; 48,5].

Таблица. Результаты иммунологического обследования больных бронхиальной астмой, $n = 118$

Table. Results of immunological examination of patients with asthma, $n = 118$

Показатели	Первая группа	Вторая группа	Третья группа	Уровень значимости (p)
	БА ($n = 57$)	БА с сенсibilизацией к <i>Aspergillus</i> spp. ($n = 36$)	АБЛА ($n = 25$)	
Уровень специфических IgE к <i>Aspergillus</i> , МЕ/мл	0,02 [0,00; 0,05]	0,90 [0,56; 1,27]	2,20 [1,15; 7,13]	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$
Спонтанная активация базофилов, %	2,6 [1,8; 4,4]	2,3 [1,5; 3,1]	2,3 [1,5; 4,3]	$p_{1-2} = 0,12$ $p_{1-3} = 0,59$ $p_{2-3} = 0,45$
IgE-опосредованная активация базофилов, %	71,9 [60,0; 81,7]	74,2 [63,1; 87,3]	74,5 [67,0; 88,1]	$p_{1-2} = 0,34$ $p_{1-3} = 0,21$ $p_{2-3} = 0,72$
Количество активированных базофилов, %	3,6 [2,3; 5,5]	8,1 [5,2; 20,9]	84,6 [75,7; 94,0]	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$
Индекс стимуляции	1,2 [1,0; 1,5]	4,0 [2,5; 11,2]	27,7 [21,1; 48,5]	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$

Примечание. БА — бронхиальная астма; АБЛА — аллергический бронхолегочный аспергиллез; IgE — иммуноглобулины E.

