



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **104709**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 08768**

(22) Дата подання заявки: **10.09.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.02.2016**

(46) Публікація відомостей **10.02.2016, Бюл.№ 3**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Чернишова Людмила Іванівна (UA),
Бондаренко Анастасія Валеріївна (UA),
Чернишов Віктор Павлович (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМЕНІ П.Л.
ШУПИКА,
вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112 (UA)**

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПЕРВИННОГО ІМУНОДЕФІЦИТУ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ РЕЦИДИВНИМ ШКІРНО-СЛИЗОВИМ КАНДИДОЗОМ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики первинного імунodefіциту у пацієнтів із рецидивним шкірно-слизовим кандидозом включає застосування скринінгових імунологічних методів: загальний аналіз крові з формулою, кількісне визначення сироваткових імуноглобулінів, тестування на ВІЛ, визначення субпопуляцій лімфоцитів, тест з дигідрородаміном загальновідомими способами шляхом застосування алгоритму обстеження. Додатково спосіб включає функціональні методи визначення продукції IL-17A, IL-17F та IL-22, що дозволяють виявити ланку ураження імунної системи у пацієнтів, при рутинному імунологічному обстеженні яких не виявлено відхилень.

UA 104709 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до педіатрії та клінічної Імунології, і може бути використана при діагностиці дітей із рецидивним шкірно-слизовим кандидозом.

До загальноприйнятих методів дослідження імунної системи, застосовуваних у більшості вітчизняних імунологічних лабораторій, включаючи комерційні лабораторії, належать кількісне визначення загальних сироваткових імуноглобулінів, основних субпопуляцій лейкоцитів та лімфоцитів. Але кількісний аналіз основних факторів імунітету не завжди дозволяє зробити висновок про їх функціональну здатність і функціонування імунної системи. У таких випадках для уточнення наявності і виду імунного дефекту необхідним є застосування функціональних тестів.

Найбільш близькими до корисної моделі є способи оцінки проліферативної відповіді лімфоцитів в реакції бласттрансформації *in vitro*, визначення експресії молекули STAT1, секвенування генів STAT1, STAT3, DOCK8, AIRE, CYBB, CYBA, IL17F, IL17RA, CARD9).

В реакції бласттрансформації лімфоцити пацієнта інкубують з антигеном або мітогеном, після чого досліджують зміни проліферативної активності за включенням 3H-тимідину на сцинтиляційному лічильнику [Int. techn. biol. 1989, v. 2, N 1, p. 33-38]. Спосіб вважається достатньо інформативним, дозволяє констатувати наявність дефекту в імунній системі. До недоліків належать неспецифічність (неможливість точного визначення ланки ураження імунної системи) і трудомісткість.

Для визначення експресії молекули STAT1 використовуються первинні антитіла проти фосфорильованого білка STAT1 (pY701; BD), STAT1 (C-24; SantaCruz), V5 (Invitrogen), фосфорильованого білка STAT3 (Cell Signal ing) і STAT3 (SantaCruz). Візуалізація нефосфорильованого і фосфорильованого STAT1 здійснюється за допомогою графічної системи 2002 PyMOLMolecularGraphicsSystem (DeLanoScientific, PaloAlto, CA). Основним недоліком методу є необхідність спеціального обладнання, висока вартість, інформативність лише для однієї нозологічної форми.

Золотим стандартом діагностики імунних дефектів є молекулярно-генетичні методи дослідження, що дозволяють уточнити дефект конкретного гена, що лежить в основі захворювання. Основним недоліком генетичних методів дослідження є їх висока вартість, необхідність спеціального обладнання секвенатора, що на сьогодні недоступно для більшості лабораторій України. Крім того, спектр ПІД, при яких описані мікози, достатньо широкий (Гіпер-IgE-синдром внаслідок мутацій STAT3, DOCK8, дефекти в системі INF- γ -IL-12, аутоімунний поліендокринний синдром 1 типу, хронічна гранулематозна хвороба, важкі вроджені нейтропенії, аутосомно-домінантний дефіцит IL17F, аутосомно-рецесивний дефіцит рецептора IL17RA, аутосомно-рецесивний дефіцит CARD9, мутації лімфоїдної фосфатази Lyp та дектину-1, gain-of-function мутації в гені STAT1), що робить недоцільними дані дослідження без уточнення ланки ураження імунної системи.

