

ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МИКОГЕННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Козлова Я.И.¹, Фролова Е.В.¹, Учеваткина А.Е.¹, Филиппова Л.В.¹,
Аак О.В.¹, Богомолова Т.С.¹, Борзова Ю.В.¹, Махмутова В.Р.²,
Степаненко Т.А.², Кузнецов В.Д.¹, Васильева Н.В.¹, Шульгина М.В.¹,
Климко Н.Н.¹

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»,
Санкт-Петербург, Россия

² Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Колонизация *Aspergillus fumigatus* у больных муковисцидозом (МВ) может вызвать сенсibilизацию к *A. fumigatus* и/или аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА), что значительно ухудшает течение основного заболевания. В настоящее время идет поиск новых диагностических тестов, которые позволят выявить микогенную сенсibilизацию у данной категории больных. Целью настоящей работы явилась оценка возможности применения теста активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для выявления микогенной сенсibilизации у больных МВ. Обследовали 190 больных МВ в возрасте от 1 до 37 лет. Всем пациентам провели аллергологическое (кожные тесты с грибковыми аллергенами, определение в сыворотке уровня общего IgE и специфических IgE (sIgE) к грибковым аллергенам) и микологическое (микроскопия и посев респираторных субстратов) обследование. По показаниям выполняли компьютерную томографию органов грудной клетки. Тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* выполнили 10 больным МВ с АБЛА и 10 больным МВ без АБЛА в дополнение к стандартному аллергологическому обследованию. У больных муковисцидозом частота сенсibilизации к *A. fumigatus* составила 27%, частота развития аллергического бронхолегочного аспергиллеза – 5,7%. Количество эозинофилов, уровни общего IgE и sIgE к *A. fumigatus* у больных МВ с АБЛА достоверно превышали значения пациентов с МВ без АБЛА. В крови больных МВ с АБЛА определено 68,5 (52,5-81,5) % базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus*, индекс стимуляции составил 17,07 (10,30-27,70). В группе сравнения индекс стимуляции не превышал значения 1,5 ($p = 0,000$). Установлена прямая положительная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и количеством базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus* ($r = 0,77$; при $p < 0,05$). У больных МВ с АБЛА достоверно ниже показатели ФЖЕЛ и индекса массы тела по сравнению с пациентами без микогенной сенсibilизации. Использование теста активации базофилов, наряду с традиционными показателями, по-

Адрес для переписки:

Козлова Яна Игоревна
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
194291, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28.
Тел.: 8 (812) 303-51-40.
Факс: 8 (812) 510-62-77.
E-mail: kozlova510@mail.ru

Address for correspondence:

Kozlova Yana I.
I. Mechnikov North-Western State Medical University
194291, Russian Federation, St. Petersburg,
Santiago de Cuba str., 1/28.
Phone: 7 (812) 303-51-40.
Fax: 7 (812) 510-62-77.
E-mail: kozlova510@mail.ru

Образец цитирования:

Я.И. Козлова, Е.В. Фролова, А.Е. Учеваткина,
Л.В. Филиппова, О.В. Аак, Т.С. Богомолова,
Ю.В. Борзова, В.Р. Махмутова, Т.А. Степаненко,
В.Д. Кузнецов, Н.В. Васильева, М.В. Шульгина,
Н.Н. Климко «Тест активации базофилов
для диагностики микогенной сенсibilизации у больных
муковисцидозом» // Медицинская иммунология, 2019,
Т. 21, № 5. С. 919-928.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928

© Козлова Я.И. и соавт., 2019

For citation:

Ya.I. Kozlova, E.V. Frolova, A.E. Uchevatkina,
L.V. Filippova, O.V. Aak, T.S. Bogomolova, Yu.V. Borzova,
V.R. Makhmutova, T.A. Stepanenko, V.D. Kuznetsov,
N.V. Vasilyeva, M.V. Shulgina, N.N. Klimko "Basophile
activation test for the diagnostics of fungal sensitization in the
patients with cystic fibrosis", *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 5,
pp. 919-928.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-919-928

зволит более дифференцированно подходить к оценке развития АБЛА у больных МВ. Своевременная идентификация ассоциированного с грибами рода *Aspergillus* клинического статуса больных МВ будет способствовать раннему и эффективному назначению специфической терапии.