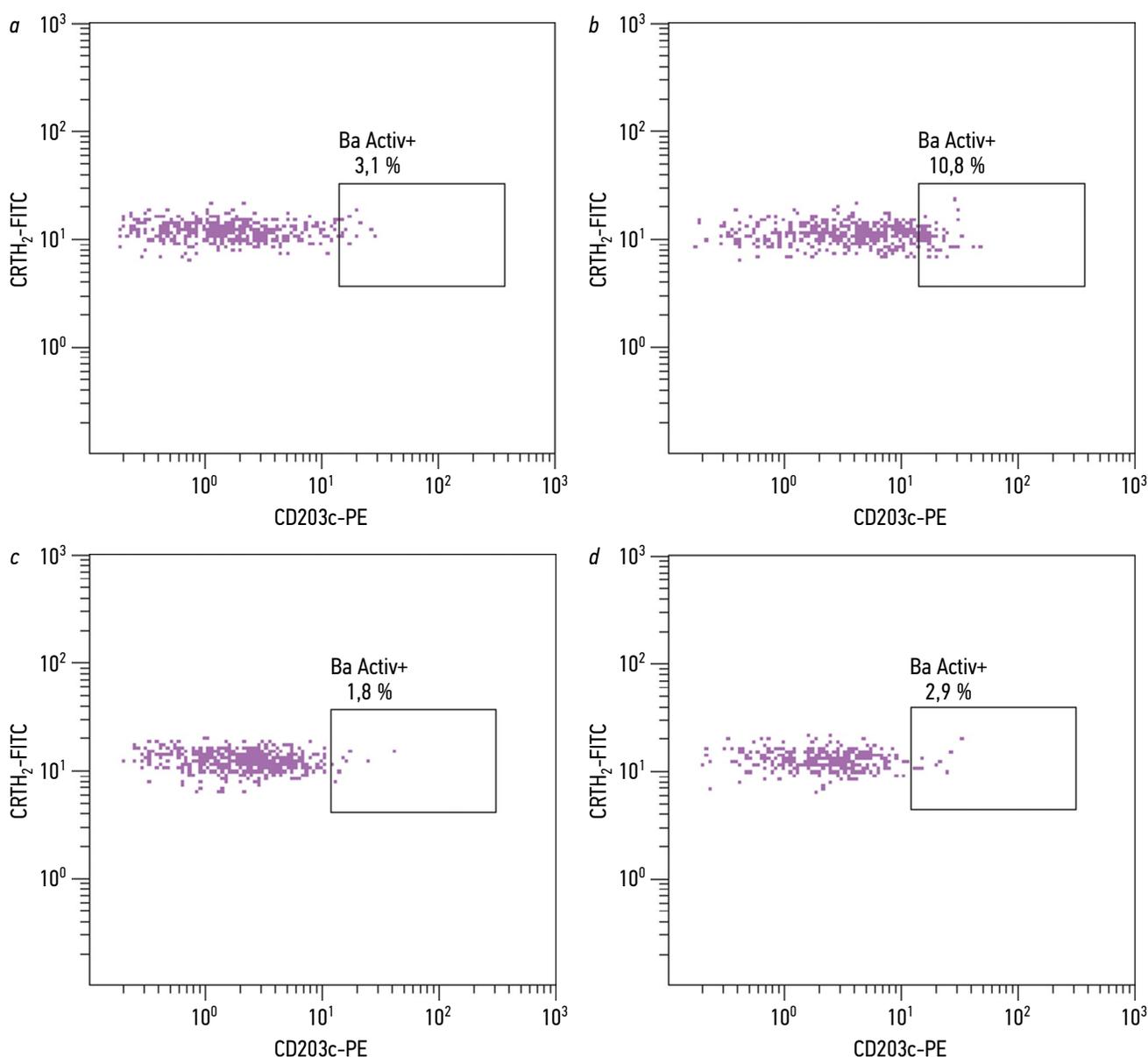


Рис. 1. Тест активации базофилов у больных бронхиальной астмой. Пациент С. (a, b) и пациент Д. (c, d) на этапе итогового гейтирования базофилов ($CD3^+CRTH2^+CD203c^{++}$) после спонтанной (a, c) и специфической *Aspergillus fumigatus* (b, d) активации. Большая доля активированных базофилов (b) подтверждает наличие сенсibilизации

Fig. 1. Basophil activation test in patients with asthma. Patients С. (a, b) and patients D. (c, d) at the final basophil gating ($CD3^+CRTH2^+CD203c^{++}$) after the spontaneous (a, c) and specific *Aspergillus fumigatus* (b, d) activation. High percentage of the activated basophils (b) confirms the sensibility

Примеры гистограмм теста активации базофилов у больных БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и без сенсibilизации к *Aspergillus* spp. представлены на рис. 1.

Для оценки диагностической значимости теста активации базофилов в выявлении сенсibilизации к *Aspergillus* spp. выполняли ROC-анализ с расчетом площади под кривой. В нашем исследовании ИС колебался от 0,7 до 72,6 у больных с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и от 0,7 до 4,2 у больных без сенсibilизации к *Aspergillus* spp. AUC составила 0,883 (95 % ДИ 0,809–0,956), чувствительность — 86,9 % (95 % ДИ 76,2–93,2), а специфичность — 94,7 % (95 % ДИ 85,6–98,2) ($p < 0,001$). Это указывает

на высокую специфичность и чувствительность метода, а значение ИС более 2,4 является оптимальной точкой разделения (cut off) для выявления микогенной сенсibilизации с высоким уровнем достоверности у больных БА.

На следующем этапе у больных с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. было определено значение ИС для диагностики АБЛА. AUC составила 0,887 (95 % ДИ 0,800–0,972), чувствительность — 96,0 % (95 % ДИ 80,5–99,3), а специфичность — 80,6 % (95 % ДИ 65,0–90,3) ($p < 0,001$). Таким образом, значение ИС более 15,95 является оптимальной точкой разделения (cut off) для выявления больных АБЛА.

