

МИНИСТЕРСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДЕЛАМ  
ГРАЖДАНСКОЙ ОБОРОНЫ, ЧРЕЗВЫЧАЙНЫМ СИТУАЦИЯМ  
И ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ СТИХИЙНЫХ БЕДСТВИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины  
имени А.М.Никифорова»

# **Диагностика гиперчувствительности методом проточной цитометрии**

Учебно-методическое пособие

Санкт-Петербург  
2022

УДК 616-009.6-076.5 (075.8)

ББК 52.5:53.4.73

Д44

**Диагностика гиперчувствительности методом проточной цитометрии:** учебно-методическое пособие / ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова МЧС России. – СПб. : ИПЦ «Измайловский», 2022. - 91 с.

**Авторы:** к.б.н. Бычкова Н.В., д.м.н. проф. Калинина Н.М., к.м.н. Давыдова Н.И., к.м.н. Васякина Л.И., к.б.н. Калашникова А.А., к.м.н. Чиненова Л.В.

Учебно-методическое пособие подготовлено на основе изучения и обобщения опыта диагностики гиперчувствительности в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии. Показаны преимущества этого клеточного теста как для диагностики сенсibilизации, так и для мониторинга эффективности лечения пациентов. Обсуждены теоретические аспекты участия базофилов в патогенезе аллергического воспаления и клиническое применение оценки активации базофилов *in vitro* с привлечением данных о чувствительности и специфичности теста. Описаны методические особенности пре-, аналитического и постаналитического этапов проведения исследования, различные комбинации маркеров для идентификации базофилов и оценки их активации. Приведен алгоритм анализа проб, возможности использования различных аллергенов и их концентраций, протоколы цитометрического анализа, а также принципы интерпретации результатов теста для его комплексной оценки. Даны клинические примеры использования определения сенсibilизации к разным аллергенам в тесте активации базофилов для назначения пациентам необходимой терапии.

Учебно-методическое пособие предназначено для специалистов лабораторной диагностики и иммунологов-аллергологов, а также может быть использовано в образовательном процессе в системе высшего и дополнительного профессионального образования.

**Рецензенты:**

**Федоскова Т.Г.** – заведующая лабораторией молекулярных механизмов аллергии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, профессор кафедры иммунологии медико-биологического факультета ГБОУ ВПО Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова. д.м.н. профессор; Хайдуков С.В. – старший научный сотрудник лаборатории углеводов ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, д.б.н.

**Решением Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (ФЛМ) присвоен гриф «Рекомендовано ФЛМ», рекомендовано к публикации, протокол заседания Бюро Президиума ФЛМ от 04.02.2022.**

© ФГБУ ВЦЭРМ им.А.М. Никифорова МЧС России, 2022

© Коллектив авторов

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и условных обозначений.....	4
Введение.....	5
1. Комплексная диагностика аллергии.....	6
2. Лабораторная диагностика аллергии.....	7
3. Базофилы – клетки-эффекторы реакций гиперчувствительности..	13
4. Тест активации базофилов в клинической практике.....	16
5. Реагенты для проведения теста активации базофилов.....	20
6. Маркеры для идентификации базофилов.....	22
7. Маркеры для оценки активации базофилов.....	24
8. Негативный и позитивный контроли теста.....	25
9. Антикоагулянты для взятия крови.....	26
10. Аллергены для теста активации базофилов.....	27
11. Алгоритм проведения теста активации базофилов.....	29
12. Оценка позитивности теста.....	34
13. Методические подходы к проведению теста активации базофилов с набором Allerginicity kit (BECKMAN-COULTER)....	35
13.1. Особенности преаналитического этапа.....	35
13.2. Алгоритм доставки образцов в лабораторию.....	36
13.3. Подготовка аллергенов.....	37
13.4. Методика подготовки образца для исследования.....	40
13.5. Учет данных на проточном анализаторе.....	41
13.6. Оформление бланка с результатами.....	46
14. Проблемы, возникающие при проведении теста активации базофилов и возможности их решения.....	48
15. Комплексная интерпретация данных теста активации базофилов..	52
15.1. Спонтанная активация базофилов.....	52
15.2. Индуцированная anti-IgE активация базофилов.....	53
15.3. Индуцированная аллергенами активация базофилов.....	54
15.4. Уровень Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа.....	55
16. Выявление сенсibilизации к йодсодержащим рентгено- контрастным препаратам.....	59
17. Клинические примеры.....	67
Заключение.....	71
Список литературы.....	73

## Список сокращений и условных обозначений

AUC (Area Under the Curve)	–	площадь под кривой
BD	–	Becton Dickinson
CAP-FEIA (Capsulated Hydrophilic Carrier Polymer Fluorescent Enzyme Immunoassay)	–	капсулированный гидрофильный с полимерным носителем флуоресцентный иммуноферментный анализ
CD	–	кластер дифференцировки
CRTH2 (CD294) (Chemo-attractant Receptor T-helper 2)	–	хемоаттрактантный рецептор Т-хелперов 2-го типа
EUROBAT	–	Европейский симпозиум по применению теста активации базофилов
FcεRI	–	высокоаффинный рецептор к иммуноглобулину E
FcεRII	–	низкоаффинный рецептор к иммуноглобулину E
FcγRIII	–	низкоаффинный рецептор к иммуноглобулину G
fMLP (N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)	–	N-Формилметионил-лейцил-фенилаланин
FS (forward scatter)	–	рассеяние света вперед
HLA DR (Human Leucocyte Antigen II class)	–	антиген главного комплекса гистосовместимости человека II класса
IFNγ	–	интерферон γ
IgA	–	иммуноглобулин класса A
IgE	–	иммуноглобулин класса E
IgG	–	иммуноглобулин класса G
IgM	–	иммуноглобулин класса M
IL	–	интерлейкин
ILC2	–	врожденные лимфоидные клетки 2-го типа иммунного ответа
MRGPRX2 (Mas-related G-protein-coupled receptor X2)	–	Mas-связанный с G-белком рецептор X2
НК-клетки (natural killer cells)	–	лимфоциты естественные киллеры
PBS	–	натрий-фосфатный буферный раствор
ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic)	–	методика анализа качества модели логистической регрессии
sIgE	–	специфический иммуноглобулин класса E
SS (side scatter)	–	боковое светорассеяние
STAT6	–	сигнальный белок и активатор транскрипции 6
Tc2	–	Т-цитотоксические 2-го типа иммунного ответа
Th2	–	Т-хелперы 2-го типа иммунного ответа
TLR (Toll-Like Receptor)	–	Toll-like рецептор
АСИТ	–	аллерген-специфическая иммунотерапия
йРКВ	–	йодсодержащие рентгеноконтрастные вещества
MPT	–	магнитно-резонансная томография
ФГДС	–	фиброгастродуоденоскопия
ЭДТА	–	Этилендиаминтетрауксусная кислота

## Введение

Возрастающее с каждым годом количественное разнообразие аллергенов, в том числе появляющихся в результате работы промышленных предприятий, ухудшение экологии окружающей среды, изменение климата, а также расширение спектра используемых в пищу продуктов вызывают неуклонный рост аллергических заболеваний во всем мире. По данным ВОЗ аллергия занимает третье место в мире после сердечно-сосудистой и онкопатологии, что свидетельствует о важности этой медико-социальной проблемы. Проявления аллергии дают разнообразную клиническую картину от ринита и легкого дерматита до жизнеугрожающих состояний, таких как бронхиальная астма и анафилактический шок.

Согласно данным Института иммунологии ФМБА России около 30% населения нашей страны страдают от аллергических заболеваний. Для оказания квалифицированной медицинской помощи им требуется точная и быстрая диагностика сенсibilизации, а также адекватная терапия с учетом выявленного спектра аллергенов с целью их элиминации [1]. Несвоевременное выявление аллергена может привести к утяжелению симптомов и вовлечению в болезнь новых органов и целых систем, что будет требовать более дорогостоящего и длительного лечения.

Пищевая аллергия в развитых странах среди детей раннего возраста по официальным источникам составляет 6–8%, в подростковом возрасте – 2-4% и у взрослых — 2%. При этом приблизительно 20% родителей считают, что у их ребенка имеется пищевая аллергия, а среди взрослых элиминационной диеты, связанной с подозрением на пищевую аллергию, придерживаются 16-30% населения европейских стран [2]. Пыльцевой сенсibilизацией страдают до 40% жителей Европы [3], примерно треть из них сенсibilизирована к березе – до 16% [4]. Отдельной проблемой является наличие значительного количества пациентов с бытовой и эпидермальной сенсibilизацией. Например, в исследовании австрийских ученых [5] показано, что общий уровень сенсibilизации к домашним аллергенам у подростков в различных

географических регионах страны составил 53,5%. При этом распространенность сенсibilизации к клещам рода *Dermatofagoides* составила 13-18%, к мажорному аллергену кошки 14%, собаки - 2,5%, к плесневому грибу *Alternaria* - 2% [5]. Наблюдается рост количества пациентов с плесневой сенсibilизацией, особенно тяжело протекает аллергический бронхолегочный аспергиллез [6].

Согласно Международному Консенсусу по лекарственной аллергии 2014 года реакции лекарственной гиперчувствительности встречается у более 7% общей популяции [7], при этом высок риск жизнеугрожающих осложнений. Инсектная аллергия встречается нечасто, но необходимо заметить, что реакции на яд насекомых могут носить не только местный, но и системный характер вплоть до развития анафилактического шока [8].

Диагностика аллергических заболеваний осложняется тем, что различные аллергены вызывают схожую клиническую симптоматику, что делает выявление причинно-значимого аллергена крайне важной задачей, которую сложно решить без привлечения данных лабораторных исследований.

## **1. Комплексная диагностика аллергии**

Диагностика аллергических заболеваний основывается преимущественно на описании клинической картины и тщательно собранном аллергологическом анамнезе, а также результатах физикальных, инструментальных, функциональных и лабораторных методов исследования [1].

«Золотым стандартом» считаются провокационные пробы, но диагностические тесты *in vivo* небезопасны, имеются данные о высокой частоте системных аллергических реакций во время проведения провокационного тестирования [9,10]. В мире и в том числе в России провокационные пробы проводят достаточно редко.

Для подтверждения сенсibilизации к пищевым, бытовым, эпидермальным, пыльцевым аллергенам, как правило, аллергологи-иммунологи

используют кожное тестирование. Этот метод имеет достаточно высокую клиническую значимость. Раннее выявление сенсibilизации важно для прогнозирования течения заболевания, оценки тяжести его симптомов и развития других проявлений аллергии. Его преимуществом является то, что диагностику проводят во время приема пациента и результат оценивают быстро. Но кожное тестирование не всегда может являться основным методом подтверждения сенсibilизации. Известны противопоказания к проведению кожных проб, касающиеся возраста и состояния пациента. На фоне проводимой лекарственной терапии возможно получение результатов, сложных в интерпретации [11]. Известно, что диагностическая значимость результатов кожных проб с большинством лекарственных препаратов невысока [12,13].

Для диагностики сенсibilизации в дополнение к анамнестическим данным и результатам кожных тестов на практике используют множество лабораторных методов, среди которых наиболее клинически значимыми и патогенетически обоснованными являются определение специфических иммуноглобулинов класса E [11] и относительно новый тест активации базофилов методом проточной цитометрии [14-17].

## **2. Лабораторная диагностика сенсibilизации**

Лабораторные методы, как правило, используются в анамнестически сложных случаях, при сомнительных результатах кожных проб или имеющихся противопоказаниях к их проведению.

Лабораторная диагностика гиперчувствительности сопряжена с рядом трудностей, связанных с многообразием патогенетических механизмов аллергической реакции. Большинство современных лабораторных методов направлено на диагностику заболеваний, обусловленных реакциями гиперчувствительности немедленного (I) типа по Gell и Coombs [18], что имеет высокое клиническое значение из-за возможных тяжелых клинических проявлений. Повреждение тканей при аллергических реакциях I типа

обусловлено IgE-опосредованным выделением медиаторов аллергического воспаления из сенсibilизированных базофилов и тучных клеток при контакте с аллергеном.

Повреждение тканей при аллергических реакциях II и III типа обусловлено активацией системы комплемента, калликреин-кининовой системы, реакций фагоцитоза, реализацией механизмов антителозависимой клеточной цитотоксичности. Комплексы аллерген-антитело представлены иммуноглобулинами IgG или IgM, либо фиксированными на мембранах клеток крови, в основном, эритроцитов и тромбоцитов (II тип) либо находящимися в свободном состоянии в кровеносных сосудах (III тип) с возможностью повреждения эндотелия. Гиперчувствительность замедленного типа (IV тип) обусловлена клеточными цитотоксическими реакциями с участием Т-лимфоцитов различных субпопуляций и NK-клеток [18].

Пищевая, эпидермальная, бытовая, пыльцевая сенсibilизации, в основном, опосредуются аллергическими реакциями I типа. Механизмы развития лекарственной гиперчувствительности более многообразны. Это и все 4 типа аллергических реакций по Gell и Coombs, и прямая активация лимфоцитов через рестриктированные молекулы HLA и/или Т-клеточные рецепторы (фармаколога-иммунная концепция Pichler), и непосредственная активация эффекторных клеток, что ранее рассматривалось, как «псевдоаллергия» [19]. Преимуществами лабораторной диагностики реакций гиперчувствительности являются объективность оценки результата тестов, возможность выявления сенсibilизации одномоментно к значительному количеству аллергенов, в том числе различным классам лекарственных препаратов, отсутствие противопоказаний для обследования и необходимости отмены антигистаминных препаратов, отсутствие тяжелых патологических реакций во время обследования. Лабораторное исследование образца периферической крови возможно провести в любом возрасте, в том числе самом раннем детском, и на фоне самого тяжелого повреждения кожных покровов.



Принимая во внимание очевидные преимущества лабораторной диагностики гиперчувствительности, необходимо помнить о том, что результаты тестов не имеют самостоятельного значения в установлении факта и тяжести аллергического заболевания. Поскольку в результате исследований выявляется только сенсibilизация к определенным аллергенам, аллергологом-иммунологом оцениваются лабораторные результаты обязательно в совокупности с клинической картиной. При диагностическом тестировании имеется возможность получения ложноотрицательных результатов, особенно в период ремиссии, когда в крови невелико содержание аллерген-специфических молекул и клеток. Ложноположительные результаты могут быть получены вследствие наличия латентной сенсibilизации, которая при адекватной работе регуляторных систем не приводит к развитию клинической симптоматики. Сенсibilизация к определенным аллергенам может стать клинически значимой при срыве регуляции вследствие развития другой тяжелой соматической патологии, а также в стрессовых ситуациях, что должен принимать во внимание врач при оценке текущего состояния пациента. Для лабораторной диагностики гиперчувствительности необходимо использование высокотехнологичного оборудования, что подразумевает высокую стоимость обследования и зачастую более длительное – по сравнению с проведением кожного тестирования – время до получения результата.

Неоспорима ведущая роль лечащего врача в тандеме клиницист – специалист клинической лабораторной диагностики при определении стратегии диагностики и интерпретации результатов исследований для назначения адекватной терапии. На этапе клинического обследования определяются объем и методы лабораторных исследований, выбор которых должен быть проведен на основе знаний об особенностях каждого теста. В таблице 1 приведены факторы, влияющие на проведение и оценку наиболее клинически значимых методов диагностики гиперчувствительности, ограничения методов, а также механизмы протекания реакций гиперчувствительности.

Таблица 1

## Сопоставление различных методов диагностики гиперчувствительности [20]

	Prick-тест	Определение sIgE	Активация базофилов
Влияние терапии	Снижение чувствительности при приеме глюкокортикостероидов, кромонов, антигистаминных препаратов, антидепрессантов и т.д.	Снижение чувствительности при длительном приеме глюкокортикостероидов	Снижение чувствительности при приеме глюкокортикостероидов
Острота и тяжесть клинических проявлений	Не проводятся при обострении, при анафилактических реакциях в анамнезе	При обострении часто негативны	При тяжелых острых реакциях интерпретация теста иногда затруднена
Возрастные ограничения	Проводятся детям старше 6 месяцев. Младше 1,5 лет результаты часто ложноотрицательны или неоднозначны	Отсутствуют	Отсутствуют
Состояние кожных покровов	Влияет	Не влияет	Не влияет
Возможность аллергических реакций	Возможны	Невозможны	Невозможны
Субъективизм оценки теста	Присутствует	Практически исключен	Присутствует
Выявление аллергена при гастроинтестинальных симптомах и рините	Редко	Редко	Часто
Тесты с пищевыми, бытовыми, эпидермальными, инсектными аллергенами	Часто позитивны	Часто позитивны	Часто позитивны
Тесты с лекарственными аллергенами	Часто негативны	Часто негативны	Часто позитивны
Количество определяемых одновременно аллергенов	Не более 15	Нет ограничений	Нет ограничений
Время проведения	30-40 минут	От 2 часов	От 1,5 часов
Использование рекомбинантных аллергенов	Невозможно	Возможно	Возможно
Механизмы развития	IgE-опосредованный	IgE-опосредованный	IgE-опосредованный. Не IgE-опосредованный, в т.ч. прямая активация клеток-эффекторов через рецепторы

Для выбора лабораторных методов оценки гиперчувствительности необходимо понимание участия оцениваемых при лабораторном тестировании молекул и клеток в патогенезе воспаления.

При использовании количественных методов лабораторной диагностики гиперчувствительности (определение специфических IgE) возможна диагностика сенсibilизации, в основном, к пищевым и ингаляционным аллергенам, некоторым лекарственным веществам. Эти лабораторные тесты прочно вошли в арсенал аллергологов-иммунологов, они используются приблизительно в течение полувека, но, как и кожные пробы, имеют свои ограничения (табл.1). Потенциал лабораторной диагностики значительно увеличивается при дополнительном использовании функциональных клеточных тестов.

Ранее применялись следующие методы для выявления гиперчувствительности с использованием функциональных лабораторных тестов - микроскопия для оценки дегрануляции базофилов при употреблении щелочных красителей и определение концентрации освобожденного гистамина и лейкотриенов из реактивных базофилов после стимуляции.

В настоящее время лидирующие позиции для диагностики гиперчувствительности с помощью функциональных клеточных тестов занимает тест активации базофилов, предложенный в 90-х годах прошлого века - определение количества активированных базофилов после стимуляции *in vitro*. В качестве стимулов могут быть использованы пищевые, бытовые, эпидермальные, инсектные, значительный спектр лекарственных аллергенов и др. Этот тест является аналогом провокационного теста *in vivo* и дает возможность ремоделирования *in vitro* контакта предполагаемого аллергена с базофилами периферической крови пациента. Он сочетает в себе преимущества провокационных проб, при проведении которых создаются условия для взаимодействия возможного аллергена и клеток-эффекторов аллергического воспаления, с безопасностью для пациента, поскольку активация базофилов аллергенами и ее оценка проводятся вне организма пациента.

Тест активации базофилов главным образом выявляет связанные с мембраной тучных клеток и базофилов специфические IgE, но также возможна активация базофилов через рецепторы к компонентам комплемента и IgG, TLR и др. (рис.1).

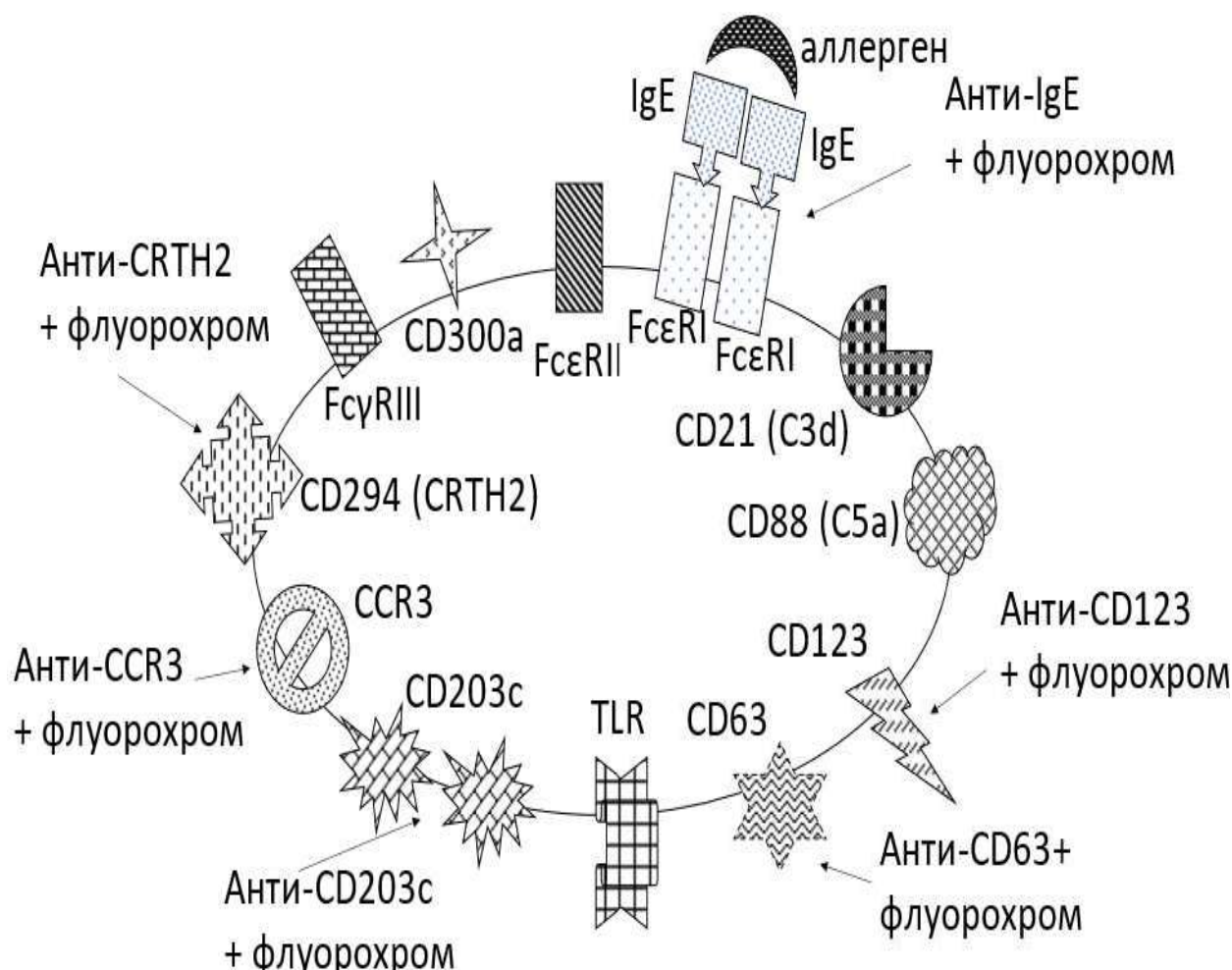


Рис.1. Экспрессия мембранных молекул активированным базофильным гранулоцитом.

