

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039825**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.17

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

(21) Номер заявки
201900091

(22) Дата подачи заявки
2019.01.18

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ КАНДИДОЗНОГО СТОМАТИТА

(43) **2020.07.31**

(96) **2019/ЕА/0005 (ВУ) 2019.01.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

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

(56) ЖЕЛЕЗНИКОВА Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию. Журнал инфектологии, 2011, т. 3, № 1, сс. 6-13

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

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

RU-C1-2485183

KZ-A4-25973

AU-A1-2008300823

(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.

B1

039825

039825

B1

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 перенесенной 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 относится высокая стоимость, многостадийность 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 ч 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 мин 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 точный 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 до 725 нм. Результаты обрабатывают с помощью компьютерной программы CXP ("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 р. *Candida*. Контрольную 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 (табл. 1).

Таблица 1

Влияние <i>Candida albicans</i> 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_{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 (табл. 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//Соврем. 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 применение моноклональных антител CD25 (клон CD25-3G10, изотип mslgG₁, Mouse Anti-Human (R-PE)), CD4 (клон S3.5, изотип mslgG_{2a}, Mouse Anti-Human (PE-Cy5.5)), CD45 (клон HI30, изотип mslgG₁, Mouse Anti-Human (PE-Cy7)) для иммунофенотипирования CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов крови с *Candida albicans* in vitro в течение 24 ч и отличающийся тем, что при наличии прироста CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов более чем на 23% по сравнению с исходной пробой диагностируют кандидозный стоматит.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2