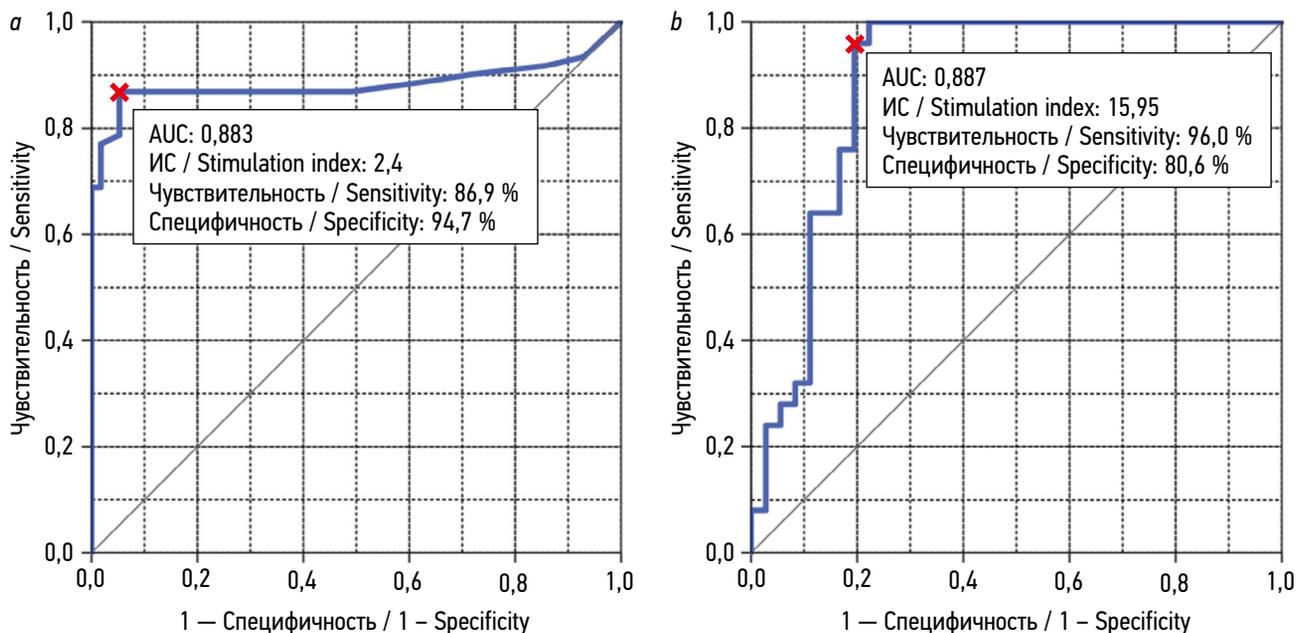


Рис. 2. Кривые ROC, иллюстрирующие оптимальные точки отсечения (cut off) индекса стимуляции (ИС) для выявления сенсбилизации к *Aspergillus* spp. у больных бронхиальной астмой (а) и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (б)

Fig. 2. ROC curves illustrating the optimal cut off points of the index stimulation to detect sensitization to *Aspergillus* spp. patients with asthma (a) and ABPA (b)

Среди всех больных с сенсбилизацией к *Aspergillus* spp. установлена положительная корреляционная связь уровня специфических IgE к *Aspergillus* spp. к доле активированных аллергеном *Aspergillus fumigatus* базофилов ($r = 0,792$, $p < 0,001$) и ИС ($r = 0,796$, $p < 0,05$). Полученные данные подтверждают взаимосвязь теста активации базофилов со стандартным определением уровня IgE к грибковым аллергенам и позволяют использовать его в диагностике гиперчувствительности немедленного типа к *Aspergillus* spp. у больных БА.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подтверждение гиперчувствительности к *Aspergillus* spp. — важный диагностический этап у больных тяжелой БА с сенсбилизацией к *Aspergillus* spp. и АБЛА. Известные в настоящее время варианты лабораторно-инструментальных методов не всегда могут удовлетворить потребности клиницистов. Следует помнить, что ингаляционный тест с антигенами *Aspergillus* spp. ассоциирован с риском развития фатального бронхоспазма и не рекомендован для применения в клинической практике [13, 14]. В то время как для проведения провокационных и кожных тестов существует ряд противопоказаний, особенную актуальность приобретают методы диагностики *in vitro* [15]. Однако получаемые результаты не всегда достоверны и воспроизводимы в различных лабораториях. Известно, что IgE, уровень которых определяют во всех диагностических алгоритмах, характеризуются незначительным содержанием в сыворотке крови. Кроме того, иммуноглобулины этого

класса могут отсутствовать в циркуляции, но быть фиксированы на клетках-мишенях — базофилах и тучных клетках [16].