На рис. 1 указаны активирующие и ингибирующие рецепторы, а также маркеры, наиболее часто используемые для идентификации и оценки активации базофила методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител, связанных с флуорохромом.

Базофилы и находящиеся в тканях тучные клетки обладают схожим рецепторным аппаратом и репертуаром находящихся в гранулах медиаторов

аллергического воспаления. Поэтому наблюдается высокая комплементарность между результатами кожных тестов и теста активации базофилов.

Основанием для разработки теста активации базофилов послужила способность этих клеток дегранулировать после перекрестного связывания специфического IgE с высокоаффинным рецептором FcεRI при контакте с аллергеном, что приводит к высвобождению цитокинов, лейкотриенов, триптазы, гистамина и других медиаторов воспаления, вызывающих симптомы аллергии. Плотность экспрессии комплекса FcεRI-IgE на мембране базофилов и тучных клеток зависит от концентрации IgE в периферической крови [21].

Таким образом, теоретической основой использования оценки активации базофилов для определения сенсibilизации к различным аллергенам является участие этой популяции клеток в патогенезе воспаления.

### **3. Базофилы – клетки-эффекторы реакций гиперчувствительности**

Базофилы – небольшая популяция клеток периферической крови, они составляют менее 1% от общего числа лейкоцитов. Они происходят из костномозговой клетки-предшественницы гранулоцитарно-моноцитарного ростка [22]. Впервые эти клетки были описаны Паулем Эрлихом в 1879 г. как разновидность тучных клеток, циркулирующих в периферической крови [23]. Базофилы относятся к клеткам врожденного иммунитета, экспрессируют панлейкоцитарный маркер CD45, а также CD38<sup>bright</sup>, CD123<sup>bright</sup>, миелоидные маркеры CD33, CD13, CD11b, B-клеточный маркер CD22 [24], большой спектр Toll-like рецепторов (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, TLR10), а также NOD2 [25] и др., что позволяет этим клеткам участвовать во многих клеточных реакциях. Функциями этих клеток являются следующие - участие в поддержании воспаления, преимущественно аллергической природы, в регуляции проницаемости и тонуса микрососудов, нейтрализации токсинов и ядов, в том числе ядов насекомых, в регуляции свёртывания крови, участие в процессах фагоцитоза (незначительно), в иммунном ответе на многоклеточных

паразитов [26-28]. Недавно было постулировано участие базофилов в регуляции деятельности Т-лимфоцитов и силы вторичного иммунного ответа, выражающееся в их способности усиливать воспаление за счет привлечения эффекторных клеток, таких как Th2 (Т-хелперы 2 типа иммунного ответа), ILC2 (врожденные лимфоидные клетки 2 типа иммунного ответа), эозинофилы и провоспалительные моноциты, в очаг воспаления [29].

Базофильные гранулоциты экспрессируют более 40 различных рецепторов, включая рецепторы к хемокинам (CCR1, 2, 3, 5, CXCR 2, 4), цитокинам (IL-3R, IL-25R, IL-33R, IL-18R, VEGFR), компонентам комплемента (CD55, CD86), иммуноглобулинам E (FcεRI, FcεRII), G (FcγRIII) и D (рецептор пока полностью не охарактеризован, рецепторный комплекс включает galectin-9 и CD44) и др. [25,30-33], что позволяет этим клеткам участвовать в развитии как IgE, так и не IgE-опосредованного аллергического воспаления [12].

В первую очередь базофилы принимают участие в IgE-зависимых реакциях, потому что подобно тучным клеткам, находящимся в тканях, базофилы периферической крови экспрессируют высокоаффинные рецепторы к IgE. После первичного контакта с аллергеном в фазе сенсibilизации развивается иммунный ответ с участием дендритных клеток, Т-хелперов 2 типа и ILC2. Биологическим свойством цитокинов 2-го типа (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), важнейшим из которых является IL-4, является способность поддерживать пролиферацию активированных специфическим антигеном В-лимфоцитов и переключать синтез тяжелых цепей иммуноглобулинов с IgM на IgE или IgG4. Ввиду высокой липофильности значительная часть циркулирующих IgE вскоре после синтеза фиксируется на поверхности тучных клеток и базофилов, связываясь с высокоаффинным рецептором. Повторный контакт организма с аллергеном в эффекторной фазе вызывает кластеризацию рецепторов на мембране базофила и запускает сигнальный каскад, приводящий к активации и дегрануляции клеток в течение нескольких минут.

Помимо главного механизма, приводящего к дегрануляции базофила, а именно перекрестного связывания аллергена с комплексом высокоаффинного

рецептора к IgE и молекулы IgE на поверхности клетки, существуют и другие пути активации. Дополнительно базофил может быть активирован через связывание аллергена с комплексом IgG и рецептора FcγRIII, IgD с его рецептором, а также через рецепторы к компонентам комплемента (CD21/C3d, CD88/C5a) и TLR [34]. Показана активация базофилов в результате воздействия физических факторов (например, при изменении осмолярности) [35] и неспецифическая стимуляция при изменении концентрации свободного кальция [36], т.к. дегрануляция клеток является кальций-зависимым процессом.

Показана активация базофилов и тучных клеток через рецептор MRGPRX2 (Mas-related G-protein-coupled receptor X2) при взаимодействии с лекарствами, содержащими катионные группы с мотивом TНIQ. Симптомы крапивницы и анафилаксию таким образом могут вызывать нейропептиды, β-дефенсин-3, антагонист В2 рецептора брадикинина икатибант, а также хинолоны (ципрофлоксацин и левофлоксацин) и нейромышечные блокаторы [37, 38].

В гранулах базофилов выявляют разнообразные медиаторы воспаления - хондроитинсульфаты А и С, гистамин, гепарин, ферменты (трипсин, химотрипсин, дегидрогеназы, пероксидаза, РНКаза, гистидинкарбоксилаза), кислые гликозаминогликаны [39]. В результате активации дополнительно в клетке происходит синтез простагландина D2, тромбоксана, лейкотриена С4, IL-4 и IL-13, приводящий к развитию хронического аллергического воспаления. Высвобождение медиаторов воспаления из активированных базофилов и тучных клеток вызывает местное расширение сосудов и повышение их проницаемости, что способствует привлечению других лейкоцитов в очаг воспаления. В результате наблюдаются клинические симптомы воспаления – зуд, гиперемия, отек, спазм гладкой мускулатуры и др. [39].

Поскольку пути активации базофилов схожи как *in vivo*, так и *in vitro*, это позволяет использовать тест активации базофилов *in vitro* для подтверждения сенсibilизации *in vivo*. Данный тест выявляет сенсibilизацию, протекающую практически по всем типам гиперчувствительности.

#### 4. Тест активации базофилов в клинической практике

Тест активации базофилов может быть использован для диагностики сенсibilизации к широкому спектру аллергенов, а также для оценки эффективности разных видов терапии.

На 10 Европейской конференции EUROBAT (Рим, 2016), посвященной использованию этого теста в клинической практике, ведущими европейскими специалистами в этой области A.Santos, C.Mayorga, B.Eberlein, H.Hoffmann в устных докладах было рекомендовано проведение теста активации базофилов в качестве уточняющего метода при наличии клинических симптомов аллергии у пациента и отрицательных результатах кожных проб/отсутствии специфических IgE, поскольку была показана его лучшая чувствительность и специфичность (табл. 2).

Таблица 2

Чувствительность и специфичность различных методов диагностики сенсibilизации на примере пищевых аллергенов [40-42].

	Чувствительность, %		Специфичность, %	
	Коровье молоко	Пшеничная мука	Коровье молоко	Пшеничная мука
Prick-тесты (>3мм)	88	73	68	73
Тест активации базофилов	91	85	90	77
Специфические IgE (>0,35КЕ/л)	87	83	48	43

При использовании теста активации базофилов показана высокая специфичность (75-100%) и чувствительность (77-98%) выявления сенсibilизации к пищевым аллергенам – к арахису [43], к коровьему молоку [40], к куриному яйцу [44]. Известно [45], что диагностический эффект измерения sIgE к пшеничной муке меньше, чем при других аллергенах. В тесте



активации базофилов показана более высокая специфичность (77%) и чувствительность (85%) выявления сенсibilизации к омега-5 глиадину (nOG5), одному из основных аллергенных белков пшеницы, по сравнению с определением специфических IgE методом CAP-FEIA. AUC для теста активации базофилов с nOG5 была значительно выше, чем для определения sIgE к пшенице - 0,89 и 0,73 соответственно [42].

Высокая эффективность теста активации базофилов показана для диагностики аллергии к ядам насекомых. Чувствительность оценки сенсibilизации к яду пчелы составила 91,3%, к яду осы – 85,3% при высокой специфичности (90 и 83,3% соответственно) [46]. Особенно сложным для выбора корректной аллергенспецифической иммунотерапии является оценка двойной сенсibilизации к ядам осы и пчелы [47], в данной ситуации тест активации базофилов показал наибольшую точность – определил доминирующую сенсibilизацию в 91% случаев. В работе P.Kogosec с соавт. [48] были исследованы пациенты с клинически подтвержденными случаями аллергии на укусы перепончатокрылых и негативными специфическими IgE к ядам. С помощью теста активации базофилов у них диагностировали сенсibilизацию в 81% случаев, в то время как кожные тесты были положительны только у 57% пациентов.

Высокое клиническое значение теста активации базофилов было продемонстрировано и для диагностики сенсibilизации у пациентов с ингаляционными аллергенами. Сходные и очень высокие данные о чувствительности (92,3%, 93%, 96%) и специфичности (100%, 100%, 93%) показаны разными группами исследователей [49-51] для определения сенсibilизации к травам у пациентов с поллинозом. Тест показал свою перспективность и для оценки сенсibilизации к бытовым аллергенам – клещам домашней пыли (85% чувствительность, 93% специфичность) [52], а также шерсти кошек (100% чувствительность) [53]. Особенно важно использование теста активации базофилов при отрицательных специфических IgE [52].

Показана возможность использования теста активации базофилов в комплексной диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза [54], а также для оценки сенсibilизации к материалам, применяемым для протезирования в стоматологической практике [55].

Важно с диагностической точки зрения, что в тесте могут быть использованы как экстракты аллергенов, так и рекомбинантные аллергенные молекулы, что значимо для получения полного спектра сенсibilизации в случае перекрестной реактивности. Показано высокое значение оценки сенсibilизации с использованием рекомбинантных аллергенов ядов перепончатокрылых [56], арахиса [57], персика и березы [58].

Незаменим тест активации базофилов для диагностики лекарственной аллергии [59-60]. Во-первых, не для всех лекарственных препаратов созданы коммерческие реактивы для определения специфических IgE, а также чувствительность тест-систем недостаточна [12]. Во-вторых, с использованием готовых тест-систем для определения sIgE можно оценить сенсibilизацию только к основному действующему веществу, а реакция может быть и на другие вещества, входящие в готовое лекарственное средство [61]. В-третьих, не всегда лекарственная аллергия протекает по IgE-зависимому 1 типу реакций гиперчувствительности [62]. В-четвертых, чувствительность кожных проб с лекарственными препаратами недостаточна [13,63]. Все эти проблемы могут быть решены при использовании для диагностики сенсibilизации теста активации базофилов методом проточной цитометрии. По сравнению с кожными тестами у него выше чувствительность, дополнительным преимуществом является возможность использовать конкретный лекарственный препарат. Особенно важно проведение этого теста пациентам с тяжелыми реакциями, которым невозможно применить кожное и провокационное тестирование, а также у лиц с отсутствием специфических IgE [64]. В.Eberlain с соавт. [65], диагностируя аллергию к бета-лактамам, продемонстрировала для данного теста чувствительность 55% при 80% специфичности. В работе A.Aranda с соавт. [66] при диагностике пациентов с

аллергией на фторхинолоны (ципрофлоксацин, моксифлоксацин, левофлоксацин) чувствительность исследования составила 71,1% при специфичности 88%. Заслуживает внимания работа P. Giavina-Bianchi с соавт. [67], в которой тест активации базофилов апробирован в качестве лучшего биомаркера тяжелых реакций во время проведения быстрой десенсибилизирующей терапии (RDD) у пациентов с аллергией к соединениям платины.

Z. Kim с соавт. [68] предложили метод диагностики аутоиммунной крапивницы с использованием в тесте активации базофилов крови интактного донора, а в качестве аллергена сыворотки пациента. Описаны особенности активации базофилов у детей с хронической крапивницей [69].

Показана клиническая значимость теста для оценки эффективности терапии при специфической иммунотерапии [70] у пациентов с аллергией на яды насекомых [71,72], пыльцу трав [73], арахис [74].

Используют тест активации базофилов для оценки эффективности терапии анти-IgE препаратами [75,76], для определения возможности повторного введения продукта после окончания элиминационной терапии [40].

Тест активации базофилов разрешен к применению в Российской Федерации для диагностики пищевой [77], и лекарственной [1] сенсibilизации согласно Федеральным клиническим рекомендациям Российской Ассоциации клинических иммунологов и аллергологов.

Согласно документу Всемирной организации Word Allergy Organization 2020 года с изложением позиции о диагностике IgE-опосредованной аллергии [12] в сложных случаях и при наличии противоречивых данных других методов диагностики рекомендовано использование теста активации базофилов, особенно для оценки сенсibilизации к пищевым и лекарственным аллергенам, а также к ядам перепончатокрылых.

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что основными областями применения теста активации базофилов являются:

1. Выявление сенсibilизации к аллергенам различной природы для диагностики как IgE-зависимой аллергии, так и других видов гиперчувствительности в случаях невозможности проведения, противоречивых или отрицательных результатах кожных тестов и анализа специфических IgE.

2. Оценка эффективности проводимой аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ).

3. Оценка эффективности лечения анти-IgE препаратами.

4. Определение возможности повторного введения продукта после окончания элиминационной терапии.

Преимуществами исследования активации базофилов методом проточной цитометрии являются:

- использование небольшого количества образца (50-100 мкл цельной периферической крови),

- исследование маркеров активации на уровне одной клетки,

- получение результата в относительно короткие сроки (1,5-2 ч),

- идентификация базофилов без их выделения из цельной крови.

Условия инкубации базофилов с аллергенами *in vitro* при использовании цельной крови в большей степени соответствуют процессам *in vivo*. Активация проходит в присутствии компонентов комплемента, IgE-антител, циркулирующих иммунных комплексов, антител к рецепторам IgE и лекарственных средств в случае их использования.

## **5. Реагенты для проведения теста активации базофилов**

Для выявления активации базофилов методом проточной цитометрии различные производители представляют коммерческие наборы - Flow-CAST (Bühlmann Laboratories AG), BASOTEST (Glicotope Biotechnology), BD FastImmune (Beckton Dickinson), Allergenicity kit (Beckman Coulter) и др., которые различаются по специфическим маркерам как для выявления базофилов, так и для оценки их активации (табл.3).

Все указанные в таблице реактивы имеют статус *in vitro diagnostic*, регистрационные удостоверения Минздрава России и разрешены к использованию на территории нашей страны. В настоящее время завершается апробация отечественного набора (АлкорБио) для определения активации базофилов, его основные характеристики (маркеры для идентификации и оценки активации клеток, а также использование антител к IgE-FcεRI в качестве позитивного контроля) схожи с таковыми у Allergenicity kit.

Таблица 3

Реагенты для оценки активации базофилов методом проточной цитометрии

	FLOW-CAST	BASOTEST	Allergenicity kit	BD FastImmune
Идентификация базофилов	SSlow CCR3 <sup>+</sup>	SSlow Анти-IgE <sup>+</sup>	SSlow CD3 <sup>-</sup> CD294 <sup>+</sup> CD203c <sup>+</sup>	SSlow CD123 <sup>+</sup> HLA DR <sup>-</sup>
Позитивный контроль	1. Антитела к FcεRI 2. fMLP	fMLP	Антитела к IgE-FcεRI	fMLP
Маркеры активации базофилов	CD63 <sup>+</sup> (допция CD203c <sup>+++</sup> )	CD63 <sup>+</sup>	CD203c <sup>+++</sup>	CD63 <sup>+</sup>
Типы клеток, на которых представлены маркеры активации	1. базофилы, тучные клетки, тромбоциты, макрофаги (стандарт) 2. базофилы (с допцией)	базофилы, тучные клетки, тромбоциты, макрофаги	базофилы	базофилы, тучные клетки, тромбоциты, макрофаги
Антикоагулянт	ЭДТА	гепарин	ЭДТА или гепарин	гепарин

В случае успешного завершения апробации отечественного набора и регистрации его в Министерстве здравоохранения в стране появятся реагенты, преимуществом которых будет не только экономическая доступность, но и возможность применения аллергенов данного производителя для использования

в тесте активации базофилов. Сейчас широкий спектр аллергенов, в том числе рекомбинантные молекулы, используется в тест-системах АлкорБио для определения специфических IgE антител, но результаты исследований свидетельствуют о возможности их более широкого применения.

## **6. Маркеры для идентификации базофилов**

Поскольку базофильные гранулоциты имеют относительно низкие показатели бокового светорассеяния, сопоставимые с таковыми у лимфоцитов и моноцитов, во всех протоколах исследования рекомендовано выбирать зону анализа SSlow для исключения эозинофилов с высокими параметрами бокового светорассеяния.

В наборе FLOW-CAST использованы моноклональные антитела к CCR3 для выделения популяции базофилов (табл.3).

CD193 - CCR3, C-C-рецептор хемокина 3. Это высокоаффинный рецептор для следующих  $\beta$ -хемокинов: эотаксин (CCL11), эотаксин-3 (CCL26), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) и RANTES (CCL5). Также может связываться с хемокинами CCL4 (MIP-1  $\beta$ ) и CCL2 MCP-1. [78]. Показана экспрессия этого рецептора на базофилах, эозинофилах, а также поляризованных Т-хелперах 2 типа [79].

Комбинация моноклональных антител к CD3/CD294/CD203с в наборе Allergenicity kit предназначена для поэтапного гейтирования базофилов (табл.3).

CD203с является молекулой, принадлежащий к семейству эктонуклеотидпирофосфатаз/фосфодиэстераз 3 (E-NPP3), участвующих в гидролизе олигонуклеотидов, нуклеозидфосфатов и никотинамидадениндинуклеотидов. Экспрессия этой молекулы показана для базофилов, зрелых тучных клеток и их предшественников [80].

CD294 - CRTH2 (Chemoattractant Receptor TH2). Молекула из семейства рецепторов хемоаттрактантов, является рецептором простагландина D2, обеспечивает миграцию и активацию базофилов, эозинофилов, тучных клеток,

поляризованных Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа [81]. Молекула CRTH2 экспрессируется на базофилах, эозинофилах и тучных клетках, минорных субпопуляциях Т-клеток и моноцитов/дендритных клеток [82].

CD3 – белковый комплекс, является основным корецептором для Т-клеточного рецептора, необходим для передачи сигнала внутрь клетки [83]. Основной маркер Т-лимфоцитов и тимоцитов. В данную комбинацию включены антитела к CD3 для лучшего выделения чистой популяции базофилов и исключения из анализа Т-клеток 2 типа иммунного ответа, которые экспрессируют молекулы CD294 и CD3.

Комбинация моноклональных антител к CD123/HLA DR в наборе BD FastImmune предназначена для поэтапного гейтирования базофилов (табл.3).

CD123 –  $\alpha$ -субъединица рецептора для интерлейкина 3, обеспечивает активацию клеток. Экспрессируется на клетках-предшественниках, дендритных клетках, моноцитах, эозинофилах, базофилах [84].

HLA DR – Human Leucocyte Antigen II – антиген главного комплекса гистосовместимости человека II класса. Участвует в презентации чужеродных пептидов Т-клеточному рецептору Т-лимфоцитов. Экспрессия этой молекулы характерна для профессиональных антигенпредставляющих клеток, например, дендритных клеток, моноцитов, макрофагов, В-лимфоцитов и др., при активации может экспрессироваться на других типах клеток, например, эпителиальных [85]. В данной комбинации маркер HLA DR использован для выделения более чистой популяции базофилов с целью исключения из анализа моноцитов периферической крови, экспрессирующих CD123 и HLA DR.

Анти-IgE – антитела к иммуноглобулину E. В наборе BASOTEST выделение базофилов проводят на основании выявления клеток, экспрессирующих связанный с мембраной IgE.

На сегодняшний день нет комбинации маркеров для идентификации базофилов, которая была бы однозначно лучшей. Подходящими стратегиями гейтирования могут являться все вышеописанные с учетом их особенностей.

## 7. Маркеры для оценки активации базофилов

В настоящий момент для выявления активации базофилов в коммерческих тест-системах используются 2 маркера - CD63 и/или CD203с.

CD63 – белок семейства тетраспинов, которые взаимодействуют с интегринами. Локализуется, в основном, в эндосомах и лизосомах, экспрессируется на поверхностной мембране гемопоэтических клеток (базофилы, тучные клетки, тромбоциты, макрофаги) после дегрануляции внутриклеточных органелл [86]. Поверхностная экспрессия CD63 свидетельствует об «анафилактической дегрануляции» базофилов и тромбоцитов [87-90]. Дегрануляция вызывается перекрестной попарной сшивкой комплекса высокоаффинного рецептора к IgE и IgE (IgE-FcεRI) с аллергеном.

