



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85265** (13) **U**
(51) МПК
A61B 1/24 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|---|
| <p>(21) Номер заявки: u 2013 07388</p> <p>(22) Дата подання заявки: 11.06.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.11.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.11.2013, Бюл.№ 21</p> | <p>(72) Винахідник(и): Силенко Юрій Іванович (UA), Перепелова Тетяна Василівна (UA), Хребор Марина Вікторівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): Силенко Юрій Іванович, вул. Тернова, 8, м. Полтава, 36034 (UA), Перепелова Тетяна Василівна, пров. Продмашевський, 10, м. Полтава, 36042 (UA), Хребор Марина Вікторівна, вул. Вільхова, 15, м. Полтава, 36034 (UA)</p> |
|--|---|

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ДИСБІОЗУ ПОРОЖНИНИ РОТА ПРИ ГАЛЬВАНОЗІ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики дисбіозу порожнини рота при гальванозі включає вимірювання рН ротової рідини індикаторним папером з рН 5,2-7,4, оцінку інтенсивності електрохімічних процесів у порожнині рота, забір матеріалу з порожнини рота та з дорсальної поверхні язика, визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори. Визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори виконують шляхом визначення загальної бактеріальної маси, кількісних співвідношень: *Lactobacterium* spp., сумарних *Enterobacterium* spp., *Streptococcaceae* spp., *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Eubacteriaceae* spp., *Mycoplasma (hominis+genitalium)* та *Candida* spp. методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу за допомогою комплекту реагентів "Фемофлор 8".

UA 85265 U

Корисна модель належить до галузі медицини, до ортопедичної стоматології, та може бути використана для діагностики дисбіозу (дисбактеріозу) порожнини рота при гальванозі.

Порожнина рота - мікроекосистема, відкрита для найрізноманітніших мікроорганізмів, вона заселена великою кількістю (близько 700) різних мікроорганізмів, в якій зовнішні фактори, взаємодіючи з внутрішніми, перебувають у динамічній рівновазі, утворюючи мікробіоценоз (Лобань Г.А., Федорченко В.І. Нормальна мікрофлора порожнини рота та її роль //Укр. стомат. альманах - 2003.- № 2 - С. 31-35; Е.А. Мартинова з співавт., 2008, Jenkinson H., Lament R., 2005, Eriksen H. et al., 2006).

Під впливом різноманітних факторів склад мікрофлори порожнини рота може змінюватися, що призводить до розвитку дисбіозу (дисбактеріозу).

Дисбіоз - це мікроекологічні порушення складу та функцій нормальної мікрофлори, що характеризується зміною співвідношення представників нормальної та патогенної мікрофлори, зникненням деяких мікроорганізмів за рахунок збільшення кількості інших, появою мікробів, які зазвичай зустрічаються в незначній кількості або зовсім не визначаються. Порушення мікроекології (дисбіози) відіграють істотну роль у патогенезі захворювань, у тому числі стоматологічних. Дисбіотичний стан в порожнині рота характеризується змінами слизової оболонки у вигляді її почервоніння, набряку, ділянок десквамації, появи нальоту, особливо на дорсальній поверхні язика, що призводить до загострення і хронічного перебігу карієсу, виразкового гінгівіту, пародонтиту, стоматиту та інших стоматологічних захворювань (Боровський Є.В., 2001). Всі стоматологічні захворювання виникають на тлі дисбіозу порожнини рота, що ускладнює їх діагностику та лікування (Грудянов А.І. і співавт., 2000).

Гальваноз - найбільш поширена патологія, спричинена електрохімічними процесами між різнорідними металами зубних протезів в умовах порожнини рота. Термін "гальваноз" використовується в клінічній стоматології для визначення комплексу патологічних клінічних симптомів, пов'язаних з появою в порожнині рота індукованих гальванічних струмів при наявності металевих ортопедичних конструкцій. Слина служить провідником електричного струму, який виникає в результаті перетворення хімічної енергії окисно-відновних реакції в електричну (Лебедев К. А., 2010 и др.).

У пацієнтів, що мають у порожнині рота металічні ортопедичні конструкції, на фоні гальванозу, виникає ризик розвитку дисбіозу (дисбактеріозу) порожнини рота. Причинами такого стану є: дія гальванічного струму і вплив продуктів корозії металів зубних протезів (Lalor P. A., 1991; Yamataka S., 2002). Маючи низьку молекулярну вагу, більшість компонентів металевих сплавів, виступаючи в ролі гаптенів і утворюючи повноцінні антигени, здатні індукувати сенсibiliзацію організму за типом контактних дерматитів, стоматитів, хейлітів, глоситів. Ці процеси призводять до зміни мікробіоценозу в порожнині рота в сторону зміни як видового біотопу, так і збільшення транзиторної мікрофлори (Глазунов О. А., Кравец Т. П., 2012), гіпосаливація, зниження рівня місцевого імунітету та системного імунітету (Кириллова Л.А., 2004), пошкодження клітинних структур і, в першу чергу цитоплазмових і лізосомних мембрани (Арунов Т. І., Вавілова Т. П., Гожая Л. Д., 2010). На фоні орального дисбіозу досить легко відбувається розвиток патологічних процесів у ротовій порожнині (Гожая Л.Д. Зубной протез и дисбактериоз / Л.Д. Гожая. М, 2004. - С 30-31).