Одним из наиболее перспективных направлений алергодиагностики *in vitro* является тест активации базофилов специфическими аллергенами с помощью точной цитометрии [17–19]. Преимущество теста состоит в расширении показаний для пациентов, безопасности и возможности стандартизации.

Роль базофилов в иммунной регуляции и аллергическом ответе в последние годы была переоценена. Установлено, что клетки, стимулирующие Th2-клеточную дифференцировку путем секреции цитокинов и антигенной презентации, участвуют в развитии IgE-опосредованного хронического аллергического воспаления и играют ключевую роль в IgG-опосредованной системной анафилаксии [20].

Помимо того что базофилы периферической крови и тканевые тучные клетки представляют первичные эффекторные клетки в IgE-опосредованных аллергических реакциях, они также могут быть вовлечены и в другие типы аллергического и неаллергического ответа, в основе которых лежат иные механизмы реакции (активация комплемента, не-IgE-опосредованная стимуляция и прямое цитотоксическое воздействие). Таким образом, изучение функциональной активности базофилов имеет большое диагностическое значение [21].

Принцип теста активации базофилов сводится к тому, что при контакте аллергена с молекулами IgE, фиксированных на базофилах, запускается каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции и появлению

на клеточной поверхности дополнительных молекул. В настоящее время наиболее изученными и перспективными в аллергодиагностике маркерами активации базофилов являются CD63 и CD203c [22–24]. Идентификацию базофилов, а также оценку экспрессии маркеров активации и дегрануляции осуществляют при помощи проточного цитометра.

В нашем исследовании использовали маркер CD203c (невральный антиген поверхностно-клеточной дифференциации, E-NPP3). Это гликозилированный тип II трансмембранной молекулы, принадлежащий семейству эктонуклеотидов пирофосфатаз/фосфодиэстераз — ферментов, катализирующих гидролиз олигонуклеотидов, нуклеозидов фосфатаз и NAD. Среди клеток в гемопозе поверхностный E-NPP3 представлен исключительно на базофилах [25]. В малых количествах он определяется на поющих клетках. После активации клетки уровень CD203c возрастает на 350 % [26].

Таким образом, тест активации базофилов с помощью проточной цитометрии — доступный и перспективный метод лабораторной диагностики гиперчувствительности немедленного типа. В настоящее время опубликованы данные зарубежных и отечественных авторов о применении теста активации базофилов в диагностике инсектной, пищевой, пыльцевой, лекарственной аллергии, а также хронической крапивницы [17–19, 27, 28]. Особенно полезен тест активации базофилов у больных с микогенной аллергией, так как в настоящее время диагностические грибковые аллергены для кожного тестирования в Российской Федерации не зарегистрированы.

Исследования по выявлению сенсibilизации к *Aspergillus* spp. с помощью теста активации базофилов немногочисленны и были проведены у больных муковисцидозом. Согласно результатам Gernez и соавт., тест активации базофилов позволил дифференцировать колонизацию дыхательных путей и сенсibilизацию к *Aspergillus* в этой группе больных. Опубликован ряд работ, в которых тест активации базофилов в сочетании с определением специфических IgE к *Aspergillus* и общего IgE способствовал своевременному выявлению АБЛА у больных муковисцидозом [29–31]. Эти данные

согласуются с результатами наших предыдущих исследований [12].

Полученные в ходе настоящего исследования результаты свидетельствуют, что тест может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и АБЛА. Тест можно проводить для подтверждения микогенной сенсibilизации в случаях противоречивых или отрицательных результатов кожных тестов и специфических IgE, а также при отсутствии возможности выполнения исследования *in vivo*.