Экспрессия CD203с ограничена базофилами и тучными клетками. Эта молекула конститутивно представлена на поверхностной мембране базофилов, но при активации клетки его экспрессия значительно возрастает. Пути активации базофилов разнообразны, но основным является IgE-опосредованный. Появление в пробе базофилов CD203с<sup>+++</sup> описывается как «частичная дегрануляция» [91].

Клиническая значимость использования для оценки активации базофилов CD63 и CD203с признана сопоставимой [92], но необходимо учитывать особенности экспрессии этих активационных маркеров при оценке позитивности теста, которые зависят от взятия, хранения и подготовки образцов крови. В случае использования антител к CD63 спонтанно активированные базофилы составляют не более 2% - принцип «все или ничего» [93]. При использовании антител к CD203с спонтанная активация базофилов обычно находится в пределах 0,5-4%, но может быть значительно выше при массивном поступлении аллергена, например в период цветения при поллинозе [94], обострении астмы [95], вегетативной дисфункции, при методических



погрешностях, а именно длительном времени между взятием образца крови и постановкой теста.

## **8. Негативный и позитивный контроли**

Поскольку метод проточной цитометрии является относительным, для корректной интерпретации результатов необходимо проведение негативного и позитивного контролей для каждого обследуемого пациента.

Негативным контролем является образец крови, окрашенный антителами в стандартной манере, но без внесения каких-либо стимулов, т.е. в присутствии только буферного раствора. В пробе с негативным контролем оценивают базальный уровень активации базофилов.

Позитивным контролем для теста активации базофилов будет образец крови, в который для оценки уровня поликлональной активации базофилов внесен специальный реактив, входящий в состав набора. В качестве таких активирующих стимулов возможно использование 2-х вариантов реагентов, которые задействуют или неспецифический путь активации клеток или сигналинг, обусловленный взаимодействием с мембранным иммуноглобулином E. В разных наборах (табл.3) применяют панлейкоцитарный стимулятор хемотаксиса fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe) и/или антитела к высокоаффинному рецептору иммуноглобулина E (FcεRI)/комплексу IgE-FcεRI. Для того чтобы возможно было корректно оценить специфическую активацию базофилов на аллерген, необходимо при исследовании положительного контрольного образца зарегистрировать превышение количества активированных базофилов не менее, чем на 10% [96] по сравнению с негативным контролем. Пациентов, базофилы которых не отвечают активацией на позитивный контроль, в литературе обозначают как «нонреспондеры» [97]. Количество «нонреспондеров» в популяции находится на уровне 2,5-17% [97,98]. В этом случае невозможна корректная интерпретация отрицательных результатов в тесте с аллергеном [97].

## 9. Антикоагулянты для взятия крови

Периферическую кровь для исследования в тесте активации базофилов преимущественно рекомендуется забирать в вакутейнеры с гепарином - кислым серосодержащим гликозаминогликаном, реализующим свои антикоагулянтные свойства через активацию антитромбина III. Некоторые наборы реагентов (табл.3) позволяют использовать кровь, собранную в вакутейнеры с ЭДТА, поскольку именно этот антикоагулянт используется для большинства исследований методом проточной цитометрии ввиду возможности более длительной и качественной сохранности морфологии и рецепторного аппарата клеток крови. Известно, что этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) является хелатирующим агентом, т.е. ее молекула способна образовывать комплекс с ионами, находящимися в растворе. Использование ее солей в качестве антикоагулянта способствует связыванию кальция из периферической крови, тем самым останавливая свертывание. Согласно биологии клетки, кальций является универсальным вторичным мессенджером, необходимым для проведения сигналов активации и ингибирования в разных клетках организма, например, нервной и мышечной ткани, а также в клетках крови для их пролиферации, синтеза медиаторов и дегрануляции. Именно поэтому для проведения всех функциональных лабораторных тестов (индукции цитокинов, исследования фагоцитарной и бактерицидной функции нейтрофилов, активации базофилов, цитотоксической функции натуральных киллеров и др.) необходимо использовать в качестве антикоагулянта гепарин, который не влияет на кальциевый обмен. Реактивы для изучения активации базофилов, которые позволяют использовать кровь, забранную в вакутейнер с ЭДТА, содержат специальный буферный раствор, которым можно восполнить недостаток ионов кальция.

## 10. Аллергены для теста активации базофилов

Аллергены не входят в состав большинства наборов реагентов либо разнообразие и количество их в тест-системах невелико. Таким образом, существует необходимость дополнительного приобретения необходимых аллергенов. Некоторые исследователи применяют аллергены для кожных проб [75], аллергены, используемые для определения специфических IgE в сыворотке крови в анализаторах типа Immulite [99], или при ручной постановке в иммуноферментном анализе (АлкорБио) [100], готовят экстракты самостоятельно [42], а также используют готовые лекарственные препараты [101].

Сохраняются проблемы при использовании аллергенов в качестве стимуляторов активации базофилов:

- использование экстрактов натуральных аллергенов не всегда корректно (трудности стандартизации, возможные примеси неспецифически стимулирующих или ингибирующих агентов),

- применение коммерческих препаратов, выпускаемых для проведения кожных тестов, затруднительно ввиду того, что они могут содержать примеси цитотоксических и/или ингибирующих консервантов,

- стимуляция базофилов является дозозависимой, поэтому важно подобрать определенные концентрации аллергенов, достаточные для активации базофилов у сенсibilизированных пациентов, но не имеющие токсических эффектов, а также не вызывающие ложноположительных реакций у здоровых лиц,

- результат теста с использованием фармакологических препаратов в качестве индукторов трудно интерпретировать, т.к. часто реакцию в организме вызывает не сам препарат, а его метаболиты.

Необходимые характеристики аллергенов для теста активации базофилов - отсутствие цитотоксичности, обусловленной добавками, консервантами, неспецифической активации в результате присутствия эндотоксинов и

лектинов, а также способность вызывать специфическую активацию клеток. В литературе высказывается мнение [94], что желательно использовать стандартизованные коммерческие аллергены, адаптированные для клеточных тестов. Их недостатком, на наш взгляд, является небольшой срок хранения после растворения лиофилизированной формы.

Помимо выбора источника аллергена, важной задачей является подбор оптимальной концентрации аллергенов в тесте активации базофилов. Сложно сопоставлять конкретные цифры в статьях разных авторов, тем более что производители тест-систем рекомендуют добавлять разное количество аллергена на образец крови. В наборе Allergenicity kit на 100мкл крови вносится 20мкл аллергена, в наборах Basotest и Flow CAST согласно инструкциям рекомендуется использовать равное количество крови и аллергена. Вносимое количество аллергена будет влиять на конечную концентрацию аллергена в пробе.

В литературе обычно указывается диапазон концентраций аллергенов. Например, для белковых аллергенов он находится в области мкг/мл-пкг/мл, для чего их разводят в 50-150 раз. Лекарственные аллергены активны в концентрациях мг/мл, их разводят 5-25-кратно [98]. Вероятно, что оптимальные концентрации аллергенов разных производителей могут значительно различаться в зависимости от способа их производства. Таким образом, подбор оптимальных концентраций ложится на плечи пользователей, что вносит некоторый субъективизм в оценку данного функционального теста. Многие производители реагентов рекомендуют использование нескольких концентраций аллергена для каждого пациента, что удорожает исследование.

В обзоре Woo-Jung Song и Yoon-Seok Chang [102] для большинства лекарственных препаратов (бета лактамы, фторхинолоны) указываются концентрации в мг/мл. Для жидких препаратов, например, рентгеноконтрастных веществ, рекомендуется разведение лекарственного средства 1:10 [103]. Ингаляционные аллергены, например *D.pteronysinus* [104], а также аллергены *Hymenoptera* [105] авторы использовали в концентрациях

нг/мл. Данный порядок концентраций рекомендован для применения в тесте активации базофилов компанией Buhlemann Laboratories AG, которая специализируется на выпуске этой продукции.

Согласно нашим данным [106] оптимальной концентрацией аллергенов производства АлкорБио (Россия) для использования в тесте активации базофилов является диапазон от 0,01 до 0,002 мг/мл, причем эти цифры схожи для пищевых (аллерген пшеницы) и ингаляционных (аллерген *Aspergillus fumigatus*) аллергенов у данного производителя.

## **11. Алгоритм проведения теста активации базофилов**

В алгоритм входит исследование спонтанной активации базофилов с буферным раствором (негативный контроль), исследование индуцированной активации базофилов, стимулированной анти-IgE-антителами или fMLP (позитивный контроль) и исследование индуцированной активации базофилов, стимулированной различными аллергенами (тестовая проба). Все этапы проведения теста подробно описаны в инструкциях, прилагаемым к коммерческим тест-системам.

Активация базофилов – процесс, требующий соблюдения ряда условий. При проведении тестов инкубация образцов цельной крови с потенциальными аллергенами в присутствии моноклональных антител для идентификации и определения активации базофилов проводится при оптимальной температуре 37°C в течение 15-20 минут на водяной бане в темноте в присутствии ионов кальция [97]. После этого активацию базофилов останавливают, эритроциты лизируют, лейкоциты стабилизируют реагентами, входящими в набор. После отмывания фосфатно-солевым буфером от дебриса и несвязавшихся антител и ресуспендирования в буфере пробы готовы для исследования методом проточной цитометрии.

В протоколе исследования в соответствии с рекомендациями фирм-производителей наборов проводят оценку 500 базофилов для получения статистически валидных результатов.

В зависимости от тех реагентов, которые использованы в наборе для идентификации базофилов и оценки их активации, протоколы цитометрического анализа различаются. На рис. 2, 3 и 4 показаны примеры поэтапного гейтирования в мультипараметрических протоколах для выделения чистой популяции базофилов с помощью различных комбинаций моноклональных антител.

В случае использования комбинации антител к CD3/CD294/CD203c (Рис.2) в соответствии с инструкцией к набору вначале на гистограмме по параметрам прямого FS и бокового SS светорассеяния отсекается дребес. Затем выделяется область исследования, где находятся клетки с низкими/средними параметрами бокового SS светорассеяния и негативные по CD3 для исключения Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа, экспрессирующих CD294.

Следующий шаг – выделение пула базофилов, позитивных по CD294 (CRTH2) и CD203c. В результате многоэтапного гейтирования на последней гистограмме CD203c против CD294 обозначена чисто выделенная популяция базофильных гранулоцитов, на которой в гейте L возможно оценить относительное количество активированных базофилов с фенотипом  $SSlowCD3^-CD294^+CD203c^{+++}$ , гиперэкспрессирующих молекулу CD203c, от общего числа базофилов  $SSlowCD3^-CD294^+CD203c^+$ .

## Алгоритм выбора целевой зоны для оценки активации базофилов CD3/CD294/CD203c

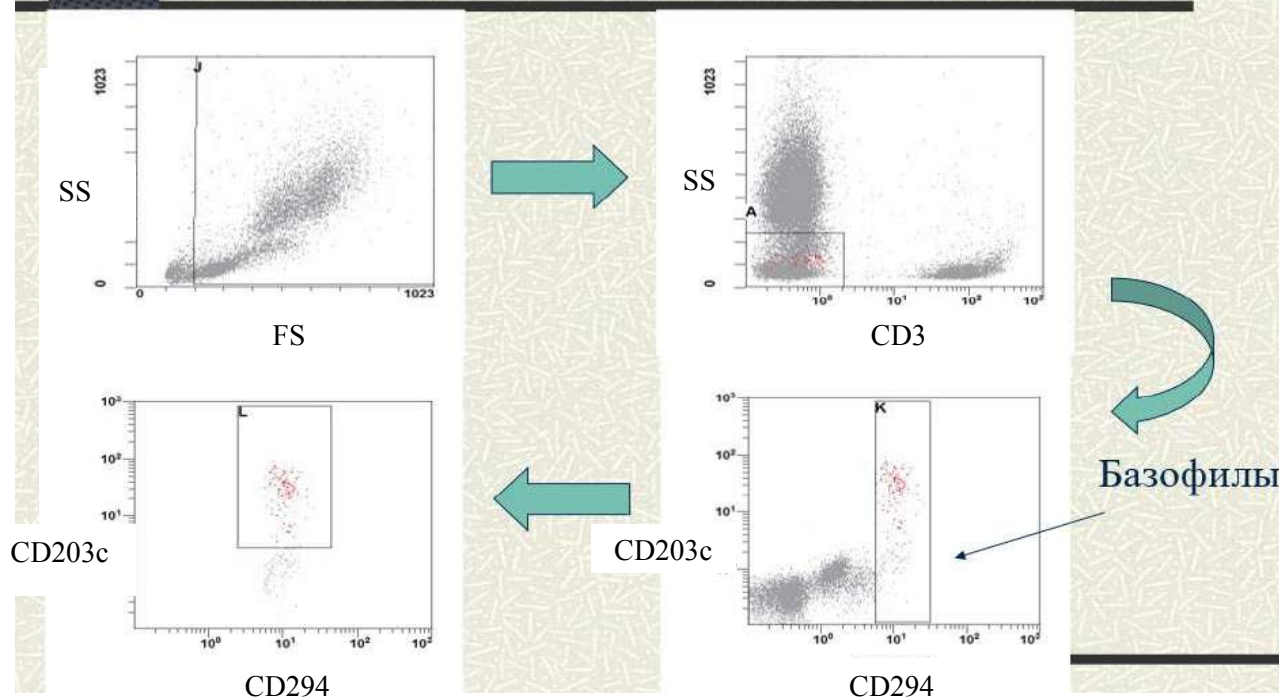


Рис.2. Алгоритм выбора целевой зоны для оценки активации базофилов при использовании маркеров CD3, CD294, CD203c.

В случае использования комбинации антител к CD123/HLA DR/CD63 (Рис.3) также вначале на гистограмме по параметрам прямого FS и бокового SS светорассеяния отсекается дебрис. Затем выделяется область исследования, где находятся клетки ярко позитивные по CD123 с низкими/средними показателями бокового SS светорассеяния для отсеечения эозинофилов. Следующий шаг – гейтирование базофилов на основании отсутствия экспрессии HLA DR для отсеечения моноцитов, экспрессирующих CD123. В результате многоэтапного гейтирования на последней гистограмме CD63 против CD123 обозначена чисто выделенная популяция базофильных гранулоцитов, на которой в гейте Q возможно оценить относительное количество активированных базофилов с

фенотипом  $SS^{low}CD123^{+}HLADR^{-}CD63^{+}$  с поверхностной экспрессией молекул CD63 от общего числа базофилов  $SS^{low}CD123^{+}HLADR^{-}$ .

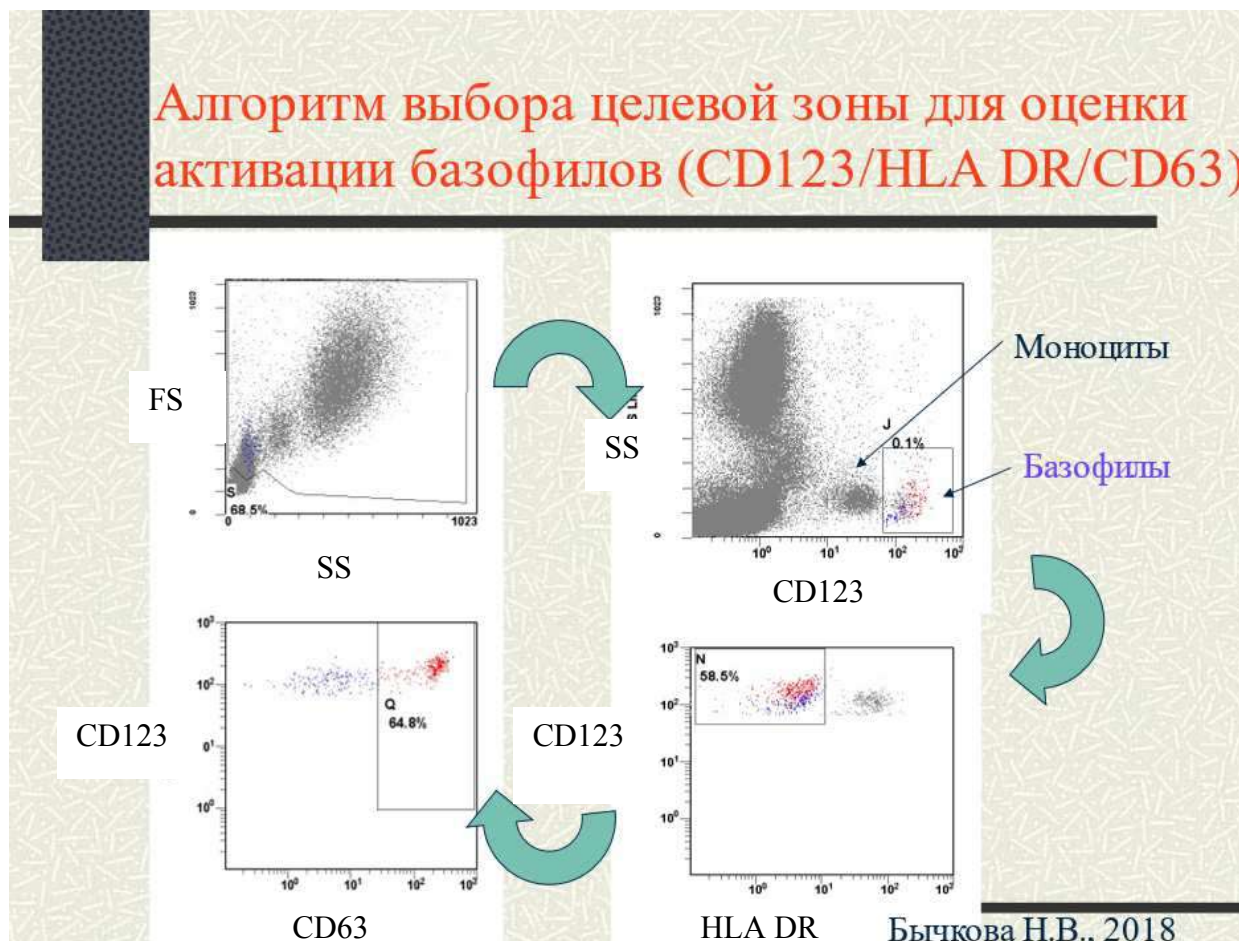


Рис.3. Алгоритм выбора целевой зоны для оценки активации базофилов при использовании маркеров CD123, HLA DR, CD63.

В случае использования комбинации антител к CCR3/CD63 (Рис.4) также вначале на гистограмме по параметрам прямого FS и бокового SS светорассеяния отсекается дебрис. Затем выделяется область исследования, где находятся клетки позитивные по CCR3 с низкими/средними показателями бокового SS светорассеяния для отсеечения эозинофилов. В результате многоэтапного гейтирования на последней гистограмме CD63 против CCR3 обозначена выделенная популяция базофильных гранулоцитов, на которой в гейте В2 возможно оценить относительное количество активированных



базофилов с фенотипом  $SS^{low}CCR3^{+}CD63^{+}$  с поверхностной экспрессией молекул CD63 от общего числа базофилов  $SS^{low} CCR3^{+}$ .

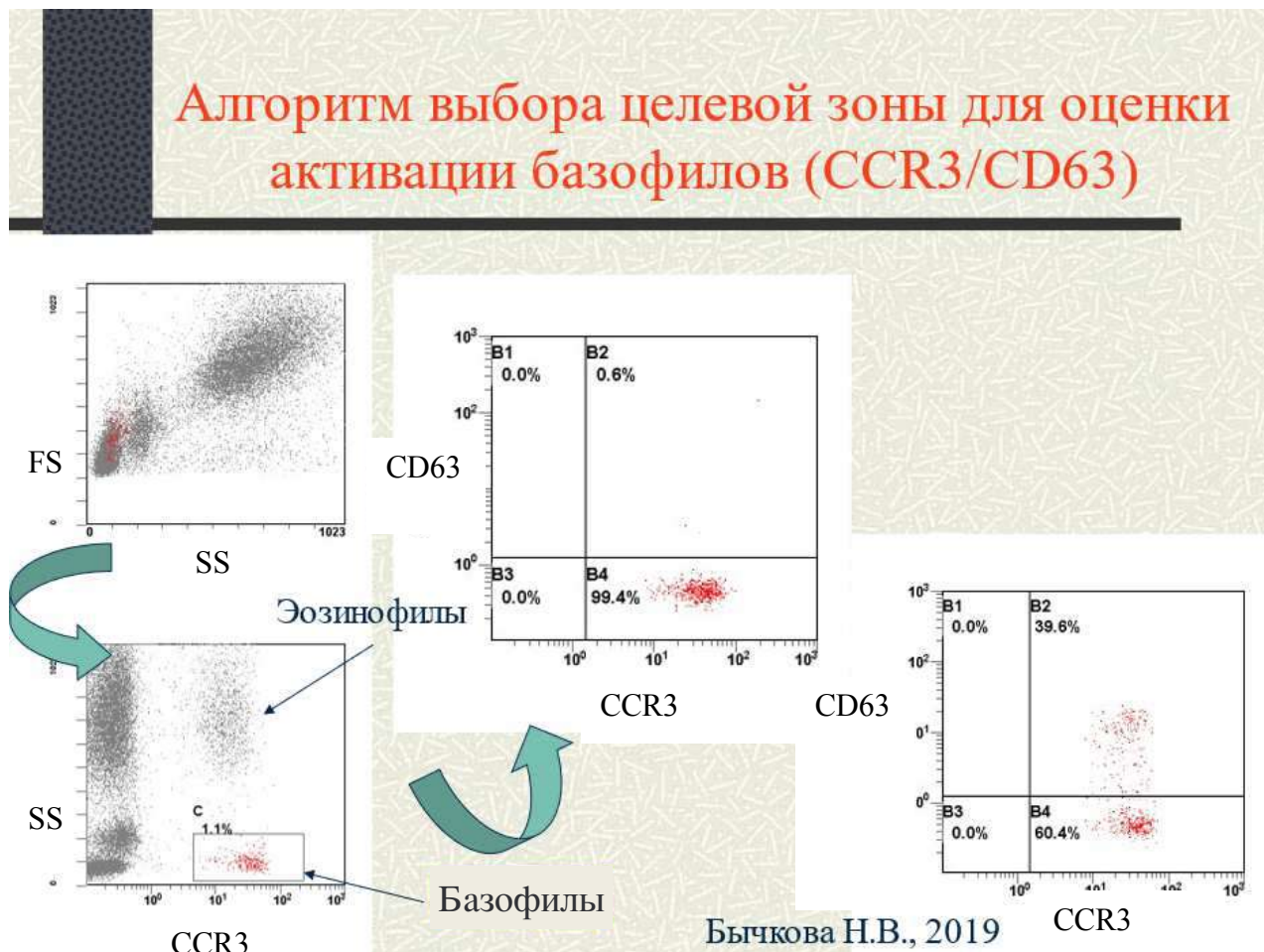


Рис.4. Алгоритм выбора целевой зоны для оценки активации базофилов при использовании маркеров CCR3, CD63.

