



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **137583** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 04234	(72) Винахідник(и): Лобань Галина Андріївна (UA), Фаустова Марія Олексіївна (UA), Ананьєва Майя Миколаївна (UA), Басараб Ярослав Олексійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.04.2019	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.10.2019	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.10.2019, Бюл.№ 20	(73) Власник(и): УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ, вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ K. KRISTINAE НА РОЗВИТОК ПЕРИІМПЛАНТАТНОГО МУКОЗИТУ

(57) Реферат:

Спосіб визначення факторів патогенності клінічних штамів K. Kristinae на розвиток періімплантатного мукозиту включає виділення, культивування, зараження клітин периферійної крові людини і оцінку результатів. Адгезію мікроорганізмів визначають на формалізованих еритроцитах людини групи крові O(1)Rh+ за методикою Бріліса. Адгезивні властивості оцінюють за допомогою індексу адгезивності мікроорганізмів (IAM) шляхом підрахунку середньої кількості мікробних клітин, що прикріпилися до одного еритроциту, який приймає участь у адгезивному процесі. Адгезивність вважається нульовою при IAM нижче 1,75, низькою - при IAM від 1,76 до 2,5, середньою - від 2,51 до 4,0, високою - вище 4,0.

UA 137583 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології та стоматології, та може бути використана для профілактики та лікування періімплантатних мукозитів.

За сучасними даними представники нормальної мікрофлори порожнини рота налічують понад 700 видів, половина з яких не підлягають культивуванню. Новітні дослідження з використанням молекулярно-біологічних методів, електронної мікроскопії та культивування бактерій дозволили припустити, що в патогенезі хвороб порожнини рота можуть брати участь невідомі до цього часу збудники.

Так, згідно з дослідженнями Szczerba I., бактерії роду *Kosciusia* зустрічаються на шкірних покривах та слизових оболонках у 81,3 % здорового населення. При цьому частіше штами вказаних мікроорганізмів виділялися з порожнини рота (48,7 %). Останнім часом все частіше з'являються дані, що вказують на зв'язок умовно-патогенних *Kosciusia* spp. з розвитком менінгіту, ендокардиту, холециститу та остеомієліту у осіб з імунодефіцитами. Особливу увагу звертають на можливість виникнення бактерій та сепсису, причиною яких можуть бути представники цього роду.

Безперечно, етіопатогенетичним чинником ПІМ та ПІ є формування бактеріальних біоплівочок умовно-патогенними мікроорганізмами на поверхнях встановлених імплантатів. Однак, небактеріальні фактори розвитку ускладнень одонтоімплантації, такі як поломка імплантату чи потрапляння цементу під слизову оболонку в ділянці імплантації, створюють передумови до формування патогенної мікробіоти з наступним розвитком інфекційно-запальних процесів. Саме тому, вивчення перебігу запальних процесів навколо встановлених імплантатів, враховуючи особливості адгезивності та біоплівкоутворення їх домінуючих збудників, сприяє перегляду та вдосконаленню до сьогодні відомих консервативних та хірургічних методів лікування даних захворювань, а також профілактиці їх розвитку.

Серед тих, що відомі, є спосіб моделювання *in vitro* мікробіомів ротової порожнини для визначення факторів вірулентності пародонтопатогенних мікроорганізмів, що включає використання моделі твердої тканини зуба, який відрізняється тим, що у пробірці розміщують рідке середовище з факторами росту або антимікробними засобами, тверду фазу у вигляді розрізаного вздовж зуба людини, на котрому спіралью фіксують нитку колагену, фазу з тканини печінки та створюють анаеробні умови для культивування шляхом внесення розплавленого парафіну на поверхню середовища з наступним дослідженням факторів вірулентності пародонтопатогенних мікроорганізмів, наприклад активності колагенази, гемолізинів, лецитинази (патент України на корисну модель № 109350, МПК G09B 23/28. СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ МІКРОБІОМІВ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ *IN VITRO* ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРІВ ВІРУЛЕНТНОСТІ ПАРОДОНТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ / Смоляр Ніна Іванівна (UA); Корнійчук Олена Петрівна (UA); Федечко Йосип Михайлович (UA); Дацко Василь Андрійович (UA); заявник та патентовласник: ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA). - № u201601289; Заяв. 15.02.2016; Опубл. 25.08.2016, бюл. № 16/2016).