Важное преимущество метода заключается в том, что тест активации базофилов с аллергеном *Aspergillus fumigatus* проводят менее чем за 2 ч, для него необходим небольшой объем цельной периферической крови. Это можно сделать в том же образце крови, который применяют для других иммунологических исследований, что существенно уменьшает дискомфорт для пациента. Кроме того, получение количественных результатов позволяет использовать тест активации базофилов как инструмент дифференциальной диагностики БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. и АБЛА. Своевременное выявление этих двух заболеваний респираторного тракта, связанных с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp., имеет большое значение для определения дальнейшей терапевтической тактики.

ВЫВОДЫ

1. У больных БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. с помощью теста активации базофилов была подтверждена микогенная сенсibilизация.
2. Пороговое значение ИС для выявления БА с сенсibilизацией к *Aspergillus* spp. составило 2,4, для АБЛА — 15,95.
3. Тест активации базофилов можно рассматривать для подтверждения микогенной сенсibilизации в случаях противоречивых или отрицательных результатов кожных тестов и специфических IgE, а также при отсутствии возможности проведения исследования *in vivo*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ginasthma.org [Электронный ресурс]. The Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2020. Режим доступа: <http://www.ginasthma.org/>. Дата обращения: 19.05.2020.
2. Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization // Curr. Allergy. Asthma Rep. 2011. Vol. 11, No. 5. P. 403–413. DOI: 10.1007/s11882-011-0217-4
3. Rick E., Woolnough K., Pashley C., Wardlaw A.J. Allergic fungal airway disease // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2016. Vol. 26, No. 6. P. 344–354. DOI: 10.18176/jiaci.0122
4. Agarwal R., Nath A., Aggarwal A.N. et al. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in pa-

tients with acute severe asthma in a respiratory intensive care unit in North India // Mycoses. 2010. Vol. 53, No. 2. P. 138–143. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01680x

5. Denning D., O'Driscoll B., Hogaboam C. et al. The link between fungi and asthma: A summary of the evidence // Eur. Respir. J. 2006. Vol. 27, No. 3. P. 615–626. DOI: 10.1183/09031936.06.00074705

6. Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults // Med. Mycol. 2013. Vol. 51, No. 4. P. 361–370. DOI: 10.3109/13693786.2012.738312

7. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний

в Российской Федерации по модели LIFE program // Проблемы медицинской микологии. 2014. Т. 16, № 1. С. 3–9.

8. Kosmidis C., Denning D. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis // *Thorax*. 2015. Vol. 70, No. 3. P. 270–277. DOI: 10.1136/thoraxjnl.2014.206291

9. Agarwal R., Aggarwal A., Gupta D., Jindal S.K. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analysis // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2009. Vol. 13, No. 8. P. 936–944.

10. Goh K.J., Yii A.C.A., Lapperre T.S. et al. Sensitization to *Aspergillus* species is associated with frequent exacerbations in severe asthma // *J. Asthma Allergy*. 2017. Vol. 10. P. 131–140. DOI: 10.2147/JAA.S130459

11. Fairs A., Agbetile J., Hargadon B. et al. IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is associated with reduced lung function in asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010. Vol. 182, No. 11. P. 1362–1368. DOI: 10.1164/rccm.201001.00870C

12. Козлова Я.И., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е. и др. Тест активации базофилов для диагностики аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных муковисцидозом // *Медицинская иммунология*. 2019. Т. 21, № 5. С. 919–928. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928

13. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A. et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria // *Clin. Exp. Allergy*. 2013. Vol. 43, No. 8. P. 850–873. DOI: 10.1111/cea.12141

14. Agarwal R., Hazarika B., Gupta D. et al. *Aspergillus* hypersensitivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: COPD as a risk factor for ABPA? // *Med. Micol.* 2010. Vol. 48, No. 7. P. 988–994. DOI: 10.3109/13693781003743148