Показано [107], что вариабельность результатов теста при использовании определенной тест-системы на цитометрах разных производителей невелика и не превышает 15%.

## 12. Оценка позитивности теста

На данный момент тест активации базофилов находится в процессе стандартизации, нет единых правил оценки позитивности теста. Существуют два главных подхода к определению активации базофилов.

Во-первых, это оценка реактивности базофилов по соотношению количества активированных клеток в пробе с аллергеном по сравнению с их уровнем в пробе с буферным раствором [40], которая выражается в виде индекса стимуляции/активации базофилов. Порог позитивности (cut-off), на основании которого тест считается положительным, также отличается у разных исследователей. Тест с аллергеном разными авторами рассматривается в качестве позитивного при различных индексах стимуляции, например, более 2 [108,109], более 1,73 [96], более 1,1 и 1,05 [106], более 1,06 [110]. Во многих работах cut-off для разных аллергенов выбирается на основании проведения ROC-анализа.

Логично предположить, что наблюдается связь между используемой концентрацией аллергена в тесте и пороговым значением индекса активации базофилов. Повышая концентрацию аллергена с целью увеличения специфичности методики, специалист будет вынужден увеличить пороговое значение индекса. Это может привести к потере чувствительности на основании того, что у пациентов с незначительным уровнем сенсibilизации, и, как следствие, с не очень высоким индексом активации базофилов, будут получены негативные результаты теста. Использование низкой концентрации аллергена, в свою очередь, также может повлиять на результат и привести к ложнонегативным результатам теста. По нашему мнению, [106], для разделения сенсibilизированных и толерантных пациентов желательно использовать как невысокий индекс активации, чтобы выявить, в том числе, и больных с низким уровнем сенсibilизации, так и небольшую концентрацию аллергена. Немаловажно, что использование невысокой концентрации аллергена приведет к отсутствию ложнопозитивных результатов, обусловленных неспецифической

активацией базофилов, рецепторный аппарат которых очень тонко реагирует на любые изменения окружающей среды.

Вторым подходом к оценке теста активации базофилов является установление чувствительности базофилов на основании определения концентрации аллергена, при которой половина всех проанализированных базофилов становятся активированными [111]. Последний подход наиболее востребован при оценке эффективности АСИТ-терапии. Этот вариант оценки позитивности теста с определением чувствительности базофилов используют при применении активационного маркера CD63.

### **13. Методические подходы к проведению теста активации базофилов с набором Allergenicity kit (BECKMAN COULTER)**

Тест активации базофилов методом проточной цитометрии был предложен для диагностики аллергических реакций в последнее десятилетие 20-го века. Поскольку тест является новым, к настоящему моменту разработаны только общие принципы метода. Многие технические детали, касающиеся использования разных коммерческих наборов с их особенностями, аллергенов, подбора концентраций использованных аллергенов, выбора порога позитивности и т.д. отдаются на усмотрение специалистам, которые возьмут на себя труд применения этого нового метода.

В практику работы лаборатории клинической иммунологии ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России тест активации базофилов был внедрен в 2007 году, первая публикация вышла в 2009 году [112]. Почти за 15 лет его использования накопился позитивный опыт, который обобщен в этой главе.

#### **13.1. Особенности преаналитического этапа**

Поскольку в нашей лаборатории для выявления сенсibilизации в тесте активации базофилов используются многочисленные препараты и материалы,

требующие разной подготовки, а также поступление образцов периферической крови происходит из различных организаций, нами был разработан алгоритм доставки образцов в клинику для исследования. Каждая лаборатория, сотрудничающая с нами на платформе аутсорсинга, письменно ознакомлена с алгоритмом доставки препаратов и материалов для исследования в тесте активации базофилов.

### **13.2. Алгоритм доставки образцов в лабораторию**

#### **1. В случае тестирования пищевых и ингаляционных аллергенов:**

Позвонить в лабораторию клинической иммунологии и уточнить наличие необходимых для исследования аллергенов. В наличии постоянно имеется большой спектр пищевых аллергенов, аллергены клещей домашней пыли, панели аллергенов деревьев, сорных и луговых трав. Кровь пациента на исследование с указанием аллергенов возможно привезти в любой приемный день.

#### **2. В случае тестирования лекарственных препаратов:**

Позвонить в лабораторию клинической иммунологии и уточнить наличие необходимых препаратов в лаборатории.

В том случае, если:

А) препарат есть в жидкой форме или в лиофилизированном состоянии, то кровь пациента возможно привезти в любой приемный день,

Б) препарат есть в форме таблеток или капсул, в этом случае требуется сообщить в лабораторию о дате сдачи крови пациентом для подготовки препарата к нужному дню (возможно исследование со вторника по пятницу),

В) нужного препарата в лаборатории нет, но лекарство в жидкой форме, возможно привезти кровь и препарат вместе в любой приемный день,

Г) нужного препарата в лаборатории нет, лекарство в таблетированной форме, тогда заранее (как минимум за сутки) курьер привозит препарат в лабораторию клинической иммунологии с указанием дня взятия крови для

подготовки препарата к нужному дню (возможно исследование со вторника по пятницу). Достаточно 1 таблетки или капсулы, на упаковке четко должны быть видны название, дозировка, фирма-производитель, страна производства (или приложить напечатанный бланк с данными, если на блистере невозможно прочесть). Не допускается доставка препарата с нарушенной целостностью заводской упаковки.

В лаборатории всегда в наличии йодсодержащие рентгеноконтрастные вещества ультравист, оптирей, омнипак, а также местные анестетики лидокаин, скандонест, мепивастезин, ультракаин Д, ультракаин Д-С, ультракаин Д-С форте, септанест, убистезин, убистезин форте, артикаин.

3. В случае тестирования материалов для стоматологии и ортопедии (коронки, имплантаты, материалы для пломбирования и протезирования, брекетты и т.д.):

Доставка стоматологических материалов осуществляется заранее (как минимум за сутки). В направлении указывается количество, названия и производители материалов, дата взятия крови на исследование. Предпочтительно предоставление материалов в стерильном виде. При невозможности предоставления стерильных образцов стерилизация с использованием нужного режима проводится во ВЦЭРМ, занимает не менее 2-х дней, дата сдачи крови пациентом оговаривается отдельно в каждом конкретном случае.

### **13.3. Подготовка аллергенов**

Этапы подготовки аллергена, используемого в тесте, различаются в зависимости от его вида.

Для жидких аллергенов не требуется длительная подготовка, достаточно определить необходимую концентрацию. Нами [106] был предложен вариант определения оптимальной концентрации аллергенов для теста активации базофилов на примере аллергенов *Aspergillus fumigatus* и пшеницы с

использованием групп пациентов с доказанной сенсibilизацией и без таковой. К сожалению, не для всех аллергенов, особенно лекарственных, такое возможно. Для исключения ложноположительных результатов при использовании каждого нового аллергена желательно определить на здоровых несенсибилизированных людях ту концентрацию аллергена, которая не будет вызывать повышенную активацию базофилов.

Для определения сенсibilизации к пищевым, пыльцевым, бытовым, эпидермальным аллергенам в нашей лаборатории используются жидкие стандартные аллергены (Siemens), поставляемые для измерения специфических IgE с помощью анализатора Immulite 2000 Systems (Siemens), а также методом твердофазного иммуноферментного анализа (АлкорБио). Среди последних для определения сенсibilизации к мажорным и минорным аллергенам березы и тимофеевки используются рекомбинантные молекулы rBet v1, rBet v2, rBet v4, rPhl p1, rPhl p5, rPhl p12. В нашей лаборатории при использовании аллергенов Siemens соотношение аллергена к образцу крови составляет 1:25, АлкорБио – 1:50, кроме аллергенов белков коровьего молока и пшеницы, где разведение 1:400. Например, при использовании 100мкл периферической крови на тестовую пробирку согласно инструкции к набору Allergenicity kit необходимо добавить 20мкл аллергена, который будет состоять из 4мкл аллергена (Siemens) и 16мкл дистиллированной воды для инъекций или 2мкл аллергена (АлкорБио, кроме аллергенов белков коровьего молока и пшеницы) и 18мкл дистиллированной воды для инъекций). Поскольку существует понятие межлотовой вариации, указанные разведения являются рекомендательными и зависят от используемого лота реагентов.

Для определения сенсibilизации к жидким лекарственным средствам (главным образом, к местным анестетикам групп лидокаина, артикаина, мепивакаина, йодсодержащим низкоосмолярным рентгеноконтрастным веществам на основе йопромида, йогексола, йоверсола) и ряду других препаратов оптимальным соотношением аллергена к образцу крови также является 1:25. Некоторые препараты, например пропофол, при этом разведении

вызывают неспецифическую активацию базофилов, поэтому его используют в разведении 1:400 для исключения ложнопозитивных результатов.

Нами разработана методика подготовки лекарственных препаратов, находящихся в таблетированной форме с использованием контактного водного раствора. Накануне исследования к таблетке лекарственного средства, помещенной в стерильную стеклянную тару, добавляется 1 мл дистиллированной воды для инъекций, пробирка плотно закрывается крышкой и перемещается в термостат при 37<sup>0</sup>С. В день исследования аккуратно, не взбалтывая, отбирается надосадочная жидкость и используется в качестве аллергена. Надосадочная жидкость применяется в разведении 1:25 по отношению к образцу крови. Для ряда препаратов (антиагреганты, например, клопидогрел и аспирин, антибиотики группы фторхинолонов, ферментные препараты, например, креон и вобэнзим и др.) надосадочная жидкость используется в разведении – 1:400 для исключения ложнопозитивных результатов.

Нами разработана методика подготовки образцов материалов, используемых в ортопедии и стоматологии [113], в дальнейшем на ее основании был получен патент [114]. Предварительно стерилизованные в нужном режиме образцы изделий из сплавов металлов, различных пластмасс, керамики и т.д. накануне исследования помещаются в стерильную стеклянную тару, добавляется дистиллированная вода для инъекций так, чтобы полностью закрыть образец, затем пробирка плотно закрывается крышкой и перемещается в термостат при 37<sup>0</sup>С. В день исследования отбирается надосадочная жидкость и используется в качестве аллергена. Надосадочная жидкость применяется в разведении 1:5 по отношению к образцу крови.

### 13.4. Методика подготовки образца для исследования (согласно инструкции фирмы-производителя с комментариями)

1. В пробирку внести 100 мкл цельной периферической крови с гепарином (желательно) или ЭДТА,  
20 мкл коктейля антител CD294-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7,  
20 мкл PBS (негативный контроль)/ либо 20 мкл анти-IgE антител (позитивный контроль)/ либо 20 мкл аллергена (тест),  
100 мкл активирующего раствора (в случае использования крови, забранной в вакутейнер с ЭДТА).
2. Перемешать на вортексе в течение нескольких секунд.
3. Инкубировать 15 минут при 37°C в темноте (водяная баня).
4. Внести 100 мкл Stop-реагента (остановка активации базофилов *in vitro*)
5. Перемешать на вортексе в течение нескольких секунд.
6. Внести 2 мл лизирующего/фиксирующего реагента, приготовленного *ex tempore* (2 мл лизирующего реагента Lysing Solution + 50 мкл фиксирующего реагента Fixative Solution)
7. Перемешать на вортексе в течение нескольких секунд
8. Инкубировать 10 минут при 18-25°C в темноте
9. Центрифугировать 5 минут при 200g. Отобрать аспират.
10. Внести к осадку клеток 3 мл PBS.
11. Центрифугировать 5 минут при 200g. Отобрать аспират.
12. Ресуспендировать осадок в 500 мкл PBS с 0,1% формальдегидом

Для лучшей воспроизводимости методики необходимо первой в пробирки вносить кровь, затем антитела, аллерген и активирующий раствор.

Согласно инструкции производителя набора лиофилизированные анти-IgE антитела после растворения аликвотируют и замораживают при -40°C. Перед каждым использованием тест-системы необходимо разморозить образец с позитивным контролем и развести в 10 раз дистиллированной водой для



инъекций. Негативный и позитивный контроли используют для каждого пациента.

Важно! Ввиду крайней чувствительности базофилов к любым изменениям окружающей среды, в т.ч. pH раствора, для получения корректных результатов необходимо использовать готовые стандартные буферные растворы (например, Isoton (BECKMAN COULTER), одноразовые пробирки и наконечники.

Согласно нашему опыту у приблизительно 95% пациентов возможно использование 50мкл крови с пропорциональным уменьшением всех используемых реагентов. Этого количества биоматериала достаточно для накопления 500 базофилов, как рекомендовано инструкцией производителя.

### **13.5. Учет данных на проточном анализаторе**

После адекватной подготовки образцов крови в тот же день проводят оценку не менее 500 базофилов методом проточной цитометрии в мультипараметрическом протоколе с многоэтапным гейтированием. В инструкции к наборам обозначены необходимые для правильной настройки протокола гистограммы и порядок гейтирования нужной популяции клеток.

Протокол для оценки активации базофилов создают с учетом корректной настройки параметров напряжения для каналов прямого и бокового светорассеяния, а также для первого (CD294-FITC), второго (CD203c-PE) и пятого (CD3-PC7) каналов флуоресценции. В дополнение производят введение коэффициентов компенсации согласно правилам настройки проточных цитометров [115].

Одним из сложных моментов работы с протоколом является определение области активированных базофилов среди всей популяции этих клеток. На практическом семинаре в рамках EUROBUT 2016 ведущими мировыми специалистами в области оценки сенсibilизации методом клеточного анализа A.Santos, C.Mayorga, V.Eberlein, H.Hoffmann в устных сообщениях было рекомендовано определять активированные базофилы как клетки, наиболее

ярко экспрессирующие маркеры активации (CD203c или CD63). Выделение этой популяции, а именно при использовании набора Allergenicity kit клеток с фенотипом  $SSlowCD294^+CD3^-CD203c^{+++}$ , в некоторых случаях может вызвать затруднение.

Изменение порядка гейтирования и введение в протокол дополнительной (по отношению к протоколу гейтирования, описанному в инструкции к набору) гистограммы CD203c против CD3 (Рис.5а и 5б А, В) позволяет с большей точностью определить популяцию активированных базофилов  $SSlowCD294^+CD3^-CD203c^{+++}$  (гейт Н) среди всех базофилов с фенотипом  $SSlowCD294^+CD3^-CD203c^+$  (гейт G), что вносит вклад в минимизирование неизбежного субъективизма при оценке гистограмм.

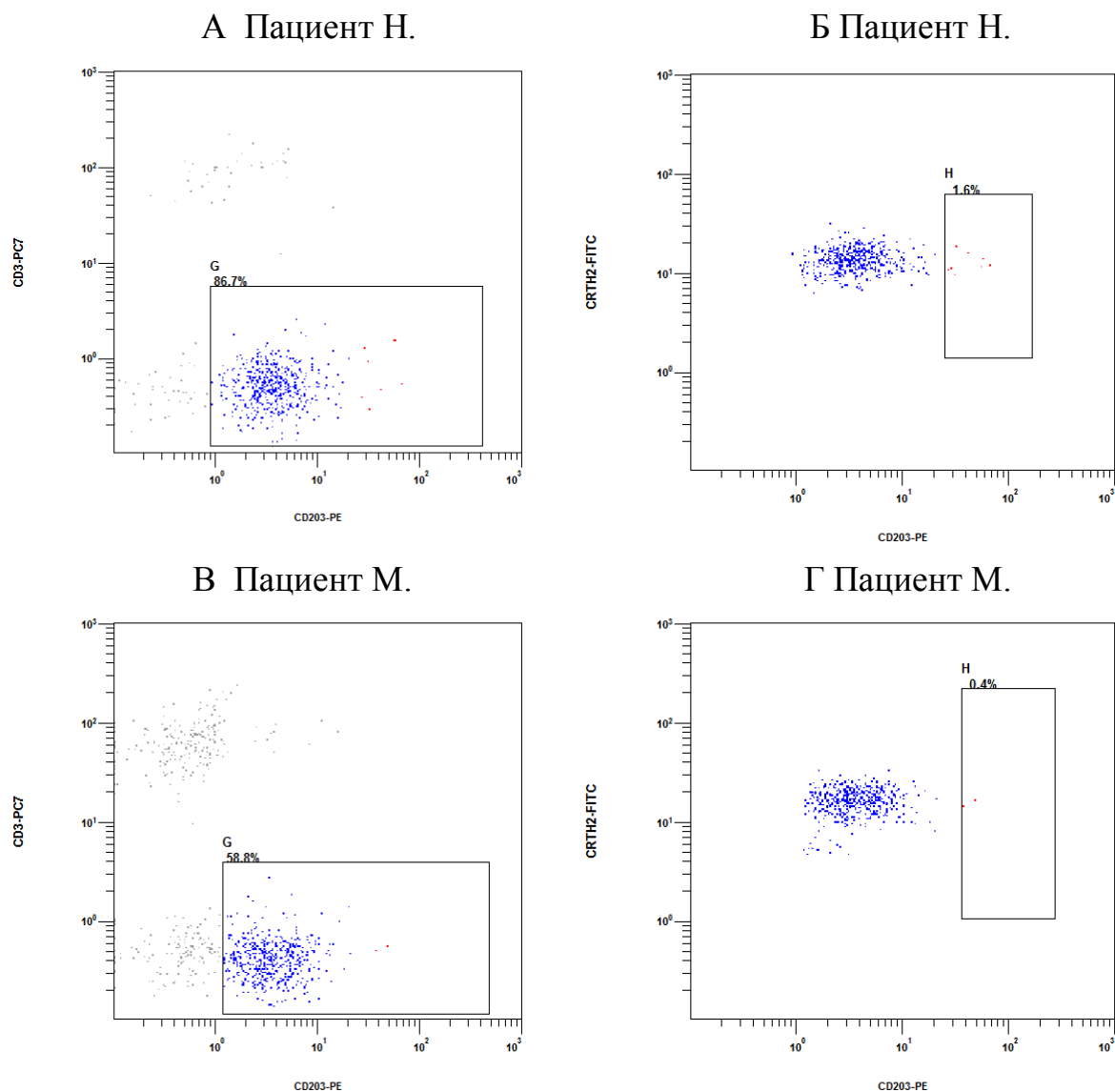
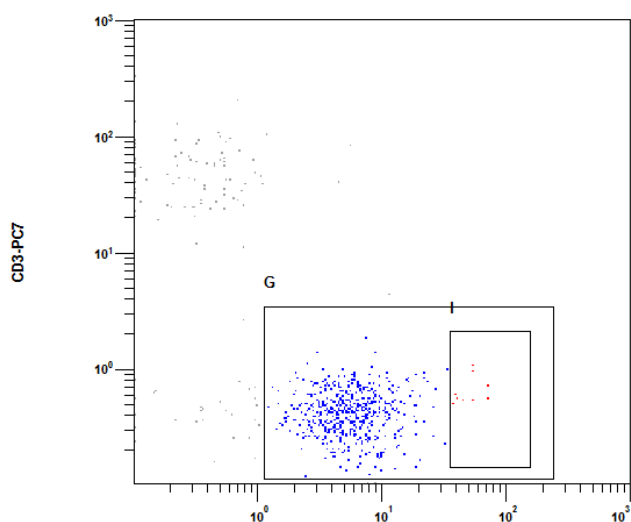


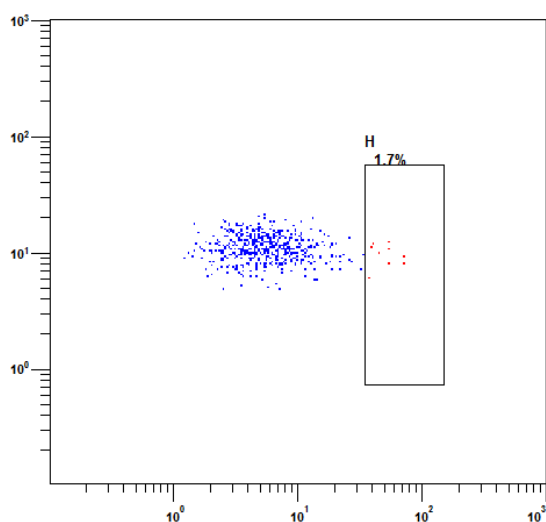
Рис.5а. Гистограммы.

На рис. 5а на гистограммах А, В по оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции по 2-му каналу (CD203с-PE), по оси ординат – по 5-му каналу (CD3-PC7). На гистограммах Б, Г по оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции по 2-му каналу (CD203с-PE), по оси ординат – по 1-му каналу (CD294(CRTH2)-FITC). На гистограммах отображена общая популяция базофилов с фенотипом  $SSlowCD294^+CD3^-CD203c^+$  (гейт G) и активированных базофилов с фенотипом  $SSlowCD294^+CD3^-CD203c^{+++}$  (гейт H).

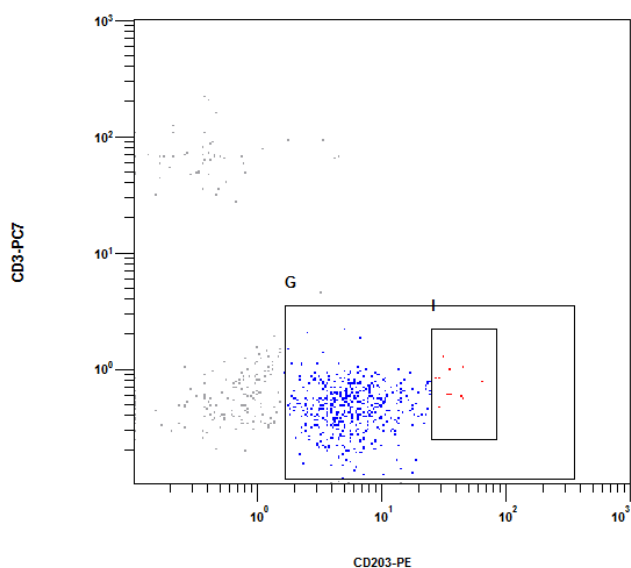
А Пациент К.



