



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118422** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2017 01337</p> <p>(22) Дата подання заявки: 13.02.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2017, Бюл.№ 15</p>	<p>(72) Винахідник(и): Скрипников Петро Миколайович (UA), Поліщук Тетяна Вікторівна (UA), Шликова Оксана Анатоліївна (UA), Шинкевич Вікторія Ігорівна (UA), Кайдашев Ігор Петрович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ДИСБІОЗУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ КАТАРАЛЬНОМУ ГІНГІВІТІ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики дисбіозу при хронічному катаральному гінгівіті у дітей та підлітків включає використання мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції для визначення кількісного співвідношення загальної бактмаси, *Lactobacterium spp.*, *Enterobacterium spp.*, *Streptococcaceae spp.*, *Prevotella spp.*+*Porphyromonas spp.*, *Mycoplasma (hominis+genitalium)*, *Eubacteriaceae spp.*, *Candida spp.* При цьому дослідження проводять у зразку приростеної біоплівки, порівнюють із показниками для інтактних ясен вікової групи та визначають кількісну перевагу, відповідно, умовно-коменсальних, умовно-патогенних, карієсогенних, пародонтопатогенних чи патогенних видів.

UA 118422 U

Корисна модель належить до галузей медицини і стоматології, та може бути використана для діагностики дисбіозу у приясенній біоплівці й обґрунтування вибору пробіотиків в комплексі лікування і профілактики ускладнень.

Наразі доведено, що в етіології та/або патогенезі хронічних запальних процесів ясен та періодонтальної зв'язки беруть участь локальні зміни кількісного і якісного співвідношення мікрофлори у мікробній біоплівці, у безпосередній близькості до locus morbi [Distinguishing the Signals of Gingivitis and Periodontitis in Supragingival Plaque: a Cross-Sectional Cohort Study in Malawi. Shaw L, Harjunmaa U, Doyle R, Mulewa S, Charlie D, Maleta K, Callard R, Walker AS, Balloux F, Ashorn P, Klein N. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Sep 16;82(19):6057-67. doi: 10.1128/AEM.01756-16.]. Розширення показань до застосування пробіотиків для лікування та профілактики хронічного катарального гінгівіту, пародонтиту і карієсу, все ще не є остаточно доведеним і повністю безпечним, та вимагає щонайменше діагностики дисбіозу у біоплівці [Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. Vuotto C, Longo F., Donelli G. *International Journal of Oral Science* (2014) 6, 189-194; doi: 10.1038/ijos.2014.52]. Крім того, хронічний катаральний гінгівіт (ХКГ), у розумінні робочої української класифікації, на основі класифікації Данилевського М.Ф., є досить неоднорідним [П.М. Скрипников, Т.В. Поліщук, О.А. Шликова, В.І. Шинкевич. Застосування препаратів "Лісобакт" та "Лацидофіл@Wm" може підвищувати ефективність комплексного лікування хронічного катарального гінгівіту I-II ступенів тяжкості в дітей віком 12-15 років //Український стоматологічний альманах. 2012. № 5. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/zastosuvannya-preparativ-lisobakt-ta-latsidofil-wm-mozhe-pidvischuvati-efektivnist-kompleksnogo-likuvannya-hronichnogo-kataralnogo> (дата звернення: 12.12.2016)].

Для діагностики дисбіозу взагалі у порожнині рота використовують: метод бактпосіву з визначення колоніє-утворюючих одиниць (КУО) і ідентифікацією бактерій; метод біохімічного визначення співвідношення активності уреазу і лізоциму за Левицьким и др. (2006) [Пат. № 16048 Україна. МПК А61В 5/00. Спосіб оцінки дисбактеріозу порожнини рота /Левицький А.П., Макаренко О.А., Селіванська І.О. та ін. (UA); Інститут стоматології АМН України (UA). - № u200601643; заявл. 17.02.2006; опубл. 17.07.2006, Бюл. № 7]; метод визначення трипсиноподобної активності кревікулярної рідини на основі гідролізу синтетичного пептида N-бензіол-DL-аргінин-2-нафтиламід (BANA); концентрацію неспецифічних нейтральних протеаз, та навіть вимірювання бактеріальної активності за допомогою лазерної проточної цитометрії [Rabinovich O.F. Oral fluid bacteriocidal activity in complex diagnostics of oral disbiosis /O.F. Rabinovich, E.S. Abramova //Stomatologija (Mosk) - 2012. - Vol. 91, N 3. - P.35-37.]. Однак, різні мікроорганізми мають різну здатність, або не здатні взагалі до росту у культуральному середовищі; важливо, що у нативних умовах, тобто у складі біоплівок, бактерії виявляють "іншу поведінку", а саме здатні набувати патогенетичний потенціал та резистентність до антибактерійних засобів і захисних механізмів господаря; метаболіти й ензими можуть мати походження і з бактерій, і з клітин макроорганізму; проточна цитометрія є дороговартісною процедурою.