В той же час відомо, що всі описані на сьогодні генетичні дефекти, що супроводжуються ізолюваною чутливістю до грибкових інфекцій, характеризуються порушенням продукції IL-17A, IL17F і/або IL22 або функції їх рецепторів, то доцільним є розробка методу визначення їх продукції *in vitro*.

Задача корисної моделі полягає в розробці алгоритму обстеження пацієнтів із рецидивним шкірно-слизовим кандидозом. Поставлена задача вирішується шляхом визначення продукції IL-17A, IL17F і/або IL22, у яких при рутинному імунологічному дослідженні не виявлено відхилень, що дасть можливість його широкого використання для уточнення ланки ураження імунної системи, що дозволить значно зменшити час на наступне проведення молекулярно-генетичного дослідження і його вартості за рахунок звуження спектру можливих генетичних дефектів.

Спосіб здійснюється наступним чином. Пацієнт із рецидивним шкірно-слизовим кандидозом оцінюється за допомогою скринінгових імунологічних методів: загальний аналіз крові з формулою, кількісне визначення сироваткових імуноглобулінів, тестування на ВІЛ, визначення субпопуляцій лімфоцитів, тест з дигідрородаміном загальновідомими способами. При виявленні відхилень у вищезазначених аналізах здійснюються відповідні відомі уточнюючі діагностичні процедури. При відсутності відхилень у вищезазначених аналізах необхідним є оцінка кількості IL-17A- та IL-22-продукуючих Т-клітин у відповідь на стимуляцію грибами роду *Candida*, яка здійснюється на проточному цитофлюориметрі методом ІФА на супернатантах, зібраних через 48 годин стимуляції цільної крові з 40нг/мл PMA і 10-5 М іономіцину. Використовуються моноклональні антитіла до IL-17A і IL-22 Duo set kits (R&D Systems) і до IL-17F ELISA Ready-SET-GO! Set (eBioscience).

Приклад 1. Хлопчик І., 1992 року народження, перебував під спостереженням із 7 років. Із 3,5 міс. страждав на рецидивний оральний кандидоз щомісяця, із 17 міс. - оніхомікоз, із вогнищ висіяно *C.albicans*. Негативні результати тестування на ВІЛ і визначення хлоридів поту дали

змогу виключити ВІЛ-інфекцію і муковісцидоз. У 5 років діагностовано мікроспорію і трихофітію волосистої частини голови, які вдалося ліквідувати шляхом застосування гризеофульвіну. Із 5 років спостерігається безперервно-рецидивний кандидоз шкіри та слизових оболонок із тимчасовою відповіддю на протигрибкові препарати і поступовим розвитком резистентності. На момент першого спостереження - значне зниження показників зросту і маси тіла (до 25-го центиля), вогнищева алопеція, діагностований автоімунний кератоувеїт. Методом фіброгастродуоденоскопії діагностовано кандидозний езофагіт і стеноз стравоходу.

Методом поглибленого імунологічного дослідження виявлено лімфопенію, зниження рівня субпопуляцій Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, а також NK-клітин. Під час дослідження функції лімфоцитів відзначено помірне зниження реакції бласттрансформації з мітогенами (фітогемаглютинін, конканавалін), значне зниження проліферативної відповіді на основні антигени (правцевий анатоксин, туберкулін), майже повну відсутність відповіді на антигени інфекційних збудників - віруси (вірус простого герпесу, грипу В) і кандидозний антиген, що, однак не давало можливості встановити нозологічну форму імунодефіциту.

Дослідження продукції цитокінів IL-17A та IL-22 in vitro виявило повну відсутність продукції IL-17A клітинами пацієнта у відповідь на стимуляцію грибами роду *Candida* (табл.).