Б Пациент К.



В Пациент О.



Г Пациент О.

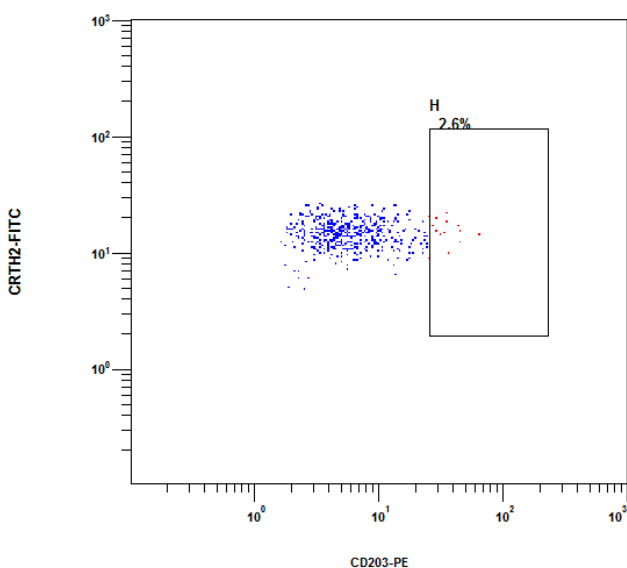


Рис.5б. Гистограммы.

На рис. 5б на гистограммах А, В по оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции по 2-му каналу (CD203c-PE), по оси ординат – по 5-му каналу (CD3-PC7). На гистограммах Б, Г по оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции по 2-му каналу (CD203c-PE), по оси ординат – по 1-му каналу (CD294(CRTH2)-FITC). На гистограммах отображена общая популяция базофилов с фенотипом  $SS_{\text{low}}CD294^+CD3^-CD203c^+$  (гейт G) и активированных базофилов с фенотипом  $SS_{\text{low}}CD294^+CD3^-CD203c^{+++}$  (гейт H).

На рис.5а на гистограммах Б и Г пациентов Н. и М. уверенно идентифицируется пул активированных базофилов. В то же время определение  $SS_{\text{low}}CD294^+CD203c^{+++}$  базофилов может вызвать затруднение при оценке гистограмм пациентов К. и О. на рис.5б Б и Г. С использованием дополнительных гистограмм CD203c против CD3 (рис. 5б А и В) пул базофилов с высокой экспрессией CD203c можно определить с большей точностью.

В итоге алгоритм гейтирования пула базофилов будет выглядеть следующим образом (рис.6). Вначале на гистограмме по параметрам прямого FS и бокового SS светорассеяния отсекается дребрис. Затем выделяется область исследования, где находятся клетки, позитивные по CD294 (CRTH2) с низкими/средними показателями бокового SS светорассеяния для отсеечения эозинофилов. Следующий шаг – гейтирование базофилов на основании экспрессии CD203c для отсеечения провоспалительных моноцитов и Т-лимфоцитов 2 типа, экспрессирующих CD294. В результате многоэтапного гейтирования на последней гистограмме CD203c против CD294 обозначена чисто выделенная популяция базофильных гранулоцитов, на которой в гейте F возможно оценить относительное количество активированных базофилов с фенотипом  $SS_{\text{low}}CD3^-CD294^+CD203c^{+++}$ , гиперэкспрессирующих молекулу CD203c, от общего числа базофилов  $SS_{\text{low}}CD3^-CD294^+CD203c^+$ .

Современные проточные цитометры имеют возможность записывать файлы в режиме listmode, что позволяет пересматривать записанные файлы повторно, менять в случае необходимости коэффициенты компенсации, а также

переставлять любые гейты (логические ограничения) для более точного выделения базофилов и определения активированных клеток. При необходимости провести более тонкую настройку протокола в режиме listmode для определенного пациента, необходимо пересмотреть в программном обеспечении все файлы (негативный и позитивный контроли, а также все тестовые пробы с аллергенами), в новых настройках и скорректировать относительное количество активированных базофилов, полученное для каждой позиции.

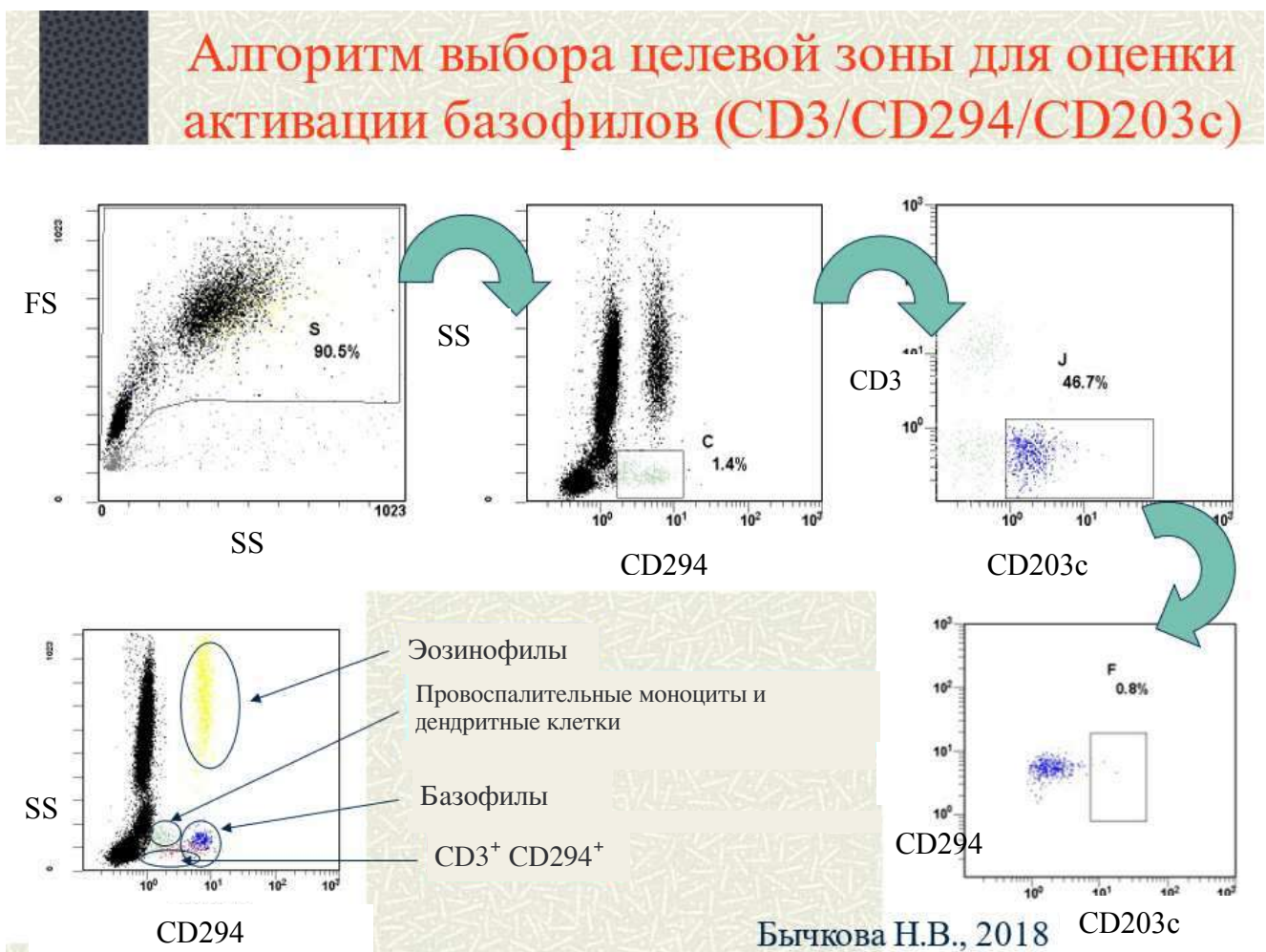


Рис.6. Алгоритм выбора целевой зоны для оценки активации базофилов при использовании маркеров CD3, CD294, CD203c.

В результате проведения цитометрического анализа оценивается количество активированных базофилов  $SSlowCD3^{-}CD294^{+}CD203c^{+++}$ , в негативном и позитивном контролях, а также пробах с аллергенами относительно общего количества всех проанализированных базофилов  $SSlowCD3^{-}CD294^{+}CD203c^{+}$ .

Дополнение протокола гистограммой CD3 против CD294 дает возможность определения в лимфоцитарном регионе популяции Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа с фенотипом  $FSlowSSlowCD3^{+}CD294^{+}(CRTH2^{+})$ .

### **13.6. Оформление бланка с результатами**

Для комплексной оценки теста активации базофилов в бланке с результатами необходимо указывать (Рис.7) относительное количество активированных базофилов в негативном контроле (спонтанная активация базофилов), в позитивном контроле (индуцированная анти-IgE-антителами активация базофилов), в пробе с каждым аллергеном (индуцированная аллергенами активация базофилов) с указанием индекса активации к каждому аллергену, а также количество Т-клеток 2 типа иммунного ответа  $FSlowSSlowCD3^{+}CD294^{+}$ .

Как выше было указано, индекс активации (стимуляции) на аллерген — это отношение количества активированных базофилов в пробе с аллергеном к количеству активированных базофилов в пробе с буферным раствором. Индекс активации показывает, насколько количество активированных базофилов в пробах с аллергенами соотносится с данным показателем в пробе с буферным раствором (сопоставимое или выше). В бланке обязательно приводятся референтные интервалы для каждого показателя, принятые в лаборатории.

В соответствии с Федеральным законом № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 года интерпретация результатов исследований, установление диагноза, а также назначение лечения, должны производиться врачом соответствующей

специализации. Поскольку диагностика аллергии является комплексной с учетом анамнеза пациента, клинической картины заболевания и лабораторных данных, то для пациента в бланке есть стандартный комментарий (Рис.7), указывающий, что диагноз аллергии формируется лечащим врачом по совокупности всех данных, а не только на основании лабораторного обследования. Также в комментарии отражено, что отсутствие выявления сенсibilизации полностью не гарантирует невозможность клинических проявлений аллергической реакции.

### ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России

Россия, 194044, Выборгский р-н, ул Академика Лебедева, д.4/2 тел.: (812)339-3939

<b>Пациент:</b>	<b>КЕС</b>	<b>Категория:</b>	050
<b>Регистр. №</b>	100580272, ИБ № 21572/А2021	<b>Пол/Возраст:</b>	Мужской / 6лет
<b>Лаб. номер :</b>	<b>2141511</b>	<b>Дата печати:</b>	15.03.2021 17:13

#### Иммунологические исследования

##### Активация базофилов in vitro.

<u>Т-хелперы 2</u>			
Т-хелперы 2 (CD3+CD294+)	0.5	%	(0.0 - 0.6)
<u>Выявление спонтанной и индуцированной активации базофилов</u>			
Позитивный контроль базофилов	21.40	%	(>16.00)
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++)			
в периферической крови (спонтанная активация базофилов)	1.40	%	(0.20 - 4.00)
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++)			
после инкубации с препаратом аллерген из домашней пыли	<b>31.30 *</b>	%	(0.20 - 4.00)
<b>Индекс активации базофилов на препарат 1</b>	<b>22.36 *</b>		<b>(0.01 - 1.1)</b>
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++)			
после инкубации с препаратом аллерген из клеща	1.80	%	(0.20 - 4.00)
2 D.pteronissinus			
<b>Индекс активации базофилов на препарат 2</b>	<b>1.29 *</b>		<b>(0.01 - 1.1)</b>
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++)			
после инкубации с препаратом панель аллергенов плесени	0.20	%	(0.20 - 4.00)
3 (Penicillium notatum, Cladosporium herbarum, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Alternaria tenuis)			
<b>Индекс активации базофилов на препарат 3</b>	<b>0.14</b>		<b>(0.01 - 1.1)</b>

*Отсутствие выявления сенсibilизации к препаратам/материалам в тесте активации базофилов снижает вероятность, но полностью не исключает аллергическую/псевдоаллергическую реакцию при их использовании, поскольку не выявляет реакции, развивающиеся по клеточному типу. Окончательный диагноз формируется лечащим врачом.*

Рис.7. Бланк выдачи результатов обследования.

## **14. Проблемы, возникающие при проведении теста активации базофилов и возможности их решения**

Ряд факторов могут искажать результат функциональных лабораторных методов, к которым относится и тест активации базофилов. Многие из них подробно были описаны выше в разных разделах, но мы позволили себе сгруппировать их в данной главе для того, чтобы акцентировать внимание на этих важных факторах, значительно влияющих на получение корректного результата теста.

На преаналитическом этапе этими факторами являются прием пациентом глюкокортикостероидов, длительность транспортировки образца с кровью, выбор антикоагулянта.

Показано [107], что прием как местных, так и системных глюкокортикостероидных гормонов, а также использование мазей на основе этих гормонов, снижает реактивность базофилов и, соответственно, чувствительность исследования. Для получения корректного результата теста после глюкокортикостероидной терапии проведение теста рекомендовано не раньше, чем через 2-3 недели. Применение антигистаминовых препаратов не оказывает влияния на результат тестирования [107], поскольку блокирование препаратами действия гистамина на H1-рецепторы по механизму конкурентного ингибирования не предотвращает дегрануляцию базофилов.

Для сохранения максимальной жизнеспособности базофилов рекомендуется проводить анализ активации клеток в период длительностью не более 4 часов после взятия крови [116] (а в идеале – в течение часа), позже происходит снижение их реактивности. Помимо увеличения базового уровня CD203c<sup>+++</sup> базофилов в процессе нахождения крови в вакутейнере, что может затруднить интерпретацию данных, Sturm G.J. с соавторами [107] наблюдали снижение специфической активации в тесте с аллергеном при длительном (до суток) хранении пробы.



Для предотвращения свертывания крови желательно использовать в качестве антикоагулянта гепарин [98], как и для других функциональных тестов, потому что он минимально влияет на функциональную активность лейкоцитов и не требует внесения специальных Са-обогащенных буферов.

Как и для других методов лабораторной диагностики, аналитический этап теста активации базофилов значительно зависит от квалификации специалиста в области проточной цитометрии, а также от опыта его работы с коммерческими тест-системами, которые имеют свои особенности в зависимости от используемых в них маркеров для идентификации и оценки активации базофилов. Необходимо производить корректную настройку параметров напряжения и компенсации в рабочем протоколе, а также своевременно осуществлять внешний и внутренний контроль качества на проточном цитометре для уверенности в правильной работе анализатора.

На постаналитическом этапе исследования важным является анализ полученного результата в контексте достоверности и биологической вероятности, включающий оценку влияния терапии, а также сопоставление результата с референтными интервалами. В настоящее время единых референтных интервалов для тест-систем, оценивающих активацию базофилов, не существует. Не разработано отечественных или международных согласительных документов по окончательной стандартизации этого метода, поэтому для каждой лаборатории, проводящей диагностику с использованием теста, допускается [12] вводить свои пороговые значения.

На результат теста активации базофилов влияет острота и тяжесть состояния пациента. При тяжелых острых аллергических реакциях интерпретация теста иногда затруднена, потому что может наблюдаться значительное снижение количества базофилов в периферической крови, как показано для острого периода анафилаксии [116]. Выраженная базопения может привести к статистически недостоверному результату теста, что необходимо указывать в комментарии (рис. 8).

## ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России

Россия, 194044, Выборгский р-н, ул Академика Лебедева, д.4/2 тел.: (812)339-3939

Пациент:	БЛВ	Категория:	050
Регистр. №	100298135, ИБ № 14761/A2021	Пол/Возраст:	Женский / 57лет
Лаб. номер:	2154696	Дата печати:	16.03.2021 15:55

### Иммунологические исследования

#### Активация базофилов in vitro.

<u>Т-хелперы 2</u> Т-хелперы 2 (CD3+CD294+)	2.6 *	%	(0.1 - 1.5)
<u>Выявление спонтанной и индуцированной активации базофилов</u>			
Позитивный контроль базофилов	65.50	%	(>16.00)
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++) в периферической крови (спонтанная активация базофилов)	3.00	%	(0.20 - 4.00)
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++) после инкубации с препаратом Таваник (левофлоксацин) 500мг (Санофи Винтроп Индустрия, Франция)	4.00	%	(0.20 - 4.00)

**Индекс активации базофилов** 1.33 \* (0.01 - 1.1)

В образце периферической крови проанализировано 120000 лейкоцитов, выявлено 33 базофильных гранулоцита (0,027% от лейкоцитов). Результат исследования может быть статистически недостоверным, потому что количество базофилов в образце крови пациента значительно ниже, чем требуется для корректной постановки теста. Применение теста активации базофилов для исследования аллергической реакции будет целесообразно исключительно после восстановления популяции базофильных гранулоцитов.

Рис.8. Бланк выдачи результатов обследования пациента с выраженной базопенией.

Для корректной интерпретации, согласно инструкциям к наборам, требуется оценить не менее 500 базофилов в каждой пробе. Пациенту, особенно с выраженными отеками, может быть рекомендовано проводить диагностику в отсроченном периоде после купирования выраженных симптомов аллергической реакции.

Отдельной проблемой, затрудняющей в некоторых случаях получение корректного результата с использованием данного теста, является наличие в популяции 5-10% «нонреспондеров» - индивидуумов, базофилы которых не активируются поликлональными анти-IgE антителами или (реже) неспецифическим активатором fMLP (обязательный позитивный контроль теста).

Как уже говорилось, у «нонреспондеров» невозможна корректная интерпретация отрицательных результатов в тесте с аллергеном, что необходимо указывать в комментарии к тесту (рис. 9).

### ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России

Россия, 194044, Выборгский р-н, ул Академика Лебедева, д.4/2 тел.: (812)339-3939

<b>Пациент:</b>	<b>СТС</b>	<b>Категория:</b>	011ФПС
<b>Регистр. №</b>	100568287, ИБ № 1807/С2021	<b>Пол/Возраст:</b>	Женский / 40лет
<b>Лаб. номер:</b>	<b>2160567</b>	<b>Дата печати:</b>	16.03.2021 15:04

#### Иммунологические исследования

##### Активация базофилов *in vitro*.

<u>Т-хелперы 2</u>			
Т-хелперы 2 (CD3+CD294+)	0.6	%	(0.1 - 1.5)
<u>Выявление спонтанной и индуцированной активации базофилов</u>			
Позитивный контроль базофилов	<b>1.20</b>	<b>*</b> %	(>16.00)
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++) в периферической крови (спонтанная активация базофилов)			
	1.10	%	(0.20 - 4.00)
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++) после инкубации с препаратом Пропофол Каби (пропофол 1			
	1.10	%	(0.20 - 4.00)
	20мг/мл), Фрезениус Каби Австрия ГмбХ, Австрия		
<b>Индекс активации базофилов на препарат 1</b>	<b>1.00</b>		<b>(0.01 - 1.1)</b>
Количество активированных базофилов (CD3-CRTH2+CD203c++) после инкубации с препаратом Лидокаин 20мг/мл, ОАО 2			
	0.20	%	(0.20 - 4.00)
	"Дальхимфарм", Россия		
<b>Индекс активации базофилов на препарат 2</b>	<b>0.18</b>		<b>(0.01 - 1.1)</b>

Ввиду особенностей организма и/или проводимой терапии у пациента не отмечается необходимого уровня активации базофилов в тесте с позитивным контролем (частота встречаемости подобной реакции в общей популяции менее 5%). Результаты тестов с препаратами могут быть ложноотрицательными.

Рис.9. Бланк выдачи результатов обследования пациента-«нонреспондера».

Как и при любом другом методе лабораторной диагностики, специфичность и чувствительность оценки сенсibilизации к аллергенам при помощи данного теста, как правило, не достигает 100%. Во многом это объясняется невозможностью полностью воспроизвести *in vitro* все особенности аллергических реакций *in vivo*.

## **15. Комплексная интерпретация данных теста активации базофилов**

Необходимо подчеркнуть, что результаты теста активации базофилов включают несколько параметров, комплексная оценка которых дает аллергологу-иммунологу полную информацию не только о наличии сенсibilизации к аллергенам, но и характеризует особенности иммунного ответа пациента. Параметры, входящие в комплексную оценку – спонтанная, индуцированная anti-IgE антителами и аллергенами активация базофилов, а также относительное содержание Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа.

### **15.1. Спонтанная активация базофилов**

На основании анализа результатов собственных исследований возможно утверждать, что исследование спонтанной активации базофилов в случае использования для ее оценки маркера CD203c необходима не только для правильной техники выполнения теста, но также имеет и клиническое значение.

Показано, что спонтанная активация базофилов у больных рассеянным склерозом [117], а также пациентов с хронической крапивницей [118] и атопическим дерматитом [119] выше, чем у здоровых волонтеров того же возраста. Дополнительно выявлено [119], что спонтанная активация базофилов у детей с атопическим дерматитом при обострении заболевания достоверно выше, чем в ремиссии, что предоставляет аллергологу-иммунологу дополнительную объективную информацию о состоянии пациента.

Анализ спонтанной активации базофилов также полезен при динамическом наблюдении за пациентами, находящимися на лечебной диете. Нормализация уровня спонтанной активации базофилов на фоне элиминационной диеты у детей первого года жизни с аллергией к белкам коровьего молока может служить одним из предикторов формирования пищевой толерантности [120]

наряду с отсутствием выявления сенсibilизации к аллергену коровьего молока при повторном тестировании методом проточной цитометрии.

## 15.2. Индуцированная anti-IgE активация базофилов

Аналогично результатам оценки спонтанной активации, анализ уровня активации базофилов на anti-IgE антитела также имеет значение в комплексной оценке состояния пациента.