Ключевые слова: тест активации базофилов, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, аллергический бронхолегочный аспергиллез, муковисцидоз, микогенная сенсибилизация

BASOPHILE ACTIVATION TEST FOR THE DIAGNOSTICS OF FUNGAL SENSITIZATION IN THE PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

Kozlova Ya.I.^a, Frolova E.V.^a, Uchevatkina A.E.^a, Filippova L.V.^a, Aak O.V.^a, Bogomolova T.S.^a, Borzova Yu.V.^a, Makhmutova V.R.^b, Stepanenko T.A.^b, Kuznetsov V.D.^a, Vasilyeva N.V.^a, Shulgina M.V.^a, Klimko N.N.^a

^a I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Multidisciplinary City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Aspergillus fumigatus* colonization in the patients with cystic fibrosis (CF) may cause sensitization against *A. fumigatus* and/or allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), which significantly worsens the course of underlying disease. At the present time, new diagnostic tests are searched for detection of fungal sensitization in these patients. The aim of this work was to evaluate an opportunity of application of basophile activation test with *A. fumigatus* allergen *in vitro* using flow cytometry, aiming for identification of fungal sensitization in the CF patients. The study included 190 patients with CF aged 1 to 37 years. All the patients underwent common allergy screening (skin tests with fungal allergens, determination of serum levels of total IgE and specific IgE for the fungal allergens), and mycological examination (microscopy and culture of respiratory substrates). Computed tomography of the chest was performed upon clinical indications. The basophil activation test with the *A. fumigatus* allergen was performed in 10 CF patients with ABPA, and 10 CF patients without ABPA, in addition to the standard allergological examination. Frequency of sensitization to *A. fumigatus* in the patients with cystic fibrosis was 27%, the incidence of allergic bronchopulmonary aspergillosis was 5.7%. The number of eosinophils, total IgE and specific IgE levels in CF patients with ABPA were significantly higher than in CF patients without ABPA. In blood of the ABPA patients we have identified 68.5 (52.5–81.5%) of basophilic leukocytes activated by *A. fumigatus* allergen, with a stimulation index of 17.07 (10.30–27.70). In appropriate comparison group, the stimulation index did not exceed 1.5 ($p = 0.000$). Direct positive correlation between the levels of specific IgE to *A. fumigatus* and the number of basophils activated by *A. fumigatus* allergens was revealed ($r = 0.77$; $p < 0.05$). FVC values and the body mass index in CF patients with ABPA were significantly lower when compared with the patients without fungal sensitization. Introduction of the basophil activation test, along with standard techniques, may enable a more differentiated assessment of ABPA development in CF patients. Timely detection of associations between *A. fumigatus* sensitization and clinical status of CF patients will facilitate early and effective administration of specific therapy.

Keywords: basophil activation test, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, allergic bronchopulmonary aspergillosis, cystic fibrosis, fungal sensitization

Введение

Муковисцидоз (МВ) — частое моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена трансмембранного регулятора МВ (МВТР), который является каналом для активного перемещения ионов хлора, а также регулятором обратного всасывания ионов натрия, и характеризующееся поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем [2, 13].

Больные МВ представляют одну из самых тяжелых категорий пульмонологических пациентов. Поражение легких при МВ, в основе которого лежит хронический инфекционный процесс, по-прежнему остается основной причиной смертности больных. Отсутствие или недостаточность МВТР в бронхолегочном эпителии способствует продукции большого количества вязкого слизистого секрета. Это обеспечивает

благоприятные условия для колонизации дыхательных путей различными патогенными микроорганизмами, в том числе и плесневыми микромицетами [8, 11].

Роль бактериальных патогенов при МВ довольно хорошо изучена. Наряду с распространенными возбудителями, такими как *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa*, в последние годы все большее клиническое значение приобретают плесневые микромицеты. Частота выделения микромицетов из респираторных субстратов больных МВ варьирует от 6 до 57% [26]. Особое внимание исследователи уделяют широкому спектру заболеваний, ассоциированных с грибами рода *Aspergillus*.

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) — наиболее часто встречающаяся форма аспергиллеза у больных муковисцидозом [13, 15, 24]. АБЛА поражает от 2 до 15% больных МВ и существенно отягощает основное заболевание [4, 19]. Для классической клинической картины АБЛА характерно наличие транзиторных или персистирующих инфильтратов в легких, болей в грудной клетке, бронхоэктазов, формирование легочного фиброза и дыхательной недостаточности. Заболевание обычно протекает хронически, с периодическими обострениями бронхообструктивного синдрома и/или эозинофильной пневмонии [3].

Диагностика АБЛА при муковисцидозе сложна, поскольку многие диагностические критерии пересекаются с типичными проявлениями основного заболевания. Недавние исследования показывают, что сенсibilизация к *A. fumigatus* связана с более существенным снижением функции легких и увеличением частоты легочных обострений у больных МВ [5, 14, 23]. Поэтому раннее выявление микогенной сенсibilизации чрезвычайно важно для своевременного установления диагноза АБЛА и назначения адекватной терапии, которая предотвратит прогрессирование поражения легких.

Цель исследования — изучение возможности применения теста активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для выявления микогенной сенсibilизации у больных муковисцидозом.

Материалы и методы

Обследовали 190 больных МВ в возрасте от 1 до 37 лет (медиана — 14 лет): мужчин — 96, женщин — 94, из них детей — 130, взрослых — 60.