Методика ПЛР у реальному часі (РЧ-ПЛР), очевидно, є одним з оптимальних на сьогодні способів вивчення нативного складу мікробіоти, на результати якої не впливають культуральні умови, здатність до росту бактерій, концентрації кисню, ендогенних ензимів і т.п.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є "Спосіб використання мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції для визначення пародонтопатогенної флори" [Пат. № 65337 Україна, МПК G01N 33/00. Спосіб використання мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції для визначення пародонтопатогенної флори /І.П. Кайдашев, Л.Е. Весніна, О.А. Шликова та ін. (UA); Вищий державний навчальний заклад України "Українська медична стоматологічна академія" (UA). - № u201100737; заявл.24.01.2011; опубл. 12.12.2011, Бюл. № 23]. Суть способу полягає в тому, що відбирають пробу зі слизової оболонки порожнини рота натщесерце стерильним зондом обертальними рухами, з цієї проби виділяють ДНК і проводять кількісне визначення співвідношень таких показників: загальної бактеріальної маси, *Lactobacillus* spp., *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Gardnerella vaginalis* /*Prevotella bivia*/*Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Mycoplasma genitalium+homnis*, *Candida* spp. за допомогою мультиплексної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Але відсутність критеріїв дисбіозу при хронічному катаральному гінгівіті у дітей та підлітків, трактування отриманих даних, відсутність кількісних показників біоплівки при інтактних яснах, унеможлиблює його застосування з даною метою.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу діагностики дисбіозу при хронічному катаральному гінгівіті у дітей та підлітків на основі обчислення кількісних співвідношень патогенних, умовно-патогенних й коменсальних видів бактерій у зразку приясенної біоплівки, визначених методом РЧ-ПЛР.

Поставлену задачу вирішують використанням мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції для визначення кількісного та якісного співвідношення щонайменше семи бактеріальних видів: *Lactobacterium* spp., *Enterobacterium* spp., *Streptococcaceae* spp., *Prevotella* spp.+*Porphyromonas* spp., *Eubacteridacea* spp., *Micoplasma* (*hominis*+*genitalium*) та *Candida* spp., при цьому, згідно з корисною моделлю, визначення проводять у зразку приясенної зубної біоплівки та порівнюють отримані результати з віковою нормою для інтерпретації.

Заявлений спосіб виконується наступним чином:

Відбирають зразок з поверхні зубів у безпосередній близькості до ясенного краю (найбільш активного запалення) не торкаючись його. Для відбору зразку використовують стерильний мікробраш, або стерильний стоматологічний екскаватор; потім поміщують у мікропробірку типу епандорф із стерильним фізіологічним розчином чи сухо, та протягом години доставляють до лабораторії. З проб виділяють ДНК, у зразках яких проводять якісну та кількісну оцінку і співвідношення 8 показників, які складаються з 7 видів зазначених мікроорганізмів і загальної бактеріальної маси за допомогою набору реагентів "Фемофлор 8" (Виробник: ООО "НПО ДНК-Технология", Росія) методом РЧ-ПЛР. Результати реєструють за допомогою ампліфікатора ДТ-322 (НПО "ДНК-Технология", Москва, Росія); після ампліфікації, програмно обчислюють кількість загальної бактеріальної маси та кожного з видів мікроорганізмів. Порівнюють отримані результати з показниками для здорових ясен (табл. 1).

Таблица 1

Середні кількісні показники представників мікробної приясенної біоплівки при інтактних яснах у осіб 9-15 років

Загальна бактеріальна маса	<i>Lactobacterium</i> spp.	<i>Enterobacterium</i> spp.	<i>Streptococcaceae</i> spp.	<i>Gardnerella</i> + <i>Prevotella</i> + <i>Porphyromonas</i> spp.	<i>Eubacteridacea</i> spp.	<i>Micoplasma</i> (<i>hominis</i> + <i>genitalium</i>)	<i>Candida</i> spp.
1	2	3	4	5	6	1	8
6,38±1,41 5,3/7,9	4,53±1,61 3,4/5,9	5,1±1,4 3,8/6,5	5,34±1,7 4,1/7,3	5,01±2,17 3,6/7,3	3,86±0,92 3,4/4,3 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	3,06±0,92 2,3/3,9 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05	3,4±0,59 2,9/3,8 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05

Примітки:

1. Наведені результати статистичної обробки за Ван-дер-Верденом у вигляді $M \pm \sigma$ - середнє \pm стандартне відхилення; нижній/верхній квантилі дисперсії вибірки.
2. p_{3,4} - порівняння з кількісними показниками у колонках 3, 4.

Загальні закономірності співвідношення між досліджуваними родинами мікроорганізмів при здоровому стані ясен полягають у відносно рівних пропорціях *Streptococcaceae* spp., *Enterobacterium* spp., *Prevotella*+*Porphyromonas* spp. та нижчих - *Eubacteridacea* spp., *Micoplasma* (*hominis*+*genitalium*) та *Candida* spp., округлено 6:5:5:5:5:4:3:3 (табл. 2). У 50 % випадків при інтактних яснах відсутні (або становлять нижче детектуємого рівня) *Micoplasma* (*hominis*+*genitalium*); у 20 % - *Eubacteridacea* spp.