15. Oppenheimer J., Nelson H.S. Skin testing // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2006. Vol. 96, No. 2 Suppl 1. P. S6–12. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60895-2

16. Karasuyama H., Tsujimura Y., Obata K., Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis // *Chem. Immunol. Allergy*. 2010. Vol. 95. P. 85–87. DOI: 10.1159/000315939

17. Sanz M.L., Gamboa P.M., De Weck A.L. Cellular tests in the diagnosis of drug hypersensitivity // *Curr. Pharm. Des.* 2008. Vol. 14, No. 27. P. 2803–2808. DOI: 10.2174/138161208786369722

18. Hausmann O.V., Gentinetta T., Bridts C.H., Ebo D.G. The basophil activation test in immediate-type drug allergy // *Immunol. Allergy Clin. North. Am.* 2009. Vol. 29, No. 3. P. 555–566. DOI: 10.1016/j.jiac.2009.04.011

19. Potapińska O., Górska E., Zawadzka-Krajewska A. et al. The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and *Dermatophagoides pteronyssinus* antigens. Preliminary study // *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009. Vol. 77, No. 2. P. 138–144. (In Polish)

20. Knol E.F., Mul F.P., Jansen H. et al. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435 // *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991. Vol. 88, No. 3 Pt 1. P. 328–338. DOI: 10.1016/0091-6749(91)90094-5

21. Kang M.G., Song W.J., Park H.K. et al. Basophil activation test with food additives in chronic urticarial patients // *Clin. Nutr. Res.* 2014. Vol. 3, No. 1. P. 9–16. DOI: 10.7762/2Fcr.2014.3.1.9

22. Boumiza R., Debard A.L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent development in clinical studies, standardization and emerging perspectives // *Clin. Mol. Allergy*. 2005. Vol. 3. P. 9. DOI: 10.1186/1476-7961-3-9

23. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R. et al. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach // *Clin. Mol. Allergy*. 2008. Vol. 6. P. 12. DOI: 10.1186/1476-7961-6-12

24. Mikkelsen S., Bibby B.M., Dolberg M.K.B. et al. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy // *Clin. Mol. Allergy*. 2010. Vol. 8, No. 1. P. 2. DOI: 10.1186/1476-7961-8-2

25. Buhring H.J., Seiffert M., Giesert C. et al. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 // *Blood*. 2001. Vol. 97, No. 10. P. 3303–3305. DOI: 10.1182/blood.v97.10.3303

26. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R. et al. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach // *Clin. Mol. Allergy*. 2008. Vol. 6. P. 12. DOI: 10.1186/1476-7961-6-12

27. Шабанов Д.В., Лазаренко Л.Л., Федоскова Т.Г., Рыбникова Е.А. Особенности диагностики аллергии к яду перепончатокрылых насекомых // *Российский медицинский журнал*. 2019. Т. 27, № 3. С. 40–44.

28. Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Особенности иммунного ответа и активации базофилов у детей с хронической крапивницей // *Медицинская иммунология*. 2015. Т. 17, № 1. С. 39–46. DOI: 10.15789/1563-0625-2015-1-39-46

29. Gernez Y., Dunn C.E., Everson C. et al. Blood basophils from cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis are primed and hyper-responsive to stimulation by *aspergillus* allergens // *J. Cyst. Fibros.* 2012. Vol. 11, No. 6. P. 502–510. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.04.008

30. Gernez Y., Waters J., Mirković B. et al. Blood basophil activation is a reliable biomarker of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis // *Eur. Respir. J.* 2016. Vol. 47, No. 1. P. 177–185. DOI: 10.1183/13993003.01068-2015

31. Mircovic B., Lavelle G.M., Azim A.A. et al. The basophil surface marker CD203C identifies *Aspergillus* species sensitization in patients with cystic fibrosis // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. Vol. 137, No. 2. P. 436–443. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.07.045

REFERENCES

1. Ginasthma.org [Internet]. The Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2020. Available from: <http://www.ginasthma.org/>. Accessed: 19.05.2020.

2. Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011;11(5):403–413. DOI: 10.1007/s11882-011-0217-4

3. Rick E, Woolnough K, Pashley C, Wardlaw AJ. Allergic fungal airway disease. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016;26(6):344–354. DOI: 10.18176/jiaci.0122

4. Agarwal R, Nath A, Aggarwal AN, et al. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with acute severe asthma in a respiratory inten-

- sive care unit in North India. *Mycoses*. 2010;53(2):138–143. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01680x
5. Denning D, O'Driscoll B, Hogaboam C, et al. The link between fungi and asthma: A summary of the evidence. *Eur Respir J*. 2006;27(3):615–626. DOI: 10.1183/09031936.06.00074705
6. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med Mycol*. 2013;51(4):361–370. DOI: 10.3109/13693786.2012.738312
7. Klimko NN, Kozlova YI, Khostelidi SN, et al. The prevalence of serious and chronic fungal diseases in Russian Federation on LIFE program model. *Problems in medical mycology*. 2014;16(1):3–9. (In Russ.)
8. Kosmidis C, Denning D. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70(3):270–277. DOI: 10.1136/thoraxjnl.2014.206291
9. Agarwal R, Aggarwal A, Gupta D, Jindal SK. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(8):936–944.
10. Goh KJ, Yii ACA, Lapperre TS, et al. Sensitization to *Aspergillus* species is associated with frequent exacerbations in severe asthma. *J Asthma Allergy*. 2017;10:131–140. DOI: 10.2147/JAA.S130459
11. Fairs A, Agbetile J, Hargadon B, et al. IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is associated with reduced lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(11):1362–1368. DOI: 10.1164/rccm.201001.00870C
12. Kozlova YI, Frolova EV, Uchevatkina AE, et al. Basophile activation test for the diagnostics of fungal sensitization in the patients with cystics fibrosis. *Medical Immunology*. 2019;21(5):919–928. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928
13. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(8):850–873. DOI: 10.1111/cea.12141
14. Agarwal R, Hazarika B, Gupta D, et al. *Aspergillus* hypersensitivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: COPD as a risk factor for ABPA? *Med Micol*. 2010;48(7):988–994. DOI: 10.3109/13693781003743148
15. Oppenheimer J, Nelson HS. Skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96(2 Suppl 1):S6–12. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60895-2
16. Karasuyama H, Tsujimura Y, Obata K, Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy*. 2010;95:85–87. DOI: 10.1159/000315939
17. Sanz ML, Gamboa PM, De Weck AL. Cellular tests in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Curr Pharm Des*. 2008;14(27):2803–2808. DOI: 10.2174/138161208786369722
18. Hausmann OV, Gentinetta T, Bridts CH, Ebo DG. The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29(3):555–566. DOI: 10.1016/j.iac.2009.04.011
19. Potapińska O, Górka E, Zawadzka-Krajewska A, et al. The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and Dermatophagoides pteronyssinus antigens. Preliminary study. *Pneumonol Alergol Pol*. 2009;77(2):138–144. (In Polish)
20. Knol EF, Mul FP, Jansen H, et al. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(3 Pt 1):328–338. DOI: 10.1016/0091-6749(91)90094-5
21. Kang MG, Song WJ, Park HK, et al. Basophil activation test with food additives in chronic urticaria patients. *Clin Nutr Res*. 2014;3(1):9–16. DOI: 10.7762/2Fcnr.2014.3.1.9
22. Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent development in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy*. 2005;3:9. DOI: 10.1186/1476-7961-3-9
23. Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, et al. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*. 2008;6:12. DOI: 10.1186/1476-7961-6-12
24. Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MKB, et al. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin Mol Allergy*. 2010;8(1):2. DOI: 10.1186/1476-7961-8-2
25. Buhning HJ, Seiffert M, Giesert C, et al. The basophil activation marker deined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*. 2001;97(10):3303–3305. DOI: 10.1182/blood.v97.10.3303
26. Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, et al. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*. 2008;6:12. DOI: 10.1186/1476-7961-6-12
27. Shabanov DV, Lazarenko LL, Fedoskova TG, Rybnikova EA. Diagnostics of Hymenoptera venom allergy. *Russian medical journal*. 2019;27(3):40–44. (In Russ.)
28. Sinelnikova NA, Bychkova NV, Kalinina NM. Features of immune response and basophil activation in children with chronic urticaria. *Medical Immunology (Russia)*. 2015;17(1):39–46. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2015-1-39-46
29. Gernez Y, Dunn CE, Everson C, et al. Blood basophils from cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis are primed and hyper-responsive to stimulation by aspergillus allergens. *J Cyst Fibros*. 2012;11(6):502–510. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.04.008
30. Gernez Y, Waters J, Mirković B, et al. Blood basophil activation is a reliable biomarker of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2016;47(1):177–185. DOI: 10.1183/13993003.01068-2015
31. Mircovic B, Lavelle GM, Azim AA, et al. The basophil surface marker CD203C identifies *Aspergillus* species sensitization in patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(2):436–443. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.07.045