Обследование больных включало сбор анамнестических данных (первые симптомы заболевания и время их появления, динамика развития, возможный контакт с плесневыми грибами дома

или на работе), а также оценку результатов общеклинических, лабораторных, инструментальных методов диагностики.

Микологическое обследование включало микроскопию и культуральное исследование образцов респираторных биосубстратов: мокрота, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). При микроскопии использовали нативный препарат или окраску калькофлюором белым, отмечали наличие септированного мицелия, ветвящегося под углом 45°. Материал засеивали на среду Сабуро, посеы инкубировали при 37 °С в течение 10 дней. Полученные культуры грибов рода *Aspergillus* идентифицировали по морфологическим признакам.

Аллергологическое обследование включало кожное тестирование с 6 грибковыми аллергенами: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida* (Allergopharma, Германия). Методом иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE (sIgE) к грибковым аллергенам (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия) в сыворотке крови.

Для выявления микогенной сенсibilизации дополнительно 10 больным МВ с АБЛА и 10 больным МВ без АБЛА провели тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия).

Кровь для теста активации базофилов забирали натошак из кубитальной вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Постановку исследуемых проб осуществляли в течение 1–2 часов от момента забора крови. Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman Coulter, США). Идентификацию базофилов осуществляли с помощью маркеров CD3-CRTH2⁺ (CRTH2-хемоаттрактантный рецептор, который присутствует как на Th2, так и на базофилах), а выявление активации базофилов — по увеличению содержания клеток с высокой экспрессией CD203c. Методика теста активации базофилов Allergenicity kit: 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* в течение 15 минут при 37 °С в темноте. Далее проводили лизис эритроцитов лизирующим фиксирующим реагентом, входящим в набор Allergenicity kit. В каждой пробе оценивали 500 базофилов методом проточной цитометрии в мультипараметрическом протоколе с многоэтапным гейтированием.

Таким образом, у каждого пациента исследовали 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. Проведение положительного контроля, обеспечивающего неспецифическую активацию базофилов, необходимо для исключения ложноотрицательных реакций и повышения специфичности метода. Для специфической стимуляции базофилов в работе использовали аллерген *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия). Оптимальная концентрация аллергена была определена в предыдущих исследованиях [1].

Для оценки уровня активации базофилов по экспрессии CD203c в ответ на инкубацию с аллергеном использовали индекс стимуляции (ИС). ИС – отношение процента активированных базофилов в пробе с аллергеном к проценту их спонтанной активации в нестимулированном контроле.

Для изучения функции внешнего дыхания использовали спирометрию методом выполнения петли «объем-поток» с компьютерной обработкой результатов исследования. Учитывали следующие показатели: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ). По показаниям выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения.

Для выявления микогенной сенсibilизации использовали критерий, предложенный международными экспертами ISHAM: положительный кожный прик-тест (≥ 3 мм) и/или выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу I и выше ($\geq 0,35$ Ед/мл) [3].

Диагноз аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) устанавливали на основании критериев Stevens и соавт. [25].

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10. Данные представляли в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляции были проверены с помощью теста Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Частота микогенной сенсibilизации у больных МВ по положительным результатам кожных прик-тестов и/или выявлению sIgE к аллергенам плесневых грибов в сыворотке крови со-

ставляла 57%. Гиперчувствительность к *Aspergillus* spp. выявлена у 51 больного (27%). Частота сенсibilизации к остальным микромицетам составила: *Candida* spp. – 73%, *Alternaria* spp. – 34%, *Rhizopus* spp. – 20%, *Penicillium* spp. – 10%, *Cladosporium* spp. – 6%.

На основании результатов комплексного обследования АБЛА установлен у 11 (5,7%) больных МВ. При микологическом исследовании респираторных субстратов у 9 больных выявлен рост *A. fumigatus*, у 2 – рост *A. niger*.

Тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* выполнили 10 больным АБЛА в возрасте от 6 до 31 года, медиана – 17,0 (10,0-21,0); мужчин – 6 (60%), женщин – 4 (40%). Контрольную группу составили 10 больных МВ без микогенной сенсibilизации в возрасте от 18 до 60 лет, медиана – 26,0 (23,0-29,0); мужчин – 7 (70%), женщин – 3 (30%). Как видно из приведенных данных, группы не отличались между собой по полу, однако возраст был достоверно меньше у больных МВ с АБЛА. Клинические характеристики групп представлены в таблице 1.

У всех обследованных больных была смешанная форма МВ с тяжелым и среднетяжелым течением. Следует отметить, что индекс массы тела больных МВ с АБЛА составил 16,8 (16,0-18,0) и был достоверно ниже, чем в группе сравнения ($p = 0,003$).

При исследовании функции внешнего дыхания значения ОФВ1 в обследованных группах не отличались, однако больные МВ с АБЛА демонстрировали достоверно более низкие показатели ФЖЕЛ ($p = 0,006$).