Найбільш близьким аналогом корисної моделі є спосіб визначення факторів патогенності штамів *F.tularensis in vitro*, що включає виділення, культивування, зараження клітин периферійної крові людини і оцінку результатів, який відрізняється тим, що культивують виділений із периферійної крові людини пул лейкоцитів, вміщуючий основні типи клітин запалення та імунної системи, клітини заражають безпосередньо після виділення, співкультивують зі збудником протягом 2-24 годин, препарати фіксують і фарбують різними барвниками, визначають клітини-мішені, а характер і ступінь цитопатичних змін встановлюють по прискоренню і посиленню інтенсивності розвитку апоптозу нейтрофілів, деструкції моноцитів-макрофагів, наявності цитоскелетів мононуклеарних фагоцитів (патент України на корисну модель № 37715, МПК G01N 33/53 (2006.01), C12Q 1/00. СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ ШТАМІВ *F.TULARENSIS IN VITRO* / Стопчанська Алла Григорівна (UA); Пархоменко Наталія Борисівна (UA); Пилипенко Наталія Василівна (UA); Джуртубаева Галина Миколаївна (UA); Костюченко Людмила Сергіївна (UA); заявник та патентовласник: УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА, вул. Церковна, 2/4, м. Одеса, 65003 (UA). - № 200807308; Заяв. 27.05.2008; Опубл. 10.12.2008, бюл. № 23/2008).

В основу корисної моделі поставлена задача вивчення адгезивних та біоплівкоутворюючих властивостей клінічних штамів *K. Kristinae*, виділених від пацієнтів з періімплантатними мукозитами.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення факторів патогенності клінічних штамів *K. Kristinae* на розвиток періімплантатного мукозиту, що включає виділення, культивування, зараження клітин периферійної крові людини і оцінку результатів, згідно з

корисною моделлю, адгезію мікроорганізмів визначають на формалізованих еритроцитах людини групи крові O (1) Rh+ за методикою Бріліса, адгезивні властивості оцінюють за допомогою індексу адгезивності мікроорганізмів (IAM) шляхом підрахунку середньої кількості мікробних клітин, що прикріпилися до одного еритроциту, який приймає участь у адгезивному процесі, адгезивність вважається нульовою при IAM нижче 1,75, низькою - при IAM від 1,76 до 2,5, середньою - від 2,51 до 4,0, високою - вище 4,0.

Згідно з корисною моделлю, вивчення біоплівкоутворюючих властивостей клінічних ізолятів *K. Kristinae* визначають за допомогою спектрофотометричного методу за G.D. Christensen (MtP-test "microtiter plate test"), біоплівки відтворюють в лунках стерильного плоскодонного 96-лункового полістеролового планшету (Corning, США) та забарвлюють 1 %-м розчином кристалічного фіолетового, властивості мікроорганізмів утворювати біоплівки оцінюють за ступенем поглинання барвника в одиницях щільності (ОЩ) за допомогою спектрофотометра (570 нм), здатність мікроорганізмів до утворення біоплівок при (ОЩ<0,120) оцінюють як низьку, середню (ОЩ = 0,121-0,239) та високу (ОЩ>0,240).

При цьому статистичний аналіз отриманих результатів здійснюють за допомогою стандартних пакетів програм "STATISTICA+" та "Microsoft Excel 2010", для визначення наявності зв'язку між адгезивністю та біоплівкоутворенням штамів *K. Kristinae* визначають коефіцієнт кореляції (r-Пірсона), абсолютною величиною якого характеризують силу зв'язку.

Обстеження проводили на 20 пацієнтах середньої вікової групи за ВООЗ (середній вік 48±4 років) з включеними дефектами зубних рядів у боковій ділянці, яким встановлено від 1 до 4 розбірних титанових імплантатів та за результатами клінічних і рентгенологічних методів діагностовано періімплантатний мукозит. Для вивчення аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори виконували забір матеріалу з періімплантатної кишені за допомогою стерильного паперового ендодонтичного штифта стандартного розміру (№ 30), довжиною 1 см, з подальшим культивуванням та ідентифікацією. Заключна ідентифікація проводилась за допомогою автоматичного бактеріологічного аналізатора Vitec-2compact bioMerieux (Франція).