Дослідження зразків приясенної зубної біоплівки при ХКГ у дітей встановили, що кількісні показники загальної бактеріальної маси, так званої нормофлори *Lactobacillus* spp., умовно-патогенних бактерій *Enterobacteriaceae*, та пародонтопатогенних *Prevotella*+*Porphyromonas* spp. у приясенному зубному нальоті достовірно відрізняються від інтактних ясен, і можуть слугувати показниками локального дисбіозу. Кількісний показник *Lactobacillus* spp. достовірно перевищує такий при інтактних яснах (табл. 2), або є нижче детектованого рівня (див. приклади використання). Відносне підвищення пропорції *Streptococcaceae* spp. також має значення в загальному співвідношенні. Округлені співвідношення становлять: 8:6:6:6:6:4:2:3.

Середні кількісні показники представників мікробної пріясенної біоплівки при ХКГ у дітей 9-15 років

Загальна бактеріальна маса	Lactobacterium spp.	Enterobacterium spp.	Streptococcaceae spp.	Gardnerella+Prevotella+Porphyromonas spp.	Eubacteridaceae spp.	Mycoplasma (hominis+genitali urn)	Candida spp.
1	2	3	4	5	6	7	8
7,56±1,05	5,87±0,56	6,22±0,72	6,64±1,27	6,4±1,15	4,4±1,2	2,31±0,83	3,01±1,08

Примітка. Статистична обробка за Ван-дер-Верденом: $M \pm \sigma$ - середнє \pm стандартне відхилення.

Приклад використання 1.

5 Пацієнт № 5, 14 років, чоловічої статі, без супутніх хронічних захворювань, згідно його амбулаторної карти, було встановлено діагноз "хронічний катаральний гінгівіт", відібрано зразок пріясенного зубного нальоту з верхніх фронтальних різців, та проведено діагностику дисбіозу. Отримано такі кількісні показники:

Загальна бактеріальна маса	Lactobacterium spp.	Enterobacterium spp.	Streptococcaceae spp.	Prevotella+Porphyromonas spp.	Eubacteridaceae spp.	Mycoplasma (hominis+genitalium)	Candida spp.
7.4	-	6.0	6.7	6.4	4.6	-	2.4

10 Загальна бактмаса, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae і Prevotella+Porphyromonas spp. виявлені у підвищених пропорціях. Lactobacterium spp. - нижче детектуемого рівня. Результати констатують локальний дисбіоз; обґрунтовують призначення антисептиків для зниження рівнів, зокрема, пародонтопатогенних Prevotella+Porphyromonas spp., та препаратів на основі пробіотичних лактобактерій, після місцевого лікування хронічного гінгівіту та за умов досягнення
15 доброї гігієни порожнини рота.

Приклад використання 2.

20 Пацієнтка № 7, жіночої статі, без супутніх хронічних захворювань, згідно даних її амбулаторної карти, встановлено діагноз "хронічний катаральний гінгівіт", відібрано зразок пріясенного зубного нальоту з верхніх фронтальних різців, та проведено діагностику дисбіозу. Отримані результати подано у таблиці:

Загальна бактеріальна маса	Lactobacterium spp.	Enterobacterium spp.	Streptococcaceae spp.	Prevotella+Porphyromonas spp.	Eubacteridaceae spp.	Mycoplasma (hominis+genitalium)	Candida spp.
5.4	-	5.2	4.0	4.2	-	-	3.0

25 Округлене співвідношення відображає, що умовні патогени Enterobacterium spp. не врівноважені іншими видами, що свідчить про дисбіоз. Lactobacterium spp. не виявлено, що може обґрунтовувати перспективу використання пробіотичних лактобактерій, після місцевого лікування хронічного гінгівіту і досягнення доброї гігієни порожнини рота.

30 Діагностика дисбіозу при хронічному катаральному гінгівіті є досить специфічною, чутливою, інформативною. Дозволяє об'єктивно обґрунтовувати вибір антибіотичних препаратів при виявленні підвищених кількісних показників пародонтопатогенних видів, і пробіотиків та/або пребіотиків - при недоліку нормофлори, й проводити моніторинг лікування.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб діагностики дисбіозу при хронічному катаральному гінгівіті у дітей та підлітків, що включає використання мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції для визначення
- 5 кількісного співвідношення загальної бактмаси, *Lactobacterium* spp., *Enterobacterium* spp., *Streptococcaceae* spp., *Prevotella* spp.+*Porphyromonas* spp., *Mycoplasma* (*hominis*+*genitalium*), *Eubacteriaceae* spp., *Candida* spp., який **відрізняється** тим, що дослідження проводять у зразку
- 10 приросткової біоплівки, порівнюють із показниками для інтактних ясен вікової групи та визначають кількісну перевагу, відповідно, умовно-коменсальних, умовно-патогенних, карієсогенних, пародонтопатогенних чи патогенних видів.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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