Микробиологические исследования образцов мокроты выявили наличие грибов рода *Aspergillus* у всех больных МВ с АБЛА и отсутствие колонизации плесневыми грибами у больных МВ без АБЛА. Случаи инфицирования *S. aureus* и *P. aeruginosa* регистрировали одинаково часто у больных обеих групп.

Иммунологические показатели групп больных представлены в таблице 2. У больных МВ с АБЛА абсолютное количество эозинофилов было 0,41 (0,14-0,60) $\times 10^9$ /л, а уровни общего IgE и sIgE к *A. fumigatus* составили 601 (459-702) МЕ/мл и 3,62 (1,40-5,91) МЕ/мл соответственно. Эти показатели у больных МВ без АБЛА были достоверно ниже ($p < 0,05$). Представленные данные подтверждают наличие персистирующего аллергического воспаления за счет активации Т-хелперов 2-го типа (Th2) иммунного ответа при развитии АБЛА.

Установлено, что спонтанная активация базофилов не различалась у больных МВ с АБЛА и больных МВ без АБЛА. Неспецифическая активация базофилов выявила, что больший про-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	МВ с АБЛА CF with ABPA (n = 10)	МВ без АБЛА CF without ABPA (n = 10)	p
Возраст, лет Age, years	17,0 (10,0-211,0)	26,0 (23,0-29,0)	p = 0,012
Пол, м/ж Male, m/f	6/4	7/3	—
ИМТ BMI	16,8 (16,0-18,0)	18,6 (18,0-20,4)	p = 0,003
ФЖЕЛ, % FVC, %	60,0 (40,0-67,0)	70,0 (67,0-76,0)	p = 0,006
ОФВ1, % FEV1, %	44,0 (24,0-55,0)	47,5 (45,0-51,0)	p = 0,145

ТАБЛИЦА 2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. IMMUNOLOGICAL INDICATORS OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	МВ с АБЛА CF with ABPA (n = 10)	МВ без АБЛА CF without ABPA (n = 10)	p
IgE общий, МЕ/мл IgE total, IU/ml	601,0 (459,0-702,0)	22,5 (4,0-33,0)	p = 0,000
sIgE <i>Aspergillus</i> , МЕ/мл IU/ml	3,62 (1,40-5,91)	0,02 (0,01-0,03)	p = 0,000
Эозинофилы, % Eosinophils, %	5,0 (1,0-9,0)	2,0 (0,0-3,0)	p = 0,021
Эозинофилы, $\times 10^9$ /л Eosinophils, $\times 10^9$ /l	0,41 (0,14-0,60)	0,12 (0,00-0,20)	p = 0,009
Спонтанная активация базофилов, % Spontaneous basophil activation, %	3,70 (2,20-4,80)	6,30 (4,80-10,50)	p = 0,050
Активация базофилов анти-IgE-антителами, % Activation of basophils with anti-IgE antibodies, %	72,25 (55,20-86,30)	46,00 (44,40-48,50)	p = 0,000
Количество базофилов активированных <i>A. fumigatus</i> , % The number of <i>A. fumigatus</i> activated basophils, %	68,50 (52,50-81,50)	5,95 (3,80-7,90)	p = 0,002
Индекс стимуляции Stimulation index	17,07 (10,30-27,70)	0,95 (0,70-1,10)	p = 0,000

цент базофилов у больных АБЛА по сравнению с контрольной группой активируется анти-IgE-антителами (p = 0,000).

В крови больных МВ с АБЛА определено от 6,2 до 94,1% базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus*. ИС колебался от 3,9 до 39,4

и составил 17,07 (10,30-27,70). В группе сравнения установлено достоверно более низкое количество сенсibilизированных базофилов, ИС был 0,95 (0,70-1,10) (p = 0,000). Данные теста активации базофилов больного МВ с АБЛА представлены на рисунке 1.