Как правило, у здоровых лиц этот показатель выше, чем у пациентов с отягощенным аллергоанамнезом. Показано [119], что активация базофилов поликлональными анти-IgE антителами у условно здоровых детей была выше, чем у пациентов с атопическим дерматитом ( $79,1 \pm 8,4\%$  против  $29,1 \pm 4,1\%$ ,  $p < 0,05$ ).

Аналогичные данные представлены [121] для взрослых пациентов, проходивших обследование в связи с непереносимостью йодсодержащих веществ и препаратов для местной анестезии. Количество активированных базофилов в ответ на anti-IgE антитела у пациентов составило  $56,4 \pm 22,2\%$  (10-92%) и  $51,3 \pm 23,4\%$  (12-92%) соответственно, у доноров этот показатель был значительно выше и менее вариабелен -  $81,4 \pm 4,4\%$  (63-85%).

Помимо связи сниженной активации базофилов на anti-IgE антитела с тяжестью состояния пациента, существует проблема «нореспондеров», которая обсуждалась выше. Причинами снижения активации клеток на стимул являются проведение исследования в рефрактерный период в случае гиперактивации базофилов *in vivo*, снижение реактивности клеток на фоне приема глюкокортикостероидов или других препаратов, обладающим супрессивным действием [107], индивидуальные особенности нарушения проведения сигнала от комплекса FcεRI-IgE с участием тирозинкиназы *Syk* [122], модулирование активности эффекторных клеток через ингибирующий рецептор CD300a [123], в том числе при остром воспалении аллергической и инфекционной природы.

Как уже говорилось, у «нореспондеров» невозможна корректная интерпретация отрицательных результатов в тесте с аллергеном, что снижает чувствительность метода. Как правило, после отмены супрессивной терапии, ограничении аллергенной нагрузки и купирования воспаления у пациентов восстанавливается нормальная активность базофилов в пробе с позитивным контролем и, соответственно, снижается вероятность получения ложноотрицательных результатов в пробах с аллергенами.

### **15.3. Индуцированная аллергенами активация базофилов**

При проведении пациентам теста активации базофилов главным результатом является оценка наличия или отсутствия сенсibilизации к тем аллергенам – пищевым, эпидермальным, бытовым, пыльцевым, лекарственным и т.д., – реакцию на которые предполагает, исходя из анамнеза, врач иммунолог-аллерголог.

Высокая эффективность теста активации базофилов, как продемонстрировано выше в главе, посвященной использованию этого метода в клинической практике, показана для широкого спектра аллергенов. В дальнейшем диагноз лечащим врачом ставится на основании анамнеза, клинических данных, физикального осмотра, кожных проб и данных лабораторных исследований. Лабораторное подтверждение реакции на предполагаемый аллерген служит более весомым основанием для назначения элиминационной диеты или, при возможности, аллерген-специфической иммунотерапии.

#### **15.4. Уровень FSlowSSlowCD3<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup> клеток, Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа**

При проведении теста активации базофилов для оценки сенсibilизации к разнообразным аллергенам с помощью набора Allergenicity kit (BECKMAN COULTER) дополнительно возможно оценить содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CRTN2 (CD294).

Помимо разного профиля цитокиновой продукции различные субпопуляции Т-лимфоцитов экспрессируют на поверхности ряд молекул, таких как цитокиновые и хемокиновые рецепторы, а также молекулы адгезии [124]. Они играют важную роль в дифференцировке, тканеспецифичном рекрутинге и выполнении эффекторных функций различных субпопуляций клеток. Известно, что хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5 относительно селективно экспрессируются на Т-лимфоцитах 1-го типа, в то время как CCR3, CCR4 и CCR8 и новая молекула CRTN2 являются маркерами Т-клеток 2-го типа иммунного ответа.

CD294 (CRTN2) (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T-helper cells 2) - молекула из семейства рецепторов хемоаттрактантов.

В периферической крови здоровых лиц популяция Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа невелика и составляет не более 1,5% от лимфоцитов [125,126]. Увеличение популяции Т-клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup> было описано при различных заболеваниях, имеющих аллергическую природу или аутоиммунный компонент в патогенезе. Повышенное количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа выявлено при рассеянном склерозе, спонтанной крапивнице [127], атопическом дерматите и эозинофильно-воспалительных заболеваниях кишечника [128], а также в 1 триместре беременности [125]. В случае аллергического воспаления увеличение этой популяции Т-лимфоцитов происходит в результате контакта с аллерген-сенсibilизированной дендритной клеткой. Т-лимфоциты с экспрессией CD294 имеют фенотип антиген-активированных Т-лимфоцитов эффекторных/памяти

CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [82] и характеризуются определенным профилем внутриклеточных цитокинов (синтез IL4, IL5, IL13 и отсутствие синтеза IFN $\gamma$ ) [129]. Интерлейкин 4 направляет иммунный ответ в сторону 2-го типа с участием активатора транскрипции STAT6 [130]. Показано [131], что Т-лимфоциты, экспрессирующие CD294, могут быть как Т-хелперами, так и (реже) Т-цитотоксическими, продуцирующими интерлейкин 4. Они индуцируют синтез IgE плазмочитами [127,130], а также влияют на рост, дифференцировку, миграцию и активацию тучных клеток, базофилов и эозинофилов [81, 132].

Функции клеток, экспрессирующих CD294, обусловлены тем, что эта молекула является одним из двух рецепторов для простагландина D2 [81], который синтезируется, в основном, активированными тучными и антигенпрезентирующими клетками. Через рецептор DP, экспрессирующийся на большинстве Т-лимфоцитов, простагландин D2 способствует угнетению миграции эозинофилов, фибробластов и дендритных клеток, а также снижению активации эозинофилов. Через рецептор CRTN2, экспрессирующийся на эозинофилах, базофилах, минорных популяциях Т-лимфоцитов, простагландин D2 усиливает миграцию и активацию эозинофилов, тучных клеток и базофилов, а также Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа.

Высокий уровень в периферической крови Т-лимфоцитов с экспрессией CD294 у пациентов свидетельствует о поляризации иммунного ответа в сторону 2-го (гуморального) типа в противовес клеточному 1-му типу. Ранее гуморальный тип ответа рассматривался как защитный при гельминтозах, а также был характерен при индукции аллергического воспаления. Согласно современной точке зрения [133] дополнительно в сферу компетенции 2-го типа иммунного ответа входит контроль хронических воспалительных заболеваний, метаболического гомеостаза, репарации и фиброзирования тканей и др.

Выявлено [131], что у пациентов, обследованных по поводу жалоб на непереносимость лекарственных средств, выраженное увеличение (более 3,6% от лимфоцитов) популяции CD3<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup> Т-лимфоцитов происходило за счет



роста субпопуляции  $CD3^+CD8^+CD294^+$  клеток – Т-цитотоксических лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа.

Значительное повышение Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа сопровождалось выраженным увеличением спонтанной продукции интерлейкина 4 ( $7,4 \pm 2,5$  пкг/мл, референтный интервал 0-2 пкг/мл), что предполагает возможность синтеза цитокинов 2-го типа иммунного ответа как Т-хелперами, так и Т-цитотоксическими лимфоцитами.

В нашем исследовании [131] пациенты с повышенным (1,5-3,6%) и крайне высоким (более 3,6% от лимфоцитов) содержанием  $F_{Slow}S_{Slow}CD3^+CD294^+$  лимфоцитов различались по клиническим проявлениям аллергической реакции. В группе обследованных пациентов с лекарственной гиперчувствительностью, у которых в периферической крови клетки  $F_{Slow}S_{Slow}CD3^+CD294^+$  составили менее 3,6%, аллергическая патология, в основном, сопровождалась неадекватным ответом слизистых. У пациентов с лекарственной аллергией, у которых было выявлено более 3,6%  $F_{Slow}S_{Slow}CD3^+CD294^+$  клеток, чаще отмечены проявления различных дерматитов (атопический, розацеа, нейродермит), которые сопровождались значительными высыпаниями, длительно текущим зудом и плохо поддавались стандартной терапии.

Отмечена связь между содержанием в периферии Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа и уровнем общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови. Согласно нашим данным [117] относительное содержание клеток  $F_{Slow}S_{Slow}CD3^+CD294^+$  в периферической крови пациентов с рассеянным склерозом и жалобами на лекарственную непереносимость было выше в группе с уровнем общего иммуноглобулина Е в сыворотке 70 Кг/л и более по сравнению с группой пациентов с низким уровнем IgE ( $1,46 \pm 0,3\%$  и  $1,00 \pm 0,2\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ).

Показано, что у всех пациентов с высоким уровнем общего IgE отмечалось увеличение индекса активации базофилов хотя бы на один из исследованных препаратов (аванекс, копаксон, ребиф). У 20% пациентов другой группы

индексы активации базофилов на все исследованные препараты были в пределах референтных значений.

Анализ количества Т-клеток, экспрессирующих CD294, и содержания иммуноглобулина Е в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом выявил взаимосвязь – у больных с высоким ( $>70$  Кг/л) уровнем иммуноглобулина Е чаще определяется повышенное ( $>1,0$  %) число FSlowSSlowCD3<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup> клеток ( $p=0,018$ ), что подтверждает их способность индуцировать синтез иммуноглобулина Е плазматическими клетками. Аналогичная взаимосвязь относительного количества Т-клеток, экспрессирующих CD294, и уровня общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови выявлена [69] и у детей с хронической крапивницей, а также у пациентов с атопическим дерматитом.

Согласно данным иммунологов-аллергологов ВЦЭРМ около 70% пациентов с выраженным повышением в периферической крови Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа имели в анамнезе отеки Квинке, у 3-ех человек диагностирован синдром Лайелла.

В результате комплексного подхода к диагностике с использованием оценки спонтанной, индуцированной anti-IgE антителами и аллергенами активации базофилов, а также относительного содержания Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа, аллерголог-иммунолог имеет возможность персонифицированного подхода к назначению адекватной терапии с учетом особенностей иммунного ответа пациента (табл. 4).

## Комплексная оценка результатов теста активации базофилов

Результат теста	Интерпретация данных
Индекс активации базофилов на исследуемый аллерген превышает пороговое значение	Подтверждает наличие сенсibilизации к данному аллергену
Высокая спонтанная активация базофилов	Свидетельствует о выраженности аллергического воспаления
Низкая активация на анти-IgE антитела (позитивный контроль)	<p>Может наблюдаться при:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- приеме системных или местных глюкокортикостероидных препаратов</li> <li>- выраженном аллергическом или инфекционном воспалении у пациентов с отягощенным аллергоанамнезом</li> <li>- генетических особенностях проведения сигнала с участием тирозинкиназы <i>Syk</i></li> </ul>
Высокое относительное количество Т-клеток 2-го типа	<p>Подтверждает доминирующий 2-ой тип иммунного ответа</p> <p>Характеризует интенсивность немедленных и замедленных реакций гиперчувствительности</p> <p>Часто наблюдается при ангиоотеках и выраженных кожных проявлениях гиперчувствительности</p>

## 16. Выявление сенсibilизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным препаратам

Использование контрастных веществ необходимо для лучшей визуализации при проведении исследований различными методами – магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии, урографии, коронарографии. Для многих из них необходимо использование йодсодержащих рентгеноконтрастных веществ (йРКВ), которые являются химическими модификациями 2,4,6-трийодированного бензольного кольца. В результате введения йРКВ у ряда пациентов развиваются нежелательные побочные эффекты различной природы и тяжести. Согласно данным Kim M.H. с соавт., 2012 [134], частота встречаемости реакций немедленной гиперчувствительности на введение неионных йодсодержащих

рентгеноконтрастных веществ составила 2,1%, при этом в 0,01% встречались тяжелые реакции. В Российской популяции [135] частота выявления реакций на йодсодержащие препараты была схожей и составила 2%.

В настоящее время превалирует мнение [136], что многие побочные реакции на йРКВ являются аллергическими и могут протекать в виде разной степени анафилаксии либо отсроченных кожных реакций.

Многим пациентам требуется неоднократное введение йРКВ, например, для мониторинга терапии либо при повторных оперативных вмешательствах. Следовательно, необходимо подтвердить или опровергнуть наличие сенсibilизации к конкретному препарату, а также подобрать безопасное йРКВ. Для диагностики аллергических реакций на лекарственные препараты разрешены [1] кожные тесты, оценка уровня специфических иммуноглобулинов E, провокационное тестирование. Согласно Tasker F, [137,138], положительные кожные пробы на йРКВ были не более, чем у половины пациентов с документированными реакциями *in vivo*. Несмотря на то, что провокационные пробы могут достаточно надежно предсказать возможность возникновения аллергических реакций на препараты, они редко используются и в России, и в мире, как выше уже было сказано, из-за высокого риска развития анафилактических реакций [9] при проведении тестирования. Диагностика аллергии на йРКВ с помощью определения специфических иммуноглобулинов E к основному действующему веществу затруднительна ввиду того, что лекарственная аллергия не всегда протекает по IgE-зависимому 1 типу реакций гиперчувствительности [13], а также данные коммерческие наборы в России не зарегистрированы.

Целью нашей работы было оценить возможности теста активации базофилов методом проточной цитометрии для подтверждения сенсibilизации к неионным йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам, а также для выбора безопасного йРКВ у пациентов с отягощенным анамнезом.

В исследование были включены 184 пациента (52 мужчины и 132 женщины, от 29 до 81 года,  $62,9 \pm 12,6$ ) и 32 здоровых волонтера (12 мужчин и 20

женщин, от 24 до 76 лет,  $56,3 \pm 14,6$ ). Все пациенты были разделены на 4 группы по анамнестическим данным. 1 группа - 79 человек с местной реакцией на раствор йода или биологически активные добавки с йодом. У этих пациентов была диагностирована, в основном, легкая степень тяжести реакций (в 95% случаев) с симптомами зуда, покраснения, ожога кожи, локализованными уртикарными высыпаниями [139]. 2 группа - 59 человек с системными реакциями на введение йодсодержащих йРКВ (омнипак, ультравист, оптирей, йопамиро, урографин). У этих пациентов была диагностирована, в основном, средняя степень тяжести реакций (в 76% случаев) с симптомами зуда, распирания тканей, генерализованной крапивницей, отеками, в том числе гортани, бронхоспазмом [139]. У 8 пациентов (3 группа) реакция на йРКВ была расценена как токсическая с выраженной слабостью, рвотой, тошнотой, в 1 случае было нарушение ритма во время операции на сердце, у 1 пациента была токсикодермия. Срок давности возникновения реакций на йодсодержащие препараты составил от 2 недель до 40 лет. 38 пациентов, составивших 4 группу, предъявляли жалобы на непереносимость лекарственных средств, не содержащих йод. Все пациенты проходили обследование в связи с предстоящим проведением исследований с использованием йодсодержащих РКВ.

Здоровые волонтеры не имели аллергических реакций в анамнезе, онкологических заболеваний, в момент исследования отсутствовали острые и не было обострения хронических заболеваний.

Тест активации базофилов проводили методом проточной цитометрии (FC500, Beckman Coulter) с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, BECKMAN-COULTER) согласно инструкции производителя. Постановку теста осуществляли в течение не более 2 часов от момента забора крови в вакутейнеры с гепарином лития. Идентификацию базофилов осуществляли в многоцветном протоколе с использованием коктейля моноклональных антител ( $SS^{low}CD3^{-}CD294^{+}CD203c^{+}$ ), а их активацию оценивали на основании возрастания экспрессии CD203c после стимуляции *in vitro*. Исследовали 500 базофилов.

Для каждого пациента в тесте оценивали несколько параметров. Во-первых, спонтанную активацию базофилов в пробе с буферным раствором, а именно долю клеток с высокой экспрессией CD203c от общего количества базофилов  $SSlowCD3^-CD294^+CD203c^+$ . Во-вторых, для контроля способности базофилов к активации использовали стимуляцию клеток анти-IgE антителами с определением доли клеток с высокой экспрессией CD203c (положительный контроль). В-третьих, оценивали индекс активации базофилов на йРКВ - отношение количества активированных базофилов  $SSlowCD3^-CD294^+CD203c^{+++}$  в пробе с препаратом к данному параметру в пробе с буферным раствором. В качестве стимулов в тесте использовали 3 препарата – ультравист 300 (163 исследования, действующее вещество йопромид), омнипак 300 (112 исследований, действующее вещество йогексол), оптирей 300 (94 исследования, действующее вещество йоверсол). У 43 пациентов в тесте активации базофилов были исследованы одновременно 2 препарата, а у 19 – все 3. Тест на йРКВ считали положительным при индексе активации базофилов более 1,1. В-четвертых, измеряли относительное количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа  $FSlowSSlowCD3^+CD294^+$  от общего пула лимфоцитов  $FSlowSSlow$ .

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Microsoft Office Excel 2016», пакета Statistica 12.0 («StatSoft», США). Данные представлены в виде средних значений (M) с расчетом ошибки среднего (m). Сравнение выборок с определением достоверности различий проводили с использованием t-критерия Стьюдента при нормальном распределении, а также с использованием критерия Манна-Уитни при отклонении распределения от нормального. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . При проведении частотного анализа использовали точный критерий Фишера ( $\phi$ ). Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Чувствительность и специфичность метода оценивали по стандартной методике ROC-анализа.

В группе здоровых волонтеров не было отмечено активации базофилов на йРКВ *in vitro* (табл.5).

В целом у всех обследованных пациентов частота выявления сенсibilизация в тесте активации базофилов как минимум к 1 препарату составила 21%. Достаточно часто у пациентов была выявлена сенсibilизация к одному из препаратов при отсутствии реакции на аналогичное другое йРКВ. Частота выявления сенсibilизации на изученные препараты была схожей – 12% (19 из 163) на ультравист, 13% (15 из 112) на омнипак и 14% (13 из 94) на оптирей.

В исследовании выявлены значимые различия частоты сенсibilизация *in vitro* к йРКВ в группах пациентов, выделенных на основании интегральных анамнестических данных (табл. 5).

Таблица 5

Частота выявления сенсibilизация *in vitro* к йРКВ  
в различных группах обследованных лиц

Группа обследованных	Частота выявления сенсibilизации к йРКВ N (%)
1 группа, пациенты с местными аллергическими реакциями на йодсодержащие препараты, n=79	18 (22,7) *, **
2 группа, пациенты с системными аллергическими реакциями на йРКВ, n=59	26 (44,0) *, ***
3 группа, пациенты с симптомами лекарственной аллергии, n=38	2 (5,2) **, ***
4 группа, пациенты с токсическими реакциями на йРКВ, n=8	0
5 группа, здоровые волонтеры, n=32	0

\* $p < 0,01$   $\phi^*_{эмп} = 2,66$  (критерий Фишера) между 1 и 2 группами

\*\* $p < 0,01$   $\phi^*_{эмп} = 2,69$  (критерий Фишера) между 1 и 3 группами

\*\*\* $p < 0,01$   $\phi^*_{эмп} = 4,75$  (критерий Фишера) между 2 и 3 группами

У пациентов с местными аллергическими реакциями на йодсодержащие препараты частота выявления сенсibilизации в тесте *in vitro* на йРКВ была в два раза ниже, чем в группе больных с системными аллергическими реакциями при использовании рентгеноконтрастных веществ (табл. 5). У здоровых

волонтеров и пациентов с токсическими реакциями на введение йРКВ тест активации базофилов всегда был отрицательным. У пациентов с лекарственной аллергией без указания на клинические симптомы аллергии при приеме йодсодержащих препаратов сенсibilизация *in vitro* на йРКВ встречалась крайне редко, что значимо отличалось от показателей 1 и 2 обследованных групп (табл. 5).

Среди 59 пациентов с системными аллергическими реакциями на йРКВ у 21 индивидуума был известен и исследован в тесте активации базофилов йодсодержащий рентгеноконтрастный препарат, при введении которого они испытали симптомы средней тяжести аллергической реакции. У оставшихся 37 человек реакция *in vivo* была на урографин (20 человек), либо они не знали, какой именно препарат им вводили для визуализации, либо знали, но не планировали подтверждать сенсibilизацию лабораторно и выбирали другое (другие) йРКВ для подбора препарата с целью последующего его применения.

У 18 из 21 пациентов (86 %) в тесте *in vitro* была подтверждена сенсibilизация к известному йРКВ. Время между аллергической реакцией и проведением тестирования составило от 2 недель до 2 лет.

После осуществления предварительного тестирования препаратов *in vitro* 124 пациентам были проведены вмешательства (104 человека подверглись коронарографии для выполнения аорто-коронарного шунтирования или стентирования, 20 пациентов осуществляли компьютерную томографию с контрастом) с использованием йРКВ, на которые не было выявлено сенсibilизации. Оставшиеся 60 человек либо отказались от проведения исследований с контрастированием (n=12) либо на данный момент находятся в листе ожидания.

Среди 124 пациентов, согласно катamnестическим данным, не было выявлено тяжелых и средней тяжести аллергических реакций на введение рекомендованных йРКВ после тестирования *in vitro*.



У 3 человек (2%) с системными проявлениями аллергии в анамнезе отмечены неблагоприятные реакции легкой степени при введении йРКВ, к которым не было выявлено сенсibilизации в тесте активации базофилов.

В нашем исследовании специфичность теста активации базофилов с рентгеноконтрастными веществами составила 100% при чувствительности 94,1%.

Спонтанная активация базофилов у здоровых волонтеров была значительно ниже, чем во всех группах обследованных пациентов (табл. 6).

Средние значения индуцированной анти-IgE антителами активации базофилов у пациентов и здоровых волонтеров значительно не различались (табл.6). При проведении частотного анализа выявлено, что у пациентов чаще наблюдались низкие значения этого показателя. Так, у обследованных больных в 37 случаях из 184 (20,1%) количество активированных анти-IgE антителами базофилов было ниже 30%, в то время как в группе сравнения таких было 2 человека из 32 (6,3%) ( $p < 0,05$   $\varphi^*_{эмп} = 2,21$  по критерию Фишера).

При анализе данных выявлено, что относительное количество Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа было значительно выше во всех группах пациентов с аллергическими реакциями по сравнению со здоровыми волонтерами (табл. 6).

В ходе проведенного исследования не было выявлено превалирования частоты встречаемости сенсibilизации *in vitro* ни к одному из тестируемых йодсодержащих рентгеноконтрастных препаратов, реакция обусловлена индивидуальными особенностями организма пациента.