Таблиця

Результати функціональних тестів -- стимуляція клітин пацієнта грибами роду *Candida* in vitro

	Без стимуляції		Убиті <i>Candida</i> , 1,0×10 ⁵		Убиті <i>Candida</i> , 5,0×10 ⁵		Живі <i>Candida</i> , 1,0×10 ³	
	IL-17A*	IL-22	IL-7A	IL-22	IL-7A	IL-22	IL-17A	IL-22
Пацієнт І.	0	0	0	16,5	0	42	0	9
Контроль	31,3	15,16	484,35	3829	609	3663	741,11	3443
(середні значення кількості)	n=7	n=3	n=15	n=9	n=21	n=9	n=13	n=5

*pg/ml - для всіх цитокінів.

У зв'язку із виявленням порушення функції в системі інтерлейкінів 17-А та 22, пацієнту було проведено дослідження генів AIRE, dectin-1, dectin-2 та CARD9, що не виявило причинних мутацій. Зважаючи на розгорнуту картину імунодефіциту у відсутність даних за вторинний імунодефіцит, у віці 18 років було ініційоване повно-екзомнесеквенування, під час якого виявлено гетерозиготну мутацію с.494А>G в СС-домені STATJ-гена, що підтверджує діагноз хронічного шкірно-слизового кандидозу з автосомно-домінантним типом успадкування як самостійної нозологічної форми первинного імунодефіциту.

Гіпотеза про зв'язок мутацій в СС-домені STAT1-гена, що приводять до посилення функції білка STAT1, із розвитком хронічного шкірно-слизового кандидозу була підтверджена виявленням ще 11 додаткових варіантів мутацій в цьому гені у інших хворих різних етнічних груп із хронічним шкірно-слизовим кандидозом, що призводили до посилення фосфоритування і практичною відсутністю дефосфорилювання гомодимерів STAT1 після транслокації у ядро.

Приклад 2. Хлопчик О., 1999 року народження. Знаходиться під спостереженням з 5 років. З моменту народження - постійний кандидоз порожнини рота, хейліт. Відмічалось тривале загоєння пупкової ранки (протягом 1,5 місяця). Упродовж перших 3 місяців життя відзначалися розріджені випорожнення. Із 3-місячного віку - поширений дерматит. У мікробіологічних мазках із слизової оболонки рота і зі шкіри неодноразово виділено *Candidaalbicans* у великій кількості. У віці 8 місяців переніс поширений афтозний стоматит, у подальшому відмічається рецидивуючий перебіг афтозного стоматиту з рецидивами кожні 3-4 тижні. Афтиасоційовані з вираженим больовим синдромом, виникають переважно на язичку і внутрішній поверхні губ, являють собою рани округлої форми від 0,5 до 1 см у діаметрі, вкриті жовто-білим нашаруванням, тривалістю до загоєння 10-14 днів. Загострення в порожнині рота часто супроводжується діареєю, що відповідає на протигрибкові препарати. З 9-місячного віку протягом 2 років відзначався оніхомікоз, який з рештою був вилікуваний тривалим застосуванням ітраконазолу (протягом року). У подальшому періодично відмічались грибкові ураження нігтів, у віці 2,5 років - пароніхій. Внаслідок повторних епізодів кандидозного езофагіту до віку 5 років сформувалась стриктура стравоходу, що супроводжувалась неможливістю ковтання твердої їжі і утрудненням проходження рідкої. За даними фіброгастродуоденоскопії неодноразово виявлялися бляшки

білого кольору та виразки слизової оболонки стравоходу. У 8 років переніс оперативне лікування з приводу фімозу, що сформувався внаслідок рецидивного баланопоститу. У пацієнта мав місце також поширений дерматомікоз (10 років) у вигляді кільцеподібної висипки діаметром до 10-15 см на шкірі тулуба, плечей, ніг. Зі шкірних уражень були виділені гриби роду *Trichophyton*. Ураження були куповані системним застосуванням гризофульвіну. З віку 12 років - рецидивний синусит, до 6 загострень на рік, при бактеріологічному дослідженні мікрофлори з верхніх дихальних шляхів виділено *Str.pyogenes*, *S.epidermidis*, *S.aureus*. ВІЛ-інфекція та муковісцидоз виключені.