Об'єктом дослідження стали 18 клінічних штамів *K. Kristinae*, виділені від обстежених хворих.

Результатами дослідження доведено етіологічне значення умовно-патогенних мікроорганізмів *Kosugia* spp., що колонізували слизові оболонки періімплантатної ділянки, у розвитку періімплантатного мукозиту. Так, представників даного роду виділяли у 70 % пацієнтів. Загальна частка клінічних ізолятів *Kosugia* spp. серед всіх виділених мікроорганізмів сягала 18,3 %.

Представники виду *K. Kristinae* проявили високу здатність до адгезії на еритроцитах. Оскільки їх IAM складав 4,11±0,53. При чому частка еритроцитів, що прийняли участь у адгезивному процесі (61,67±7,63 %) була досить високою і перевищувала половину досліджених.

Встановлено, що клінічні штами *K. Kristinae*, що колонізують періімплантатну ділянку за умов періімплантатного мукозиту, мали високі властивості утворювати біоплівки. Оптичні щільності біоплівок даних мікроорганізмів становили 0,241±0,09 ОЩ протягом 24 годин та 0,267±0,08 ОЩ на другу добу культивування.

Коефіцієнт r-Пірсона (+0,87) між адгезією та здатністю утворювати біоплівки штамів *K. Kristinae* вказував на наявність прямої кореляційної залежності. Тобто, зі збільшенням IAM даних мікроорганізмів зростала їх здатність утворювати біоплівки.

На графічному зображенні показано кореляцію IAM та біоплівкоутворення клінічних штамів *K. Kristinae* (n=18).

Наявність специфічних протеїнів на поверхні бактеріальних клітин даних збудників, подібно іншим грампозитивним патогенам, обумовлює специфічне рецепторне з'єднання з клітинами організму людини, ініціюючи колонізацію тканин макроорганізму та біоплівкоутворення на їх поверхнях. Тому високий показник адгезивності та здатності утворювати біоплівки є досить закономірним для представників *Kosugia* spp.

Отримані дані розширяють уявлення про їх властивості та роль у розвитку бляшкоасоційованих захворювань порожнини рота, у тому числі періімплантатних мукозитів, та сприяють перегляду тактики їх профілактики та лікування, враховуючи особливості домінуючої мікрофлори.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення факторів патогенності клінічних штамів *K. Kristinae* на розвиток періімплантатного мукозиту, що включає виділення, культивування, зараження клітин периферійної крові людини і оцінку результатів, який **відрізняється** тим, що адгезію

мікроорганізмів визначають на формалізованих еритроцитах людини групи крові O(1)Rh+ за методикою Бріліса, адгезивні властивості оцінюють за допомогою індексу адгезивності мікроорганізмів (IAM) шляхом підрахунку середньої кількості мікробних клітин, що прикріпилися до одного еритроциту, який приймає участь у адгезивному процесі, адгезивність вважається нульовою при IAM нижче 1,75, низькою - при IAM від 1,76 до 2,5, середньою - від 2,51 до 4,0, високою - вище 4,0.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вивчення біоплівкоутворюючих властивостей клінічних ізолятів *K. Kristinae* визначають за допомогою спектрофотометричного методу за G.D. Christensen (MtP-test "microtiter plate test"), біоплівки відтворюють в лунках стерильного плоскодонного 96-лункового полістеролового планшета (Corning, США) та забарвлюють 1 %-м розчином кристалічного фіолетового, властивості мікроорганізмів утворювати біоплівки оцінюють за ступенем поглинання барвника в одиницях щільності (ОЩ) за допомогою спектрофотометра (570 нм), здатність мікроорганізмів до утворення біоплівок при (ОЩ<0,120) оцінюють як низьку, середню (ОЩ=0,121-0,239) та високу (ОЩ>0,240).

3. Спосіб за будь-яким з пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що статистичний аналіз отриманих результатів здійснюють за допомогою стандартних пакетів програм "STATISTICA+" та "Microsoft Excel 2010", для визначення наявності зв'язку між адгезивністю та біоплівкоутворенням штамів *K. Kristinae* визначають коефіцієнт кореляції (r-Пірсона), абсолютною величиною якого характеризують силу зв'язку.



Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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