ОБ АВТОРАХ

*Яна Игоревна Козлова, канд. мед. наук, доцент;
адрес: Россия, 194291, Санкт-Петербург,
ул. Сантьяго-де-Куба, д. 1/28;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4602-2438>;
eLibrary SPIN: 5842-6039; e-mail: kozlova510@mail.ru

AUTHORS INFO

*Yana I. Kozlova, MD, Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor;
address: 1/28 Santiago de Cuba str.,
Saint Petersburg, 194291, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4602-2438>;
eLibrary SPIN: 5842-6039; e-mail: kozlova510@mail.ru

ОБ АВТОРАХ

Александра Евгеньевна Учеваткина, канд. мед. наук;
eLibrary SPIN: 3001-4022; e-mail: a.uchevatkina@szgmu.ru

Лариса Вячеславовна Филиппова, канд. мед. наук;
eLibrary SPIN: 6810-0871; e-mail: larisa.filippova@szgmu.ru

Олег Владимирович Аак, канд. хим. наук;
eLibrary SPIN: 1198-7810; e-mail: oleg.aak@szgmu.ru

Валерий Дмитриевич Кузнецов, аспирант;
e-mail: valeriy_smith@inbox.ru

Екатерина Васильевна Фролова, канд. мед. наук;
eLibrary SPIN: 9904-8776; e-mail: ekaterina.frolova@szgmu.ru

Наталья Всеволодовна Васильева, д-р биол. наук,
профессор, заслуженный деятель науки РФ;
eLibrary SPIN: 9215-4069; e-mail: mycobiota@szgmu.ru

Николай Николаевич Клишко, д-р мед. наук, профессор;
e-mail: n_klimko@mail.ru

AUTHORS INFO

Alexandra E. Uchevatkina, MD, Cand. Sci. (Med.);
eLibrary SPIN: 3001-4022; e-mail: a.uchevatkina@szgmu.ru

Larisa V. Filippova, MD, Cand. Sci. (Med.);
eLibrary SPIN: 6810-0871; e-mail: larisa.filippova@szgmu.ru

Oleg V. Aak, Cand. Sci. (Chem.);
eLibrary SPIN: 1198-7810; e-mail: oleg.aak@szgmu.ru

Valeriy D. Kuznetsov, PhD student;
e-mail: valeriy_smith@inbox.ru

Ekaterina V. Frolova, MD, Cand. Sci. (Med.);
eLibrary SPIN: 9904-8776; e-mail: ekaterina.frolova@szgmu.ru

Natalya V. Vasilyeva, Dr. Sci. (Biol.),
Professor, Honoured Science Worker;
eLibrary SPIN: 9215-4069; e-mail: mycobiota@szgmu.ru

Nikolay N. Klimko, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
e-mail: n_klimko@mail.ru