В загальному аналізі крові патологічних змін не виявлено. Імунологічне обстеження, проведене вперше у віці 5 років виявило нормальні рівні сироваткових імуноглобулінів і абсолютної кількості та відносних показників субпопуляцій лімфоцитів.

У віці 10 років було проведене молекулярно-генетичне обстеження на мутації в генах *AIRE* і *CARD9* (кафедра дитячих інфекційних хвороб та клінічної імунології, університет м. Дебрецен), однак мутацій виявлено не було. Після описання мутацій в гені *STAT1* як причини хронічного шкірно-слизового кандидозу у віці 12 років діагностичний пошук був спрямований на пошук мутацій у даному гені. Методом секвенування була виявлена гетерозиготна мутація *C.1154C>T* (*T385M*) в ДНК- в'язучому домені гена *STAT1*. Оскільки раніше повідомлені мутації в ДНК- в'язучому домені були асоційовані із втратою функції білка і зумовлювали підвищену сприйнятливість до мікобактеріальних захворювань, то для підтвердження причинно-наслідкового зв'язку даної мутації із посиленням функції молекули *STAT1* були проведені функціональні тести *in vitro* із стимуляцією клітин пацієнта інтерлейкінами *IFN-γ*, *IFN-β* та *IL-27*, всі з яких активують білок *STAT1*. Стимуляція даними цитокінами приводила до сильнішого фосфоритування білка *STAT1* в екстрактах ядер клітин пацієнта в порівнянні з контролем, демонструючи, що гетерозиготна мутація була асоційована з домінантним фенотипом посилення функції фосфоритування білка *STAT1*. Надмірна активність білка *STAT-1* зумовила посилення відповіді клітин на цитокіни *IFN-α/β*, *IFN-γ* та *IL-27*, які, у свою чергу, пригнічують імунну відповідь, опосередковану *IL-17*. Зниження продукції Т-клітинами *IL-17A*, *IL-17F* та *IL-22* призвело до зниження протигрибкового імунного захисту.

Таким чином, ці клінічні випадки підтверджують гіпотезу, що причиною хронічного шкірно-слизового кандидозу можуть бути дефекти захисту поверхні тіла, опосередковані цитокінами, із яких ключова роль належить *IL-17*. В обох пацієнтів відзначалися порушенням *IL-17*-опосередкованої імунної відповіді, що призвели до розвитку підвищеної чутливості до грибкових інфекцій. В обох пацієнтів захворювання підтверджене генетично. Обом пацієнтам в процесі діагностичного пошуку було проведене виключення ВІЛ-інфекції, а також з метою уточнення діагнозу проведені численні імунологічні обстеження, які не показали нозоспецифічних відхилень, а в одного з пацієнтів взагалі виявилися нормальними.

Таким чином, рецидивний шкірно-слизовий кандидоз може бути одним із проявів інфекційного синдрому у хворих на первинні та вторинні Імунодефіцити і водночас є самостійною нозологічною формою первинного імунодефіциту.

Отже, даний метод розширює діагностичні можливості пошуку імунного дефекту у пацієнтів із рецидивними грибковими інфекціями. Визначення Т-лімфоцитів, що продукують інтерлейкіни 17 та 22 дає можливість подальшого більш цілеспрямованого молекулярно-генетичного обстеження.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики первинного імунодефіциту у пацієнтів із рецидивним шкірно-слизовим кандидозом, що включає застосування скринінгових імунологічних методів: загальний аналіз крові з формулою, кількісне визначення сироваткових імуноглобулінів, тестування на ВІЛ, визначення субпопуляцій лімфоцитів, тест з дигідрородаміном загальновідомими способами шляхом застосування алгоритму обстеження, який **відрізняється** тим, що додатково включає функціональні методи визначення продукції *IL-17A*, *IL-17F* та *IL-22*, що дозволяють виявити ланку ураження імунної системи у пацієнтів, при рутинному імунологічному обстеженні яких не виявлено відхилень.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601