

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900091** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

(51) Int. Cl. *G01N 33/569* (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.18

(54) **СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ КАНДИДОЗНОГО СТОМАТИТА**

(96) 2019/ЕА/0005 (ВУ) 2019.01.18

(72) Изобретатель:

(71) Заявитель:
**УЧРЕЖДЕНИЕ
ОБРАЗОВАНИЯ "ВИТЕБСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ОРДЕНА ДРУЖБЫ
НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (ВУ)**

**Карпук Наталья Анатольевна,
Рубникович Сергей Петрович, Карпук
Иван Юрьевич (ВУ)**

(57) Изобретение относится к области медицины и может применяться в аллергологии и стоматологии. Задачей предполагаемого изобретения является разработка способа диагностики кандидозного стоматита, позволяющего повысить эффективность лабораторной диагностики данного заболевания. Реализация данного способа достигается за счет того, что в крови выявляют содержание $CD4^+CD25^+CD45^+$ Т-лимфоцитов и при наличии их прироста более чем на 23% после постановки лабораторного теста с *Candida albicans* диагностируют кандидозный стоматит. Положительный эффект предполагаемого изобретения заключается в том, что предложенный способ обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью и позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики данного заболевания.

201900091
A1

201900091
A1

СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ КАНДИДОЗНОГО СТОМАТИТА

Изобретение относится к области медицины и может применяться в иммунологии и стоматологии.

Обычно кандидозный стоматит вызывается дрожжеподобными грибами вида *Candida albicans*. Диагноз кандидозный стоматит ставится по характерным клиническим проявлениям, а также по результатам лабораторных исследований, которые включают микроскопический анализ патологического материала, его посев на питательную среду, внутрикожные пробы с дрожжевым аллергеном, выявление грибковых метаболитов методом газовой хроматографии, серологических исследований (РСК, РП, РА), молекулярных методов (ПЦР-диагностика) [1].

Недостатками этих исследований является то, что они не обладают высокой информативностью, так как обнаружение антител к антигенам может отражать и носительство грибов на слизистых и являться последствием перенесённой ранее кандидозной инфекции, при выявлении метаболитов методом газовой хроматографии наблюдается высокий риск получения ложноположительных результатов из-за присутствия сахаров в крови пациента. К недостаткам ПЦР-диагностики высокая стоимость, многоступенчатость анализов, невозможность различить живые и мёртвые микроорганизмы, возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Прототипом предполагаемого изобретения является способ специфической диагностики кандидозного стоматита по обнаружению в крови IgA, IgM, IgG-антител к *Candida albicans* методом иммуноферментного анализа и по их наличию диагностируют кандидозный стоматит [2].

Недостатком прототипа является то, что выявляется только гуморальный тип реагирования, однако известно, что в патогенезе кандидозного стоматита ведущая роль принадлежит Т-лимфоцитам [3].

Задачей предполагаемого изобретения является разработка способа диагностики кандидозного стоматита, позволяющего повысить эффективность лабораторной диагностики данного заболевания.

Реализация данного способа достигается за счет того, что в крови выявляют содержание $CD4^+CD25^+CD45^+$ Т-лимфоцитов и при наличии их прироста более чем на 23% после постановки лабораторного теста с *Candida albicans* диагностируют кандидозный стоматит.

Способ осуществляется в несколько этапов следующим образом:

1. *Подготовка Candida albicans к постановке теста.*

Candida albicans культивируют в течение 24 ч на скошенном агаре с глюкозой. Затем клетки *Candida albicans* смывают физиологическим раствором хлорида натрия, дважды отмывают и готовят суспензию с концентрацией *Candida albicans* 5×10^7 клеток в 1 мл.

2. *Проводят лабораторный тест с Candida albicans для обнаружения CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов*

Для этого забирают 2 мл крови из локтевой вены натощак в утреннее время в стерильную пробирку с гепарином (20 ед/мл). Далее в 2 пробирки с питательной средой вносят по 100 мкл крови. В одну пробирку добавляют 2,5 мкл *Candida albicans* (опытная проба), в другую – 2,5 мкл забуференного физиологического раствора (ЗФР) (контрольная проба).

Полученные образцы культивируют в течение 24 часов при 37°C в термостате. Затем добавляют в каждую пробирку по 2,5 мкл раствора анти-CD4CD25CD45 моноклональных антител. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе и инкубируют 15 минут при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку добавляют по 500 мкл раствора, лизирующего эритроциты и инкубируют при температуре 37°C еще 10 мин, далее в каждую пробирку добавляют по 500 мкл буферного раствора и помещают пробирки в проточный цитофлюориметр и производят учет результатов.

5. *Учет результатов*

При учете результатов используют проточный цитофлюориметр с аргоновым лазером (исходная длина волны 488 нм) и гелий-неоновым лазером (исходная длина волны 633 нм) в качестве источников света. Результаты анализа образцов регистрируют при длинах волн от 488 нм до 725 нм. Результаты обрабатывают с помощью компьютерной программы СХР («Becton Dickinson», США).

