

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц

«08 августа 2019 г.

Регистрационный номер № 007-0219

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ КАНДИДОЗА

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Авторы: к.м.н. Карпук Н.А., д.м.н., профессор Рубникович С.П., д.м.н., доцент Карпук И.Ю., Пожарицкая А.А.

Витебск-Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

06.03.2019

Регистрационный № 007-0219

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ КАНДИДОЗА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Н. А. Карпук, д-р мед. наук, проф. С. П. Рубникович, д-р мед. наук, доц. И. Ю. Карпук, А. А. Пожарицкая

Витебск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику кандидоза (В37), путем определения в крови содержания CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов; при наличии их прироста более чем на 23 % после постановки лабораторного теста с *Candida albicans* по сравнению с контрольной пробой диагностируют кандидоз.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с кандидозом.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Термостат.
2. Стерильные пробирки 10-20 мл (20-30 шт.).
3. Микропробирки 1,5 мл с крышкой (10-20 шт.).
4. Холодильник.
5. Автоматические дозаторы 20-200 мкл.
6. Проточный цитометр (Чувствительность и разрешение — определение частиц диаметром от 0,5 до 40 мкм. Скорость анализа — от 3300 до 10 000 событий в 1 с; скорость потока пробы — 4,17-100 мкл/мин.
7. Вортекс для перемешивания.
8. Моноклональные антитела CD4, CD25, CD45.
9. Гепарин.
10. Раствор, лизирующий эритроциты.
11. Физиологический раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФРФ) рН 7,2.
12. Физиологический раствор хлорида натрия 0,9 %.
13. Суспензия с концентрацией *Candida albicans* 5×10⁷ клеток в 1 мл.
14. Скошенный агар с глюкозой.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Кандидоз (В37)

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

Ограничения:

Отсутствие возможности забора 3 мл крови.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 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* 5×10⁷ клеток в 1 мл.

Этап 2. Лабораторный тест с Candida albicans для обнаружения CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов

Берут 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 °С 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 °С еще 10 мин, далее в каждую пробирку добавляют по 500 мкл буферного раствора, помещают их в проточный цитофлюориметр и производят учет результатов.

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 СХР («Becton Dickinson», США).

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

Положительный эффект предполагаемого изобретения заключается в том, что способ обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения отсутствуют.

Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа:

использование крови, хранившейся более 2–3 ч с момента получения материала, приводит к искажению результатов исследований;

использование стеклянных пробирок вместо пластиковых вызывает к активации клеток вследствие контакта со стеклом;

несоблюдение условий приготовления и хранения аллергенов.

Пути устранения:

1. Исследование венозной крови не позднее 2 ч с момента получения.
2. Использование пробирок из пластика.
3. Человеческий сывороточный альбумин в концентрации 2 г/л добавлять к 0,01 % раствору солей металлов непосредственно перед использованием. Рабочую суспензию хранить в холодильнике.

Контроль качества лабораторной диагностики осуществляется методом исследования параллельных проб и повторных проб согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.09.2009 № 873 «Об утверждении инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований». При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам ТНПА.

Обоснование целесообразности практического использования метода

Диагноз «кандидоз» устанавливается 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, серологические исследования (РСК, РП, РА), молекулярные методы (ПЦР-диагностика).

Недостатками этих исследований является то, что они не обладают высокой информативностью, так как обнаружение антител к антигенам может отражать и носительство грибов на слизистых оболочках 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 относятся: высокая стоимость, многоэтапность анализов, невозможность различения живых и мертвых микроорганизмов, возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Известен способ специфической диагностики кандидоза, состоящий в обнаружении в крови IgA, IgM, IgG-антител к *Candida albicans* методом иммуноферментного анализа.

Недостатком этого метода является то, что выявляется только гуморальный тип реагирования, однако известно, что в патогенезе кандидоза ведущая роль принадлежит Т-лимфоцитам.

Разработанный способ исследования позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики данного заболевания.

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач
УЗ «Витебский областной
клинический стоматологический центр»
_____ О. Ю. Богинский
_____ 2019

Отчет о предварительном клиническом испытании метода диагностики кандидоза

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 рода *Candida*. Группу сравнения составили 20 пациентов в возрасте от 34 до 75 лет без кандидозного стоматита.

Для Т-лимфоцитов у пациентов опытной группы и группы сравнения, экспрессирующих маркеры CD4⁺CD25⁺CD45⁺ с *Candida albicans*, была выше чем, с контрольным ЗФР. Процент CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов у пациентов опытной группы с *Candida albicans* был достоверно выше, чем у лиц группы сравнения (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]
Группа сравнения (n = 20)	2,74 [2,07; 3,01]	2,25 [1,94; 2,67]

* — отличие между опытной и контрольной пробой внутри группы (p_{Mann-Whitney}<0,05);
+ — отличие результатов опытной группы от группы сравнения (p<0,05).

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

Таблица 2. — Диагностическая значимость метода диагностики кандидоза у пациентов по приросту CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов

ДЧ	ДС	P	Оптимальный порог прироста
89,5 %	96 %	0,002	23 %