Таблица 6

Спонтанная, индуцированная анти-IgE антителами активация базофилов и количество Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа в различных группах пациентов и здоровых волонтеров

Группы пациентов	Спонтанная активация базофилов, % M ± m	Индуцированная анти-IgE антителами активация базофилов, % M ± m	Относительное количество Т-лимфоцитов 2 типа иммунного ответа, % M ± m
Здоровые волонтеры, n=32	1,5±0,1	64,3,8±3,4	0,9±0,1
1 группа, пациенты с местными аллергическими реакциями на йодсодержащие препараты, n=79	2,8±0,2 *	57,0±3,1	2,0±0,2 *
2 группа, пациенты с системными аллергическими реакциями на йРКВ, n=59	3,0±0,3 *	55,7±3,0	1,9±0,2 *
3 группа, пациенты с симптомами лекарственной аллергии, n=38	2,4±0,3 *	52,4±5,1	2,0±0,2 *
4 группа, пациенты с токсическими реакциями на йРКВ, n=8	1,9±0,5	64,8±6,5	2,1±0,5 *

\*p <0,01 по различным показателям между здоровыми волонтерами и группами пациентов

Показаны высокие показатели специфичности (100%) и чувствительности (94,1%) теста активации базофилов, что обуславливает корректную лабораторную диагностику выявления сенсibilизации к препаратам данной группы, а также способствует подбору препаратов лицам с отягощенным аллергологическим анамнезом.

У пациентов с аллергическими реакциями в анамнезе по сравнению со здоровыми волонтерами выше спонтанная активация базофилов, что свидетельствует о постоянном напряжении клеток-эффекторов аллергического воспаления, вовлеченных в измененный ответ иммунной системы на внешние воздействия.

У пациентов по сравнению со здоровыми волонтерами в нашем исследовании чаще наблюдалась низкая степень активации базофилов на анти-IgE антитела. Это может быть обусловлено не только приемом иммуносупрессивных препаратов (например, глюкокортикостероидов), но и активностью аллергического воспаления по первому IgE-зависимому типу гиперчувствительности по Gell и Coombs.

Дополнительным неблагоприятным лабораторным признаком является повышенное количество в периферической крови Т-клеток второго типа иммунного ответа FSlowSSlowCD3<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup>, для которых показана роль в переключении иммунного ответа на гуморальный с преобладанием аллергического типа воспаления.

## 17. Клинические примеры

1. Пациент Л., женщина, 42 лет, обратилась с жалобами на высыпания на коже, отек в области горла, непереносимость лекарственных средств, похудание на 5 кг за последний год.

В течение десяти лет периодически жалобы на рецидивирующую крапивницу, предварительный диагноз «глистная инвазия», пролечена антигельминтными препаратами неоднократно без особого эффекта. 3 года назад принимала Мовалис, после чего отметила крапивницу и отек Квинке, проходила лечение у аллерголога. После курса лечения сохранялись аллергические реакции на лекарственные препараты, отмечалось повышение общего иммуноглобулина Е до 4000 МЕ/мл.

Объективно. Вес, кг: 39.0, Рост, см: 155. Кожные покровы бледные, суховатые, тургор снижен. Печень и селезенка не пальпируются.

При лабораторном обследовании в ноябре 2020 выявлено IgA 3.66 г/л (0.90 - 4.50), IgM 1.76 г/л (0.60 - 2.50), IgG 17.93 г/л (8.00 - 18.00), повышение общего иммуноглобулина Е выше 2000 МЕ/мл, отсутствие специфических IgE к молоку, яйцу, пшенице, рыбе. В тесте активации базофилов выявлена

сенсibilизация к пшенице - индекс активации базофилов на пшеницу 1,67 (0,0 – 1,1), что обусловило направление дальнейшей диагностики. При обследовании выявлены антитела к тканевой трансглутаминазе Ig A 36 U/ml (при норме менее 20 U/ml), антитела к тканевой трансглутаминазе IgG 36 U/ml (при норме менее 20 U/ml), признаки железодефицитной анемии легкой степени.

В результате проведения ФГДС+постбульбарной биопсии получены результаты «Гистологические изменения в пользу целиакии, деструктивный тип (IIIa по классификации Marsh)». При морфометрии 1-го образца определено, что толщина слизистой залуковичного отдела двенадцатиперстной кишки снижена за счет укорочения ворсинок, на большем протяжении уплощение и очаговая атрофия ворсин, очаговая гиперплазия и реактивные дисрегенераторные изменения крипт, неравномерное сниженное количество бокаловидных клеток и увеличение количества интраэпителиальных лейкоцитов. В строме умеренно-выраженная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация с примесью эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов. При иммуногистохимическом исследовании количество межэпителиальных лимфоцитов составило от 28 - 30 до 45 на 100 энтероцитов. При морфометрии 2-го образца определено, что слизистая луковицы двенадцатиперстной кишки с признаками субтотальной атрофии, укорочением и уплощением ворсинок, неравномерным очаговым снижением количества бокаловидных клеток, в строме выраженная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация, умеренная очаговая инфильтрация нейтрофильными и эозинофильными лейкоцитами, очаговая гиперплазия бруннеровых желез, реактивные и дисрегенераторные изменения крипт.

МР-данных за объемные патологические образования в исследуемых органах не выявлено. МР-картина диффузных изменений паренхимы поджелудочной железы (за счет стеатоза); косвенных признаков дискинезии желчевыводящих путей.

Диагноз: Целиакия, синдром мальабсорбции средней степени тяжести.  
Стеатоз печени. Хроническая анемия легкой степени тяжести.

Рекомендации: Аглютеновая диета, наблюдение у гастроэнтеролога.

2. Пациент Н., мужчина, 16 лет, обратился к аллергологу с жалобами на периодически возникающие боли в животе, поносы, заложенность носа после употребления в пищу яблок, моркови, киви. Впервые эти симптомы появились около двух лет назад с зуда в полости рта и легких диспептических расстройств.

Из анамнеза известно, что у бабушки по материнской линии аллергия (?), чихание и слезотечение в весенние месяцы.

Юноша в последнее время часто употребляет в пищу свежевыжатые соки, практически ежедневно выпивая около 300 мл морковного сока, сока из яблок и сельдерея.

Заподозрена перекрестная аллергия к косточковым и моркови, наиболее вероятный спектр аллергии в связи с особенностями рациона и выявленной анамнестически гиперчувствительностью к пыльце деревьев (ольха, береза?).

При лабораторном обследовании незначительно повышен общий иммуноглобулин Е, специфические IgE к березе 3-4 класс, специфические IgE к моркови, сельдерею, яблоку, киви менее 0,1 МЕ/мл. В тесте активации базофилов выявлены высокие индексы активации к березе (26,3), ольхе (18,1), яблоку (2,4), моркови (1,9) при норме 0,0 – 1,1.

Диагноз. Поллиноз, аллергия к пыльце деревьев, ринит, перекрестная пищевая аллергия.

Рекомендации: гипоаллергенная диета с исключением перекрестных с березой пищевых аллергенов, проведение АСИТ с аллергеном деревьев.

Исключение из рациона косточковых на некоторое время дали положительный эффект, но полностью рекомендации не соблюдались.

Через год в мае во время сезона пыления березы возникла клиническая картина выраженного риноконъюнктивита, бронхообструктивного синдрома,

потребовавшего госпитализации и экстренного введения глюкокортикостероидов.

3. Пациент П., женщина 77 лет. Предъявляла жалобы на лекарственную непереносимость (в анамнезе клиническая смерть во время анестезии неизвестным препаратом при оперативном лечении, высыпания на коже по типу крапивницы, ангиоотеки при приеме лекарственных средств - антибиотики, гипотензивные средства).

Пациент с тяжелым коморбидным фоном (синдром раздраженного кишечника с запорами, гипертоническая болезнь II стадии, лабильная артериальная гипертензия, атеросклероз БЦА без гемодинамически значимого стенозирования). Консультирована урологом по поводу учащенного мочеиспускания, в т.ч. в ночные часы, бактериурии, эритроцитурии и лейкоцитурии, диагноз - камень средней трети левого мочеточника, цистит, обструктивный пиелонефрит слева.

При стационарном лечении в декабре 2019 г. на урологическом отделении ВЦЭРМ подобрана антибиотикотерапия, не вызвавшая активации базофилов *in vitro* – Цефазолин (индекс активации базофилов 1,09,  $N < 1,1$ ), Цефтазидим (0,93), Цефтриаксон (1,05), Ципрофлоксацин (1,07). После проведения терапии с удовлетворительной переносимостью препаратов состояние пациентки стабилизировалось, что позволило провести оперативное лечение мочекаменной болезни в январе 2020 г. Длительно персистирующее воспаление урогенитального тракта было купировано. При проведении лабораторного обследования в период лечения в стационаре на фоне воспалительных явлений (лейкоцитоз  $10,49 \times 10^9/\text{л}$ , СОЭ 75 мм/час, С-реактивный белок 34,9 мг/л) было выявлено, что количество активированных базофилов в тесте с позитивным контролем (активация базофилов анти-IgE антителами) постоянно было низким (8-15%,  $N > 16\%$ ). После купирования воспаления при последующих обследованиях в тесте активации базофилов произошла нормализация данного показателя – в ноябре 2020г. 23,8%, в июне 2021г. – 20,5%.

## Заключение

Тест активации базофилов *in vitro* методом проточной цитометрии - доступный и перспективный метод определения сенсibilизации. Он рекомендуется для применения в комплексной диагностике пищевой, бытовой, инсектной, эпидермальной аллергии, а также в качестве теста выбора для подтверждения лекарственной гиперчувствительности у пациентов с отягощенным анамнезом. Его использование полезно для определения формирования пищевой толерантности на фоне элиминационной диеты. Показана эффективность оценки проводимой аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ) и лечения анти-IgE препаратами с использованием теста активации базофилов.

Внедрению теста в широкую лабораторную практику будет способствовать, помимо доказанной высокой клинической значимости теста в оценке сенсibilизации к огромному большинству аллергенов, стандартизация метода, а именно использование стандартных аллергенов, унифицированных протоколов цитометрического анализа, корректных cut-off для оценки позитивности теста.

При этом надо принимать во внимание, что функциональные тесты с трудом поддаются полной стандартизации и избежать элементов субъективизма при проведении и интерпретации результатов теста полностью невозможно.

При современном уровне оснащения большинства иммунологических лабораторий проточными цитометрами специалистам лабораторной диагностики следует обратить внимание на высокие диагностические возможности теста активации базофилов.

Более широкому его использованию будет способствовать накопленный собственный опыт применения этого нового теста клиницистами-аллергологами, от которых можно ожидать запрос на введение в арсенал лаборатории этого современного точного метода диагностики сенсibilизации.

Надеемся, что накопление определенного багажа знаний относительно теста активации базофилов в скором времени приведет к появлению клинических рекомендаций по использованию теста и, таким образом, он станет таким же рутинным методом, каким в настоящее время, спустя около 50 лет после появления, является определение специфических IgE в сыворотке крови.



## Список литературы

1. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению лекарственной аллергии // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. Москва:ГЭОТАР-Медиа, 2019, С.190-213.
2. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 May;113(5):805-19; quiz 820. doi: 10.1016/j.jaci.2004.03.014.
3. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy.* 2007 Sep;62(9):976-90. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01393.x.
4. Biedermann T, Winther L, Till SJ, Panzner P, Knulst A, Valovirta E. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy.* 2019 Jul;74(7):1237-1248. doi: 10.1111/all.13758.
5. Stemeseder T, Schweidler B, Doppler P, Klinglmayr E, Moser S, Lueftenegger L, Himly M, Lang R, Zumbach J, Oostingh GJ, Hawranek T, Bathke AC, Gadermaier G. Exposure to Indoor Allergens in Different Residential Settings and Its Influence on IgE Sensitization in a Geographically Confined Austrian Cohort. *PLoS One.* 2017 Jan 3;12(1):e0168686. doi: 10.1371/journal.pone.0168686.
6. Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е., Аак О.В., Климко Н.Н. Аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных бронхиальной астмой; результаты проспективного исследования. *Терапевтический архив.* 2017. Т. 89. № 8. С. 13-16.
7. Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, Khan DA, Lang DM, Park HS, Pichler W, Sanchez-Borges M, Shiohara T, Thong BY. International Consensus on drug allergy. *Allergy.* 2014 Apr;69(4):420-37. doi: 10.1111/all.12350.
8. Федоскова Т.Г., Лусс Л.В. Кожные проявления инсектной аллергии, принципы медикаментозной терапии и профилактики. *Российский аллергологический журнал.* 2014. № 3. С. 37-46.

9. Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, Brockow K, Pichler WJ, Demoly P; European Network for Drug Allergy (ENDA); EAACI interest group on drug hypersensitivity. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*. 2003 Sep;58(9):854-63. doi: 10.1034/j.1398-9995.2003.00279.x.

10. Datema MR, Zuidmeer-Jongejan L, Asero R, Barreales L, Belohlavkova S, de Blay F, Bures P, Clausen M, Dubakiene R, Gislason D, Jedrzejczak-Czechowicz M, Kowalski ML, Knulst AC, Kralimarkova T, Le TM, Lovegrove A, Marsh J, Papadopoulos NG, Popov T, Del Prado N, Purohit A, Reese G, Reig I, Seneviratne SL, Sinaniotis A, Versteeg SA, Vieths S, Zwinderman AH, Mills C, Lidholm J, Hoffmann-Sommergruber K, Fernández-Rivas M, Ballmer-Weber B, van Ree R. Hazelnut allergy across Europe dissected molecularly: A EuroPrevall outpatient clinic survey. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug;136(2):382-91. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1949.

11. Федеральные клинические рекомендации по диагностике аллергических заболеваний // Клинические рекомендации. Аллергология и клиническая иммунология / Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. Москва:ГЭОТАР-Медиа, 2019, С.170-189.

12. Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, Caraballo L, Villa E, Ebisawa M, Passalacqua G, Savi E, Ebo D, Gómez RM, Luengo Sánchez O, Oppenheimer JJ, Jensen-Jarolim E, Fischer DA, Haahtela T, Antila M, Bousquet JJ, Cardona V, Chiang WC, Demoly PM, DuBuske LM, Ferrer Puga M, Gerth van Wijk R, González Díaz SN, Gonzalez-Estrada A, Jares E, Kalpaklioglu AF, Kase Tanno L, Kowalski ML, Ledford DK, Monge Ortega OP, Morais Almeida M, Pfaar O, Poulsen LK, Pawankar R, Renz HE, Romano AG, Rosário Filho NA, Rosenwasser L, Sánchez Borges MA, Scala E, Senna GE, Sisul JC, Tang MLK, Thong BY, Valenta R, Wood RA, Zuberbier T. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J*. 2020 Feb 25;13(2):100080. doi: 10.1016/j.waojou.2019.100080.

13. Brockow K, Garvey LH, Aberer W, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, Bilo MB, Bircher A, Blanca M, Bonadonna B, Campi P, Castro E, Cernadas JR, Chiriac AM, Demoly P, Grosber M, Gooi J, Lombardo C, Mertes PM, Mosbech H, Nasser S, Pagani M, Ring J, Romano A, Scherer K, Schnyder B, Testi S, Torres M, Trautmann A, Terreehorst I; ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group. Skin test concentrations for systemically administered drugs -- an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*. 2013 Jun;68(6):702-12. doi: 10.1111/all.12142.
14. Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, Bienvenu J. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy*. 2003 Feb;33(2):259-65. doi: 10.1046/j.1365-2222.2003.01594.x.
15. Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy*. 2005 Jun 30;3:9. doi: 10.1186/1476-7961-3-9.
16. Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, De Gironcoli M, Solero P, Tridente G, Bellavite P. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy*. 2008 Oct 16;6:12. doi: 10.1186/1476-7961-6-12.
17. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008 Jul;74(4):201-10. doi: 10.1002/cyto.b.20419.
18. Coombs PRGP. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell RR, editor. *Clinical Aspects of Immunology*. Oxford: Oxford Univ Pr; 1968: 575–596.
19. Pichler WJ. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002 Aug;2(4):301-5. doi: 10.1097/00130832-200208000-00003.

20. Бычкова Н.В. Активация базофилов: теоретические аспекты и применение в диагностике аллергических заболеваний. *Медицинская иммунология*. 2021. 23(3):469-482. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-BAT-2174>.
21. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 May;99(5):699-706. doi: 10.1016/s0091-6749(97)70033-2.
22. Arock M, Schneider E, Boissan M, Tricottet V, Dy M. Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J Leukoc Biol*. 2002 Apr;71(4):557-64. PMID: 11927641.
23. Blank U, Falcone FH, Nilsson G. The history of mast cell and basophil research - some lessons learnt from the last century. *Allergy*. 2013 Sep;68(9):1093-101. doi: 10.1111/all.12197.
24. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, Schlette E, Huh YO, Shi Y, Awagu S, Chen W. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 May;132(5):813-9. doi: 10.1043/1543-2165(2008)132[813:ISOBBM]2.0.CO;2.
25. Steiner M, Huber S, Harrer A, Himly M. The Evolution of Human Basophil Biology from Neglect towards Understanding of Their Immune Functions. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8232830. doi: 10.1155/2016/8232830.
26. Karasuyama H, Tsujimura Y, Obata K, Mukai K. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy*. 2010;95:85-97. doi: 10.1159/000315939.
27. Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr Opin Immunol*. 2010 Dec;22(6):814-20. doi: 10.1016/j.coi.2010.10.018.
28. Voehringer D. The role of basophils in helminth infection. *Trends Parasitol*. 2009 Dec;25(12):551-6. doi: 10.1016/j.pt.2009.09.004.

29. Schwartz C, Eberle JU, Voehringer D. Basophils in inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2016 May 5;778:90-5. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.04.049.
30. Boita M, Heffler E, Omedè P, Bellocchia M, Bussolino C, Solidoro P, Giorgis V, Guerrera F, Riva G, Brussino L, Bucca C, Rolla G. Basophil Membrane Expression of Epithelial Cytokine Receptors in Patients with Severe Asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;175(3):171-176. doi: 10.1159/000486314.
31. Schneider E, Thieblemont N, De Moraes ML, Dy M. Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw.* 2010 Sep;21(3):142-53. doi: 10.1684/ecn.2010.0197.
32. Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM, Artis D. Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Oct;132(4):789-801; quiz 788. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.046.
33. Shan M, Carrillo J, Yeste A, Gutzeit C, Segura-Garzón D, Walland AC, Pybus M, Grasset EK, Yeiser JR, Matthews DB, van de Veen W, Comerma L, He B, Boonpiyathad T, Lee H, Blanco J, Osborne LC, Siracusa MC, Akdis M, Artis D, Mehandru S, Sampson HA, Berin MC, Chen K, Cerutti A. Secreted IgD Amplifies Humoral T Helper 2 Cell Responses by Binding Basophils via Galectin-9 and CD44. *Immunity.* 2018 Oct 16;49(4):709-724.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2018.08.013.
34. Nakashima C, Otsuka A, Kabashima K. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. *J Dermatol Sci.* 2018 Jul;91(1):3-8. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.03.007.
35. Wolanczyk-Medrala A, Barg W, Gogolewski G, Panaszek B, Liebhart J, Litwa M, Medrala W. Influence of hyperosmotic conditions on basophil CD203c upregulation in patients with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Ann Agric Environ Med.* 2009;16(2):301-4.
36. Knol EF, Gibbs BF. Basophil stimulation and signaling pathways. *Methods Mol Biol.* 2014;1192:193-203. doi: 10.1007/978-1-4939-1173-8\_15.
37. McNeil B.D., Pundir P., Meeker S., Han L., Undem B.J., Kulka M., Dong X. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug

reactions. *Nature*, 2015, Vol. 12, no. 519(7542), pp. 237-241. doi: 10.1038/nature14022.

38. Wedi B., Gehring M., Kapp A. The pseudoallergen receptor MRGPRX2 on peripheral blood basophils and eosinophils: Expression and function. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 9, pp. 2229-2242. doi: 10.1111/all.14213.

39. He SH, Zhang HY, Zeng XN, Chen D, Yang PC. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Oct;34(10):1270-83. doi: 10.1038/aps.2013.88

40. Rubio A, Vivinus-Nébot M, Bourrier T, Saggio B, Albertini M, Bernard A. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy*. 2011 Jan;66(1):92-100. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02432.x.

41. Soares-Weiser K, Takwoingi Y, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Halken S, Poulsen L, van Ree R, Vlieg-Boerstra BJ, Sheikh A; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014 Jan;69(1):76-86. doi: 10.1111/all.12333.

42. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kouno K, Morita E, Fujisawa T. Antigen-induced expression of CD203c on basophils predicts IgE-mediated wheat allergy. *Allergol Int*. 2009 Jun;58(2):193-9. doi: 10.2332/allergolint.08-OA-0023.

43. Santos AF, Douiri A, Bécares N, Wu SY, Stephens A, Radulovic S, Chan SM, Fox AT, Du Toit G, Turcanu V, Lack G. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Sep;134(3):645-52. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.039.

44. Ocmant A, Mulier S, Hanssens L, Goldman M, Casimir G, Mascart F, Schandené L. Basophil activation tests for the diagnosis of food allergy in children. *Clin Exp Allergy*. 2009 Aug;39(8):1234-45. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03292.x.