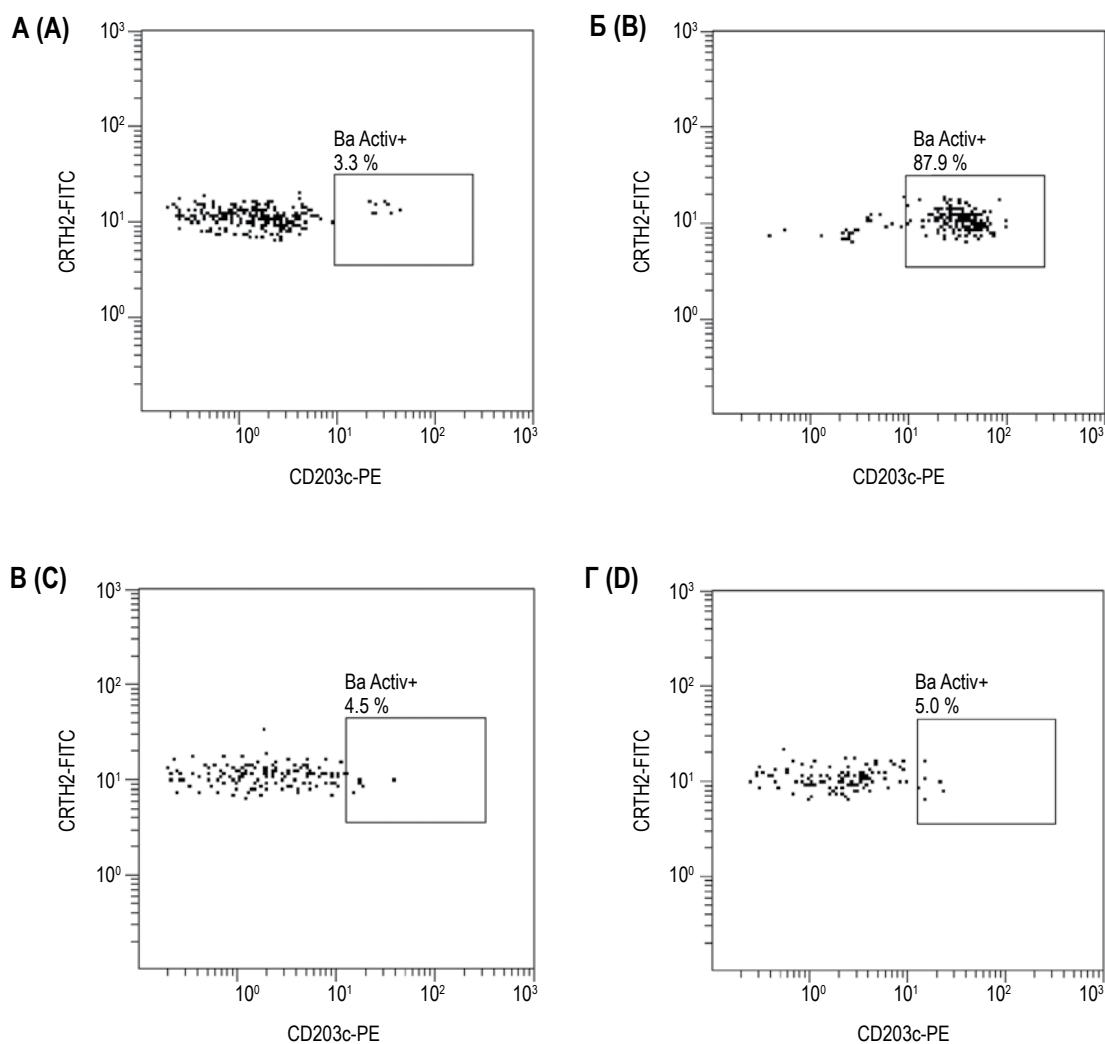


Рисунок 1. Тест активации базофилов у больных МВ

Примечание. Больной К. (А, Б) и больной М. (В, Г) на этапе итогового гейтирования базофилов (CD3⁺CRTH2⁺CD203⁺) после спонтанной (А, В) или специфической (*A. fumigatus*) (Б, Г) активации. Высокий процент активированных базофилов (Б) подтверждает наличие сенсбилизации.

Figure 1. Basophil activation test in patients with cystic fibrosis

Note. Patient K. (A, B) and Patient M. (B, D) at the final basophil gating (CD3⁺CRTH2⁺CD203⁺) after the spontaneous (A, C) or specific (*A. fumigatus*) (B, D) activation. High percentage of the activated basophils (b) confirms the sensibility.

Таким образом, исследованные группы больных различались как по содержанию sIgE к *A. fumigatus* в сыворотке крови, так и по количеству активированных аллергеном базофилов, что подтверждается данными корреляционного анализа. Установлена прямая положительная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и количеством базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus* ($r = 0,77$; $p < 0,05$).

Обсуждение

Микогенная сенсбилизация – важный патогенетический этап в развитии АБЛА. В насто-

ящее время широко изучается связь колонизации плесневыми грибами верхних дыхательных путей у больных бронхиальной астмой с развитием микогенной сенсбилизации. Установлена высокая частота выделения грибов рода *Aspergillus* из мокроты у сенсбилизированных пациентов [20]. Однако существует ограниченное количество исследований, посвященное этой проблеме у больных МВ. Так, в исследовании С. Вахтер и соавт. не установлено корреляции между колонизацией дыхательных путей грибами и сенсбилизацией к *A. fumigatus* [5]. В нашей работе у всех больных МВ с АБЛА при посеве мокроты выявили рост грибов рода *Aspergillus*. Можно предположить,

что противоречивость данных связана с методологическими различиями в определении сенсибилизации, колонизации и микробиологических методах.