Реакция считается положительной (диагностируют наличие кандидозного стоматита), если выявляется в опытной пробе прирост CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов более чем на 23% по сравнению контрольной пробой.

Положительный эффект предполагаемого изобретения заключается в том, что предложенный способ обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью и позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики данного заболевания.

Клинические примеры

Апробация способа проведена на 22 пациентах с кандидозным стоматитом в возрасте от 36 до 79 лет с хроническим и рецидивирующим течением кандидоза или отсутствием эффекта от лечения острого кандидоза с полученным количеством грибов *p. Candida*. Кон-

трольную группу составили 20 пациентов в возрасте от 34 до 75 лет без кандидозного стоматита.

Процент Т-лимфоцитов у пациентов опытной и контрольной групп, экспрессирующих маркеры CD4⁺CD25⁺CD45⁺ с *Candida albicans*, был выше чем с контрольным ЗФР. Процент CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов у пациентов опытной группы с *Candida albicans* был достоверно выше, чем у пациентов контрольной группы ($p < 0,05$), что указывает на исходную активацию Т-лимфоцитов *Candida albicans* при кандидозном стоматите (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние *Candida albicans* на процент CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов

Группы	<i>Candida albicans</i>	ЗФР
Опытная группа (n=22)	5,3 [3,46; 5,77]*, +	2,64 [0,64; 3,16]
Контрольная группа (n=20)	2,74 [2,07; 3,01]	2,25 [1,94; 2,67]

Примечание. * – отличие между опытной и контрольной пробой внутри группы ($p_{\text{Mann-Whitney}} < 0,05$);

+ – отличие результатов опытной группы от контрольной ($p < 0,05$).

Диагностическую значимость оценивают при помощи метода ROC-анализа.

Рассчитывают оптимальный порог процента прироста CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов при оптимальных значениях чувствительности (Se) и специфичности (Sp), что указывает на высокую диагностическую значимость предлагаемого способа (таблица 2).

Таблица 2 – Диагностическая значимость способа диагностики кандидозного стоматита у пациентов по приросту CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов

Se	Sp	AUC	P	Оптимальный порог прироста
89,5%	96%	0,93	0,002	23%

Использованные источники:

1. Латышева, С.В. Современные аспекты патогенеза и диагностики кандидоза полости рта / С.В. Латышева // Современная стоматология. – 2007. - №1. – с.57-61.
2. Карпук, И. Ю. Спектр антител к кандидам и акрилу у пациентов с протезным стоматитом / И. Ю. Карпук // Современная стоматология. – 2017. – № 2. – С. 73–76.
3. Сергеев, А.Ю. Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев, 2001. М.: Триада-Х. – 472 с.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ диагностики кандидозного стоматита, включающий постановку лабораторного теста с *Candida albicans*, отличающийся тем, что в крови выявляют содержание $CD4^+CD25^+CD45^+$ Т-лимфоцитов и при наличии их прироста более чем на 23% после постановки лабораторного теста с *Candida albicans* диагностируют кандидозный стоматит.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900091

Дата подачи: 18 января 2019 (18.01.2019)		Дата испрашиваемого приоритета:
Название изобретения: Способ диагностики кандидозного стоматита		
Заявитель: УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ "ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"		
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)		
<input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)		
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		
МПК:	G01N 33/569 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)	СПК: G01N 33/569 (2017-08) G01N 33/577 (2016-05)
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК		
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:		
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) G01N 33/569, 33/577		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:		
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	ЖЕЛЕЗНИКОВА Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию. Журнал инфектологии, 2011, Том 3, № 1, сс. 6-13	1
A	YANEZ Alberto et al. Candida albicans Induces Selective Development of Macrophages and Monocyte Derived Dendritic Cells by a TLR2 Dependent Signalling. PLoS ONE, 2011, Vol. 6, Issue 9, e24761	1
A	MONTAGNOLI Claudia et al. B7/CD28-Dependent CD4+CD25+Regulatory T Cells Are Essential Components of the Memory-Protective Immunity to Candida albicans. The Journal of Immunology, 2002, 169, pp. 6298-6308	1
A	RU 2485183 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ "УФИМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНЫ ТРУДА И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА") 20.06.2013	1
<input checked="" type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В		
<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* Особые категории ссылочных документов:		
"А" документ, определяющий общий уровень техники	"Г" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения	
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее	"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности	
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.	"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории	
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета	"&" документ, являющийся патентом-аналогом	
"D" документ, приведенный в евразийской заявке	"L" документ, приведенный в других целях	
Дата действительного завершения патентного поиска:		04 июля 2019 (04.07.2019)
Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо :  Ю.В. Жилина Телефон № (499) 240-25-91

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

Номер евразийской заявки:
201900091

ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	KZ 25973 A4 (РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ ТУБЕРКУЛЕЗА РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН) 15.08.2012	1
A	AU 2008300823 A1 (PEVION BIOTECH LTD et al.) 26.03.2009	1