45. Heine RG. Gastrointestinal food allergies. *Chem Immunol Allergy*. 2015;101:171-80. doi: 10.1159/000371700.
46. Sturm GJ, Böhm E, Trummer M, Weiglhofer I, Heinemann A, Aberer W. The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study. *Allergy*. 2004 Oct;59(10):1110-7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00400.x.
47. Sturm GJ, Jin C, Kranzelbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, Heinemann A, Vollmann J, Altmann F, Crailsheim K, Focke M, Aberer W. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One*. 2011;6(6):e20842. doi: 10.1371/journal.pone.0020842.
48. Korošec P, Šilar M, Eržen R, Čelesnik N, Bajrović N, Zidarn M, Košnik M. Clinical routine utility of basophil activation testing for diagnosis of hymenoptera-allergic patients with emphasis on individuals with negative venom-specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161(4):363-8. doi: 10.1159/000348500.
49. Ogulur I, Kiykim A, Baris S, Ozen A, Yuce EG, Karakoc-Aydiner E. Basophil activation test for inhalant allergens in pediatric patients with allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2017 Jun;97:197-201. doi: 10.1016/j.ijporl.2017.04.006.
50. Özdemir SK, Güloğlu D, Sin BA, Elhan AH, İkinciogulları A, Mısırlıgil Z. Reliability of basophil activation test using CD203c expression in diagnosis of pollen allergy. *Am J Rhinol Allergy*. 2011 Nov-Dec;25(6):e225-31. doi: 10.2500/ajra.2011.25.3723.
51. Potapińska O, Górska E, Zawadzka-Krajewska A, Kulus M, Wasik M, Demkow U. Przydatność oznaczania antygenu CD203c w ocenie aktywacji bazofilów pod wpływem antygenów pyłków traw i *Dermatophagoides pteronyssinus*. Badania wstępne [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):138-44. Polish. PMID: 19468979.

52. Gómez E, Campo P, Rondón C, Barrionuevo E, Blanca-López N, Torres MJ, Herrera R, Galindo L, Mayorga C, Blanca M. Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;132(4):975-6.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.016.
53. Ocmant A, Peignois Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schandené L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods*. 2007 Mar 30;320(1-2):40-8. doi: 10.1016/j.jim.2006.12.002.
54. Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Бычкова Н.В., Филиппова Л.В., Аак О.В., Пятакова А.В., Фролова Е.В., Давыдова Н.И., Клишко Н.Н. Тест активации базофилов в диагностике аллергического бронхолегочного аспергиллеза. *Клиническая микология*. 2016, Т.18, №.3, С.7-11.
55. Лабис В.В., Базикян Э.А., Сизова С.В., Железный В.В., Бычкова Н.В., Козлов И.Г. Базофильный тест в практической медицине. *Практическая медицина*. 2019, №1, С.76-79.
56. Schiener M, Eberlein B, Moreno-Aguilar C, Pietsch G, Serrano P, McIntyre M, Schwarze L, Russkamp D, Biedermann T, Spillner E, Darsow U, Ollert M, Schmidt-Weber CB, Blank S. Application of recombinant antigen 5 allergens from seven allergy-relevant Hymenoptera species in diagnostics. *Allergy*. 2017 Jan;72(1):98-108. doi: 10.1111/all.13000.
57. Schwager C, Kull S, Behrends J, Röckendorf N, Schocker F, Frey A, Homann A, Becker WM, Jappe U. Peanut oleosins associated with severe peanut allergy-importance of lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Nov;140(5):1331-1338.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.020.
58. Gamboa PM, Sanz ML, Lombardero M, Barber D, Sánchez-Monje R, Goikoetxea MJ, Antépara I, Ferrer M, Salcedo G. Component-resolved in vitro diagnosis in peach-allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(1):13-20. PMID: 19274924.



59. 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):555-66. doi: 10.1016/j.iac.2009.04.011.
60. Sanz ML, Gamboa PM, De Weck AL. Cellular tests in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Curr Pharm Des*. 2008;14(27):2803-8. doi: 10.2174/138161208786369722.
61. Mayorga C, Sanz ML, Gamboa PM, García BE, Caballero MT, García JM, Labrador M, Lahoz C, Longo Areso N, López Hoyos M, Martínez Quesada J, Monteseirín FJ; Immunology Committee of the Spanish Society of Allergology and Clinical Immunology of the SEAIC. In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(2):103-9. PMID: 20461964.
62. Brockow K, Przybilla B, Aberer W, Bircher AJ, Brehler R, Dickel H, Fuchs T, Jakob T, Lange L, Pfützner W, Mockenhaupt M, Ott H, Pfaar O, Ring J, Sachs B, Sitter H, Trautmann A, Treudler R, Wedi B, Worm M, Wurpts G, Zuberbier T, Merk HF. Guideline for the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: S2K-Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) and the German Dermatological Society (DDG) in collaboration with the Association of German Allergologists (AeDA), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Contact Dermatitis Research Group (DKG), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI), the German Academy of Allergology and Environmental Medicine (DAAU), the German Center for Documentation of Severe Skin Reactions and the German Federal Institute for Drugs and Medical Products (BfArM). *Allergo J Int*. 2015;24(3):94-105. doi: 10.1007/s40629-015-0052-6.
63. Müller N, Fachruddin T, Hausmann O. Laborabklärung der Medikamentenallergie: Grenzen und Möglichkeiten. *Ther Umsch*. 2019 Jul;75(1):33-37. German. doi: 10.1024/0040-5930/a001056.

64. Campos L, Galvão VR, Kalil J, Castells M, Giavina-Bianchi P. BAT in the Diagnosis of Drug Allergy: a Novel Tool in Clinical Daily Practice? *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019 Mar 11;19(4):20. doi: 10.1007/s11882-019-0852-8.
65. Eberlein B, León Suárez I, Darsow U, Ruëff F, Behrendt H, Ring J. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin Exp Allergy.* 2010 Mar;40(3):411-8. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03426.x.
66. Aranda A, Mayorga C, Ariza A, Doña I, Rosado A, Blanca-Lopez N, Andreu I, Torres MJ. In vitro evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones. *Allergy.* 2011 Feb;66(2):247-54. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02460.x.
67. Giavina-Bianchi P, Galvão VR, Picard M, Caiado J, Castells MC. Basophil Activation Test is a Relevant Biomarker of the Outcome of Rapid Desensitization in Platinum Compounds-Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017 May-Jun;5(3):728-736. doi: 10.1016/j.jaip.2016.11.006.
68. Kim Z, Choi BS, Kim JK, Won DI. Basophil markers for identification and activation in the indirect basophil activation test by flow cytometry for diagnosis of autoimmune urticaria. *Ann Lab Med.* 2016 Jan;36(1):28-35. doi: 10.3343/alm.2016.36.1.28.
69. 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.
70. Alpan O, Layhadi J, Sønder SU, Li H, Shamji MH. Basophil Activation Test: A diagnostic, predictive and monitoring assay for Allergen Immunotherapy. *Allergy.* 2020 Sep 9. doi: 10.1111/all.14585.
71. Kosnik M, Silar M, Bajrovic N, Music E, Korosec P. High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy.* 2005 Nov;60(11):1401-6. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00894.x.
72. Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MK, Dahl R, Hoffmann HJ. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin Mol Allergy.* 2010 Feb 16;8(1):2. doi: 10.1186/1476-7961-8-2.

73. Zidarn M, Košnik M, Šilar M, Bajrović N, Korošec P. Sustained effect of grass pollen subcutaneous immunotherapy on suppression of allergen-specific basophil response; a real-life, nonrandomized controlled study. *Allergy*. 2015 May;70(5):547-55. doi: 10.1111/all.12581.
74. Tsai M, Mukai K, Chinthrajah RS, Nadeau KC, Galli SJ. Sustained successful peanut oral immunotherapy associated with low basophil activation and peanut-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Mar;145(3):885-896.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2019.10.038.
75. Nopp A, Johansson SG, Ankerst J, Bylin G, Cardell LO, Grönneberg R, Irander K, Palmqvist M, Oman H. Basophil allergen threshold sensitivity: a useful approach to anti-IgE treatment efficacy evaluation. *Allergy*. 2006 Mar;61(3):298-302. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.00987.x.
76. Johansson SG, Nopp A, Oman H, Ankerst J, Cardell LO, Grönneberg R, Matsols H, Rudblad S, Strand V, Stålenheim G. The size of the disease relevant IgE antibody fraction in relation to 'total-IgE' predicts the efficacy of anti-IgE (Xolair) treatment. *Allergy*. 2009 Oct;64(10):1472-7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02051.x.
77. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с пищевой аллергией, 2015. Available at: [http://nrcii.ru/docs/Klinicheskie\\_rekomendacii\\_po\\_diagnostike\\_AZ.pdf](http://nrcii.ru/docs/Klinicheskie_rekomendacii_po_diagnostike_AZ.pdf).
78. Willems LI, Ijzerman AP. Small molecule antagonists for chemokine CCR3 receptors. *Med Res Rev*. 2010 Sep;30(5):778-817. doi: 10.1002/med.20181.
79. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;187(6):875-883. doi:10.1084/jem.187.6.875
80. Bühring HJ, Simmons PJ, Pudney M, Müller R, Jarrossay D, van Agthoven A, Willheim M, Brugger W, Valent P, Kanz L. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*. 1999 Oct 1;94(7):2343-56. PMID: 10498606.

81. Tanaka K, Hirai H, Takano S, Nakamura M, Nagata K. Effects of prostaglandin D2 on helper T cell functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 16;316(4):1009-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.151.
82. Nagata K., Tanaka K., Ogawa K., Kemmotsu K., Imai T., Yoshie O. et al. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol*. 1999;162(3):1278-86. PMID: 9973380. 2
83. Dong D, Zheng L, Lin J, Zhang B, Zhu Y, Li N, Xie S, Wang Y, Gao N, Huang Z. Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. *Nature*. 2019 Sep;573(7775):546-552. doi: 10.1038/s41586-019-1537-0.
84. Agis H, Füreder W, Bankl HC, Kundi M, Sperr WR, Willheim M, Boltz-Nitulescu G, Butterfield JH, Kishi K, Lechner K, Valent P. Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology*. 1996 Apr;87(4):535-43. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.493578.x.
85. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2017;8:292. Published 2017 Mar 17. doi:10.3389/fimmu.2017.00292
86. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*. 2009 May 15;315(9):1584-92. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020.
87. Bieneman AP, Chichester KL, Chen YH, Schroeder JT. Toll-like receptor 2 ligands activate human basophils for both IgE-dependent and IgE-independent secretion. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Feb;115(2):295-301. doi: 10.1016/j.jaci.2004.10.018.
88. Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW Jr, Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(1):79-90. doi: 10.1159/000094495.

89. MacGlashan D. Autoantibodies to IgE and FcεRI and the natural variability of spleen tyrosine kinase expression in basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Mar;143(3):1100-1107.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2018.05.019.
90. Crivellato E, Nico B, Ribatti D. The history of the controversial relationship between mast cells and basophils. *Immunol Lett*. 2011 Dec 30;141(1):10-7. doi: 10.1016/j.imlet.2011.06.008.
91. Sabato V, Verweij MM, Bridts CH, Levi-Schaffer F, Gibbs BF, De Clerck LS, Schiavino D, Ebo DG. CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcεRI-dependent anaphylactic degranulation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012 May;82(3):132-8. doi: 10.1002/cyto.b.21003.
92. Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MK, Dahl R, Hoffmann HJ. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin Mol Allergy*. 2010 Feb 16;8(1):2. doi: 10.1186/1476-7961-8-2.
93. de Weck AL, Sanz ML. For allergy diagnostic flow cytometry, detection of CD203c instead of CD63 is not at all an improvement in other hands. *Clin Exp Allergy*. 2003 Jun;33(6):849-52; author reply 852-3. PMID: 12848168.
94. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Ebo DG, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(3):177-89. doi: 10.1159/000115885.
95. Ono E, Taniguchi M, Higashi N, Mita H, Kajiwara K, Yamaguchi H, Tatsuno S, Fukutomi Y, Tanimoto H, Sekiya K, Oshikata C, Tsuburai T, Tsurikisawa N, Otomo M, Maeda Y, Hasegawa M, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2):483-489.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.074.
96. Hagau N, Gherman-Ionica N, Sfichi M, Petrisor C. Threshold for basophil activation test positivity in neuromuscular blocking agents hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013 Oct 23;9(1):42. doi: 10.1186/1710-1492-9-42.
97. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in

allergy. Cytometry B Clin Cytom. 2008 Jul;74(4):201-10. doi: 10.1002/cyto.b.20419.

98. Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, Nopp A, Eberlein B, Ferrer M, Rouzaire P, Ebo DG, Sabato V, Sanz ML, Pecaric-Petkovic T, Patil SU, Hausmann OV, Shreffler WG, Korosec P, Knol EF. The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*. 2015 Nov;70(11):1393-405. doi: 10.1111/all.12698.

99. Бычкова Н.В., Зайцева Ю., Алхутова Н.А., Давыдова Н.И., Новик Г.А., Калинина Н.М. Анализ аллерген-индуцированной *in vitro* активации базофилов методом проточной цитометрии и специфических иммуноглобулинов Е у детей с атопическим дерматитом. Международная научно-практическая конференция «Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии», Санкт-Петербург, 14-16 сентября 2011, С.30-31.

100. Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Тест активации базофилов для оценки сенсибилизации к мажорным и минорным аллергенам у пациентов с поллинозом. IX Международный научный конгресс «Многопрофильная клиника XXI века. Инновации и передовой опыт», Санкт-Петербург, 10-12 сентября 2020, С.66-70.

101. Lee HS, Song WJ, Lee JW, Cho YY, Park HK, Kang MG, Cho SH, Sohn SW. Chlorpheniramine-induced anaphylaxis diagnosed by basophil activation test. *Asia Pac Allergy*. 2015 Jul;5(3):177-80. doi: 10.5415/apallergy.2015.5.3.177.

102. Song WJ, Chang YS. Recent applications of basophil activation tests in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Asia Pac Allergy*. 2013 Oct;3(4):266-80. doi: 10.5415/apallergy.2013.3.4.266.

103. Salas M, Gomez F, Fernandez TD, Doña I, Aranda A, Ariza A, Blanca-López N, Mayorga C, Blanca M, Torres MJ. Diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media. *Allergy*. 2013 Sep;68(9):1203-6. doi: 10.1111/all.12214.

104. Czarnobilska EM, Bulanda M, Śpiewak R. The usefulness of the basophil activation test in monitoring specific immunotherapy with house dust mite allergens. *Postepy Dermatol Alergol*. 2018 Feb;35(1):93-98. doi: 10.5114/ada.2018.73169.
105. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen-based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):155-61. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.008.
106. Бычкова Н.В., Учеваткина А.Е., Козлова Я.И., Фролова Е.В., Новик Г.А., Калинина Н.М. Оптимизация концентрации аллергенов для использования в тесте активации базофилов. *PMЖ*. 2019, Т. 27, № 3, С. 32-35.
107. Sturm GJ, Kranzelbinder B, Sturm EM, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy*. 2009 Sep;64(9):1319-26. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02004.x.
108. Aranda A, Mayorga C, Ariza A, Doña I, Blanca-Lopez N, Canto G, Blanca M, Torres MJ. IgE-mediated hypersensitivity reactions to methylprednisolone. *Allergy*. 2010 Nov;65(11):1376-80. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02386.x.
109. Flora M, Perna F, Abbadessa S, Garziano F, Maffucci R, Maniscalco M, Mollica M, Pelaia C, Tremante E, Maffei M, Calabrese C. Basophil activation test for *Staphylococcus aureus* enterotoxins in severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 2021 Apr;51(4):536-545. doi: 10.1111/cea.13772.
110. Abuaf N, Rostane H, Barbara J, Toly-Ndour C, Gaouar H, Mathelier-Fusade P, Leynadier F, Francès C, Girot R. Comparison of CD63 Upregulation Induced by NSAIDs on Basophils and Monocytes in Patients with NSAID Hypersensitivity. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:580873. doi: 10.1155/2012/580873.
111. Nopp A, Cardell LO, Johansson SG, Oman H. CD-sens: a biological measure of immunological changes stimulated by ASIT. *Allergy*. 2009 May;64(5):811-4. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01900.x.

112. Бычкова Н.В., Калашникова А.А. Давыдова Н.И., Вологжанин Д.А. Оценка активации базофилов *in vitro* с помощью метода проточной цитометрии. Российский аллергологический журнал. – 2009. - №3, выпуск 1. – С.132.

113. Бычкова Н.В. Возможности лабораторной диагностики аллергии на стоматологические материалы и местные анестетики Международная научно-практическая конференция, посвященная 55-летию основания стоматологического факультета ПСПбГМУ им. акад. И.И. Павлова «Фундаментальные и прикладные проблемы стоматологии», Санкт-Петербург, 11-13 декабря 2014 г., С.30-31.

114. Базикян Э.А., Лабис В.В., Козлов И.Г., Хайдуков С.В., Лабис Ю.В. Способ персонифицированного подбора дентального имплантата на основе сплавов оксида титана. Патент на изобретение RU 2611013 С, 17.02.2017. Заявка № 2015152570 от 09.12.2015.

115. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология "Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов" (проект). Медицинская иммунология. 2012, Т. 14, № 3, С. 255-268.

116. Yamaga S, Yanase Y, Ishii K, Ohshimo S, Shime N, Hide M. Decreased intracellular histamine concentration and basophil activation in anaphylaxis. *Allergol Int.* 2020 Jan;69(1):78-83. doi: 10.1016/j.alit.2019.05.009.

117. Бычкова Н.В. Чиненова Л.В., Давыдова Н.И., Карпов М.И., Бисага Г.Н. Сенсibilизация к лекарственным препаратам, Т-хелперы 2 и иммуноглобулин Е у пациентов с рассеянным склерозом. Медицинская иммунология. 2011, Т. 13, N4-5, С.362-363.

118. Синельникова Н.А., Калинина Н.М., Савенкова Н.Д., Бычкова Н.В. Предикторные факторы тяжести и длительности болезни у детей с хронической крапивницей. Аллергология и иммунология в педиатрии. 2018, № 2(53), С. 32-40.



119. Бычкова Н. В. Применение метода проточной цитометрии для диагностики аллергических заболеваний. Справочник заведующего КДЛ. 2016, № 4, С. 21-30.

120. Новик Г.А., Халева Е.Г., Жданова М.В., Бычкова Н.В. Открытое проспективное контролируемое пострегистрационное исследование эффективности и безопасности длительного применения аминокислотной смеси у детей первого года жизни с аллергией к белкам коровьего молока. Вестник Российской академии медицинских наук. 2016, Т. 71, № 6, С. 446-457. DOI 10.15690/vgramn757.

121. Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. Тест активации базофилов для диагностики лекарственной сенсibilизации. Многопрофильная клиника XXI века. Передовые медицинские технологии. Санкт-Петербург 26-28 мая 2016, С. 41-43.

122. Patil SU, Shreffler WG. Immunology in the Clinic Review Series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation. Clin Exp Immunol. 2012 Jan;167(1):59-66. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04503.x.

123. Zenarruzabeitia O, Vitallé J, Eguizabal C, Simhadri VR, Borrego F. The Biology and Disease Relevance of CD300a, an Inhibitory Receptor for Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine. J Immunol. 2015 Jun 1;194(11):5053-60. doi: 10.4049/jimmunol.1500304.

124. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2018. 720 с. ISBN 9785769124976.

125. Tsuda H, Michimata T, Sakai M, Nagata K, Nakamura M, Saito S. A novel surface molecule of Th2- and Tc2-type cells, CRTN2 expression on human peripheral and decidual CD4+ and CD8+ T cells during the early stage of pregnancy. Clin Exp Immunol. 2001 Jan;123(1):105-11. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01422.x.

126. Бычкова Н.В., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. Диагностика сенсibilизации к рентгеноконтрастным препаратам методом проточной цитометрии. Российский аллергологический журнал. 2016, Т.2, №3, С.128-129.

127. Бычкова Н.В., Синельникова Н.А, Чиненова Л.В., Калинина Н.М. CD3+CD294+ лимфоциты как маркеры Th2 и Tc2 иммунного ответа. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(S): 239-240.
128. Mitson-Salazar A., Prussin C. Pathogenic Effector Th2 Cells in Allergic Eosinophilic Inflammatory Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2017; 4:165. doi: 10.3389/fmed.2017.00165.
129. Nagata K., Hirai H., Tanaka K., Ogawa K., Aso T., Sugamura K. et al. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). *FEBS Lett*. 1999; 459(2):195-9. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01251-x.
130. Haase P., Voehringer D. Regulation of the humoral type 2 immune response against allergens and helminths. *Eur J Immunol*. 2021; 51(2):273-279. doi: 10.1002/eji.202048864.
131. Бычкова Н.В., Чиненова Л.В., Калинина Н.М. Увеличение Т-цитотоксических 2 лимфоцитов с фенотипом CD3+CD8+CD294+ у пациентов с тяжелыми кожными проявлениями лекарственной аллергии. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(4): 687-689.
132. Pettipher R. The roles of the prostaglandin D(2) receptors DP(1) and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153 Suppl 1(Suppl 1):S191-9. doi: 10.1038/sj.bjp.0707488.
133. Gause W.C., Rothlin C., Loke P. Heterogeneity in the initiation, development and function of type 2 immunity. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(10):603-614. doi: 10.1038/s41577-020-0301-x.
134. Kim M.H., Park C.H., Kim D.I., Kim K.M., Kim H.K., Lim K.H. et al. Surveillance of contrast-media-induced hypersensitivity reactions using signals from an electronic medical recording system. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;108(3):167-71. doi: 10.1016/j.anai.2012.01.012.
135. Шавкатов М.З., Назаренко В.А. Анализ распространенности лекарственной аллергии у пациентов хирургического стационара. *Bulletin of Medical Internet Conferences (ISSN 2224- 6150)*. 2019; 9 (1): 540.

136. Trautmann A., Brockow K., Behle V., Stoevesandt J. Radiocontrast Media Hypersensitivity: Skin Testing Differentiates Allergy From Nonallergic Reactions and Identifies a Safe Alternative as Proven by Intravenous Provocation. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(7):2218-2224. doi: 10.1016/j.jaip.2019.04.005.

137. Tasker F, Fleming H, McNeill G, Creamer D, Walsh S. Contrast media and cutaneous reactions. Part 1. Immediate hypersensitivity reactions to contrast media and gadolinium deposition. *Clin Exp Dermatol.* 2019 Dec;44(8):839-843. doi: 10.1111/ced.13990.

138. Tasker F., Fleming H., McNeill G., Creamer D., Walsh S. Contrast media and cutaneous reactions. Part 2: Delayed hypersensitivity reactions to iodinated contrast media. *Clin Exp Dermatol.* 2019;44(8):844-860. doi: 10.1111/ced.13991.

139. Хлудова Л.Г. Реакции гиперчувствительности на контрастные средства. *Астма и аллергия.* 2019; 2: 8-11.