Результаты многочисленных исследований указывают, что сенсибилизация к *A. fumigatus* ассоциирована с более выраженными изменениями функции легких [5, 23]. Как и ряд других авторов, мы показали, что персистирующее присутствие *A. fumigatus* в дыхательных путях больных МВ связано с радиологическими аномалиями, включая более тяжелую бронхоэктазию, и оказывает влияние на легочную функцию [14, 21]. У больных МВ с АБЛА достоверно ниже показатели ФЖЕЛ по сравнению с контрольной группой.

Данные о частоте микогенной сенсибилизации у больных МВ варьируют в широких пределах. Метаанализ 64 исследований показал, что частота сенсибилизации к *Aspergillus* spp. в этой группе больных составляет 39,1% [19].

Частота микогенной сенсибилизации у больных МВ в нашем исследовании составила 57%, гиперчувствительность к *Aspergillus* spp. выявлена у 27% обследованных, что сопоставимо с результатами других исследований.

Для подтверждения микогенной сенсибилизации использовали определение sIgE и тест активации базофилов (БАТ). В данном исследовании мы сосредоточили внимание на маркере активации базофилов CD203c в качестве индикатора сенсибилизации к *A. fumigatus*.

Базофилы периферической крови и тканевые тучные клетки являются ключевыми эффекторными клетками в реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Они участвуют в дифференцировке Th2-путем секреции цитокинов и антигенной презентации, что имеет большое значение в развитии IgE-опосредованного хронического аллергического воспаления, и играют ключевую роль в IgG-опосредованной системной анафилаксии [16]. Кроме того, базофилы и тучные клетки могут быть вовлечены и в другие типы аллергического и неаллергического ответов, в основе которых лежат иные механизмы реакции: активация комплемента, не-IgE-опосредованная стимуляция и прямое цитотоксическое (неиммунологическое) воздействие. Таким образом, изучение функциональной активности базофилов имеет важное диагностическое значение [17]. 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. К таким молекулам относятся, например, маркер дегрануляции CD63 и активационные молекулы

CD203c, CD13, CD107a, CD643 [7]. В настоящее время наиболее изученными и перспективными в аллергодиагностике маркерами активации базофилов являются CD63 и CD203c [6, 7].

Особенностью проведения исследования является то, что БАТ с аллергеном *A. fumigatus* можно выполнять менее чем за 2 часа, используя небольшой объем цельной периферической крови. Это можно сделать в том же образце крови, который получен для других иммунологических исследований, что существенно уменьшает дискомфорт для пациента. Выявление sIgE к *A. fumigatus* в сыворотке крови и проведение кожной пробы считают «золотыми стандартами» в рутинном обследовании больных и частью установленных критериев для диагностики АБЛА у больных МВ [20]. Тем не менее оба этих теста имеют недостатки.

Измерение уровней sIgE к *A. fumigatus* — это легкодоступный тест для врача и удобный для пациента. Однако иммуноглобулины этого класса характеризуются низким содержанием в сыворотке крови, а также могут отсутствовать в циркуляции, но быть фиксированными на клетках-мишенях: базофилах и тучных клетках [16]. В ряде работ было показано, что уровни sIgE со временем меняются и должны быть интерпретированы совместно с другими клиническими и лабораторными данными, чтобы установить диагноз [9]. Кроме того, высокий уровень общего IgE у больных может приводить к ложноположительным результатам вследствие неспецифического реагирования с аллергеном.

Диагностика микогенной аллергии *in vivo* подразумевает выполнение кожных проб в виде прик-тестов. К недостаткам кожного тестирования относят риск развития побочных реакций организма на дополнительную антигенную нагрузку, возможность возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов [22]. Кожные пробы могут быть субъективными для лечащего врача и трудными для интерпретации [8].

Однако, как определение sIgE, так и результаты кожных проб показывают лишь наличие сенсибилизации у пациентов, но не всегда клиническую значимость диагностируемого аллергена. В то же время БАТ является функциональным тестом, который представляет собой провокационную пробу, но выполненную *ex vivo*, в пробирке. БАТ является специфической и надежной мерой IgE-зависимого ответа у сенсибилизированных субъектов, потому что базофилы циркулируют в крови, и усиление экспрессии маркеров активации на поверхности базофилов легко оценить с помощью проточной цитометрии. В проведенном нами исследовании у всех больных АБЛА

с помощью БАТ подтверждена сенсibilизация к *A. fumigatus* и установлена прямая положительная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и количеством базофилов, активированных аллергеном *A. fumigatus* ($r = 0,77$; $p < 0,05$). Важное значение БАТ в диагностике АБЛА также подтвердили ирландские ученые. Опубликована новая классификация, в которой критериями АБЛА у больных МВ предлагают считать сочетание значения индекса стимуляции БАТ, индуцированного *A. fumigatus* $> 1,36$ с повышенным уровнем сыровоточного sIgE $> 1,45$ МЕ/мл и общим уровнем IgE > 185 МЕ/мл [20].

В. Mirkovic и соавт. в своей работе показали, что применение итраконазола у больных МВ с колонизацией *A. fumigatus* снижает грибковую нагрузку, но не изменяет уровни экспрессии CD203c на базофилах, стимулированной *A. fumigatus* [20]. Это указывает на то, что эрадикация конидий грибов из дыхательных путей не влияет на микогенную сенсibilизацию, а БАТ можно использовать на фоне антимикотической терапии. В настоящее время необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение влияния системных глюкокортикостероидов, моноклональных антител против IgE, IL-5,

IL-13 на число сенсibilизированных базофилов с маркером CD203c у больных МВ с АБЛА.

Однако не только сенсibilизация к *A. fumigatus* ухудшает течение основного заболевания у больных МВ, а также множество факторов, включая продолжительность воздействия микромицетов, вязкость слизи, особенности перестройки иммунного ответа и возраст [8, 12, 20]. Другие факторы, такие как HLA-DR/HLA-DQ подтипы и наличие единичных нуклеотидных полиморфизмов в сайте связывания IL-4 его рецептором на клетках, были описаны как предрасполагающие факторы к развитию АБЛА [18]. Таким образом, чтобы прогнозировать развитие АБЛА, необходимы более длительные периоды наблюдения за больными из групп риска и оценка различных показателей в динамике.

Заключение

Благодаря тесту активации базофилов у практикующего врача появились новые возможности диагностики различных видов аллергии, в том числе микогенной аллергии. Использование БАТ в комплексном обследовании больных МВ будет способствовать более оперативному выявлению АБЛА, что позволит своевременно начать таргетную терапию.

Список литературы / References

1. Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Бычкова Н.С., Филиппова Л.В., Аак О.В., Пятакова А.В., Фролова Е.В., Давыдова Н.И., Климко Н.Н. Тест активации базофилов в диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза // Проблемы медицинской микологии, 2016. Т. 18, № 3. С. 7-11. [Kozlova Ya.I., Uchevatkina A.E., Bychkova N.V., Filippova L.V., Aak O.V., Pyatakova A.V., Frolova E.V., Davydova N.I., Klimko N.N. Basophil activation test in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems in Medical Mycology*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 7-11. (In Russ.)]
2. Красовский С.А., Самойленко В.А., Амелина Е.Л. Муковисцидоз: диагностика, клиника, основные принципы терапии // Пульмонология и аллергология, 2013. № 1. С. 42-46. [Krasovsky S.A., Samoilenko V.A., Amelina E.L. Cystic fibrosis: Diagnosis, clinic, basic principles of therapy. *Pulmonologiya i allergologiya = Pulmonology and Allergology*, 2013, no. 1, pp. 42-46. (In Russ.)]
3. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., Gupta D., Meis J.F., Guleria R., Moss R., Denning D.W. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy*, 2013, Vol. 43, no. 8, pp. 850-873.
4. Baxter C.G., Dunn G., Jones A.M., Webb K., Gore R., Richardson M.D., Denning D.W. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 3, pp. 560-566.
5. Baxter C.G., Moore C.B., Jones A.M., Webb A.K., Denning D.W. IgE-mediated immune responses and airway detection of *Aspergillus* and *Candida* in adult cystic fibrosis. *Chest*, 2013, Vol. 143, no. 5, pp. 1351-1357.
6. 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, no. 3, pp. 9-13.
7. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R., de Gironcoli M., Solero P., Tridente G., Bellavite P. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach. *Clin. Mol. Allergy*, 2008, no. 6, pp. 12-16.
8. Chotirmall S.H., McElvaney N.G. Fungi in the cystic fibrosis lung: Bystanders or pathogens? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2014, no. 52, pp. 161-173.
9. Chirumbolo S.H. Basophil activation test in allergy: time for an update? *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2012, no. 158, pp. 99-114.
10. Chotirmall S.H., Branagan P., Gunaratnam C., McElvaney N.G. *Aspergillus*/allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Irish cystic fibrosis population: A diagnostically challenging entity. *Respir. Care*, 2012, Vol. 53, no. 8, pp. 1035-1041.

11. Delhaes L., Monchy S., Fréalle E., Hubans C., Salleron J., Leroy S., Prevotat A., Wallet F., Wallaert B., Dei-Cas E., Sime-Ngando T., Chabé M., Viscogliosi E. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community – implications for therapeutic management. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 4, e36313. doi: 10.1371/journal.pone.0036313.
12. Denning D.W., Pashley C., Hartl D., Wardlaw A., Godet C., del Giacco S., Delhaes L., Sergejeva S. Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin. Transl. Allergy*. 2014, Vol. 4, p. 14.
13. Farrell Ph.M., White T.B., Ren Cl.L., Hempstead S.E., Accurso F., Derichs N., Howenstine M., McColley S.A., Rock M., Rosenfeld M., Sermet-Gaudelus I., Southern K.W., Marshall B.C., Sosnay P.R. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J. Pediatr.*, 2017, Vol. 181, pp. 4-15.
14. Fillaux J., Bremont F., Murris M., Cassaing S., Rittie J-L., Tetu L., Segonds C., Abbal M., Bieth E., Berry A., Pipy B., Magnaval J-F. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 44, no. 11, pp. 842-847.
15. Janahi I.A., Rehman A., Al-Naimi A.R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Ann. Thorac. Med.*, 2017, Vol. 12, no. 2, pp. 74-82.
16. Karasuyama H., Tsujimura Y., Obata K., Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Anaphylaxis. Chem. Immunol. Allergy*, 2010, Vol. 95, pp. 85-97.
17. Kang M.G., Song W.J., Park H.K., Lim K.H., Kim S.J., Lee S.Y., Kim S.H., Cho S.H., Min K.U., Chang Y.S. Basophil activation test with food additives in chronic urticaria patients. *Clin. Nutr. Res.*, 2014, Vol. 3, no. 1, pp. 9-16.
18. Knutsen A.P., Kariuki B., Consolino J.D., Warriar M.R. IL-4 alpha chain receptor (IL-4R alpha) polymorphisms in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin. Mol. Allergy*, 2006, no. 4, p. 3.
19. Maturu V.N., Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: Systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Allergy*, 2015, Vol. 45, no. 12, pp. 1765-1778.
20. Mircovic B., Lavelle G.M., Abdul Azim A., Helma K., Gargoum F.S., Molloy K., Gernez Y., Dunne K., Renwick J., Murphy P., Moss R.B., Greene C.M., Gunaratnam C., Chotirmall S.H., McElvaney N.G. The Basophil surface marker CD203c identifies *Aspergillus* species sensitization in patients with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 2, pp. 436-443.
21. McMahon M.A., Chotirmall S.H., McCullagh B., Branagan P., McElvaney N.G., Logan P.M. Radiological abnormalities associated with *Aspergillus* colonization in a cystic fibrosis population. *Eur. J. Radiol.*, 2012, Vol. 81, no. 3, pp. e197-202.
22. Oppenheimer J., Nelson H.S. Skin testing. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2006, Vol. 96, no. 2, pp. 6-12.
23. Peetermans M., Goeminne P., de Boeck C., Dupont L.J. IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is not a bystander phenomenon in cystic fibrosis lung disease. *Chest*, 2014, Vol. 146, pp. 99-100.
24. Sabino R., Ferreira J.A.G., Moss R.B., Valente J., Verissimo C., Carolino E., Clemons K.V., Everson C., Banaei N., Penner J., Stevens D.A. Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.*, 2015, Vol. 14, pp. 474-481.
25. Stevens D. A., Moss R.B., Kurup V.P., Knutsen A.P., Greenberger P., Judson M.A., Denning D.W., Cramer R., Brody A.S., Light M., Skov M., Maish W., Mastella G. Participants in the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis – state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, Vol. 37, Suppl. 3, pp. 225-264.
26. Williams C., Ranjendran, R., Ramage G. Pathogenesis of fungal infections in cystic fibrosis. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 2016, Vol. 10, pp. 163-169.

Авторы:

Козлова Я.И. – к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Фролова Е.В. – к.м.н., заведующая НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Учеваткина А.Е. – к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kozlova Ya.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Frolova E.V., PhD (Medicine), Head, Research Laboratory of Immunology and Allergy, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Uchevatkina A.E., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergy, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Филиппова Л.В. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Аак О.В. — к.х.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Богомолова Т.С. — к.б.н., заведующая НИЛ микологического мониторинга и биологии грибов ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Борзова Ю.В. — к.м.н., заведующая микологической клиникой ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Махмутова В.Р. — врач-пульмонолог, Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

Степаненко Т.А. — к.м.н., заведующая пульмонологическим отделением, Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

Кузнецов В.Д. — ординатор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Васильева Н.В. — д.б.н., профессор, директор НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Шульгина М.В. — д.б.н., заместитель директора НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Климко Н.Н. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Filippova L.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology and Allergy, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Aak O.V., PhD (Chemistry), Leading Research Associate, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Bogomolova T.S., PhD (Biology), Head, Laboratory of Mycological Monitoring and Fungal Biology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Borzova Yu.V., PhD (Medicine), Head, Mycological Clinic, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Makmutova V.R., Clinical Pulmonologist, Multidisciplinary City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

Stepanenko T.A., PhD (Medicine), Head, Pulmonary Department, Multidisciplinary City Hospital No. 2, St. Petersburg, Russian Federation

Kuznetsov V.D., Clinical Resident, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Vasilyeva N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Director, P. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Shulgina M.V., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director, P. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Klimko N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Mycology, Allergy and Immunology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 12.01.2019

Отправлена на доработку 04.03.2019

Принята к печати 22.03.2019

Received 12.01.2019

Revision received 04.03.2019

Accepted 22.03.2019