Для діагностики дисбактеріозу ротової порожнини існують різні методи, головним чином, мікробіологічні, в яких виконують посіви ротової рідини на елективні поживні середовища, в яких компоненти підібрані таким чином, що забезпечують перевагу у розвитку певного виду або групи близьких видів мікроорганізмів, та несприятливі для інших видів, з наступним підрахунком кількості колоній.

Відомі способи діагностики дисбіозу порожнини рота (Александров М.Т. и др. Проблема диагностики анаэробной инфекции и дисбактериоза в клинической стоматологии //Вестник РАМН -1999-№ 12 - С. 13-18; Александров М.Т. и др.; Применение лазерной флуоресценции для оценки гигиенического состояния полости рта //Вестник РАМН -2003. - № 9.-С.39-44, що полягають у визначенні пробіотичної анаеробної мікрофлори ротової порожнини, з використанням флуоресцентних методів; Червінець В.М., Гаврилова О.А. та ін. Пріоритетна довідка № 2009129208 (040645) від 30.07.2009, що полягає у визначенні протеїнолітичної активності мікроорганізмів у ротовій порожнині, з висіванням зразку ротової рідини на казеїнове живильне середовище, з наступною інкубацією при t° 35-37 $^{\circ}$ С протягом 6-18 годин, реакція виявляється шляхом внесення на агар розчину Результати оцінюють за розміром діаметра зон просвітління; Пат. 70709 А, МПК А61В 1/24, G01N 1/28. Спосіб експрес-діагностики дисбактеріозу ротової порожнини/ Васишин У.Р., Рожко М.М., Никифорчин Р.М., Куцик Р.В. (UA). - № 20031212280; заявл. 24.12.2003; опубл. 15.10.2004, бюл. № 10, шляхом оцінки ступеня дисбактеріозу ротової порожнини за підрахунком кількості колонізованих на поверхні слизової

оболонки ротової порожнини грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів зафарбованих методом Грама і встановлення їх співвідношення.; Пат. 16048, МПК А61В 5/00. Спосіб оцінки дисбактеріозу порожнини рота/ Левицький А.П.,Макаренко О.А., Селіванська І.О., Деньга О.В., Почтар В.М., Гончарук С.В. (UA). - № u200601643; заявл. 17.02.2006; опубл. 17.07.2006, бюл. № 7, заснований на визначенні активності ферменту уреазу в ротовій рідині з визначенням вмісту лізоциму та розрахуванням відносної активності уреазу і відносного вмісту лізоциму в порівнянні з відповідними показниками у здорових людей, знаходженні співвідношення уреазу й лізоциму, у разі, якщо воно перевищує одиницю, то це свідчить про наявність дисбактеріозу, ступінь якого корелює з величиною співвідношення уреазу/лізоцим.

Проте відомі способи діагностики дисбіозу не враховують стану мікрофлори ротової порожнини у пацієнтів, з металічними конструкціями зубних протезів при гальванозі. При цьому основна частина результатів, отримана культуральними методами, дані яких залежали від умов культивування та здатності збудника рости за цих умов. Окремі результати щодо характеристик мікрофлори отримувались за допомогою оцінки на основі ферментативних властивостей, які можуть залежати від багатьох чинників.

Найбільш близьким аналогом є спосіб діагностики дисбактеріозу ротової порожнини при гальванозі у пацієнтів, з металічними конструкціями зубних протезів (Глазунов О. А., Кравец Т. П. Дисбиоз полости рта при непереносимости металлических сплавов зубных протезов /Дентальные технологии.-2012. - № 3, 4 (50-51), що включає вимірювання рН ротової рідини індикаторним папером з рН 5,2-7,4, оцінку інтенсивності електрохімічних процесів у порожнині рота гальванометром, забір матеріалу порожнини рота та з дорсальної поверхні язика, посів на поживні середовища - Ендо, Сабуро, жовтковосольовий - ЖСА, 5 % кров'яний агар - КА, інкубацію в термостаті протягом 18 годин (Ендо, КА), 48 годин (ЖСА), 5 діб (Сабуро), підрахунок та вивчення кількісного та якісного складу колоній, з наступним обчисленням математичним методом з обчисленням критерію Стьюдента.

Однак відомий спосіб трудомісткий і складний у виконанні, потребує багато часу для одержання результату, крім того, має місце суб'єктивізм і залежність від професійної кваліфікації лікаря клінічної лабораторної діагностики.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі, шляхом удосконалення відомого, досягти розширення діагностичних можливостей виявлення дисбіотичних порушень у порожнині рота при гальванозі за рахунок спрощення та скорочення затрат часу на процес визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори, забезпечити підвищення ступеню достовірності та ефективності діагностики за рахунок виключення суб'єктивізму та залежності від професійної кваліфікації лікаря клінічної лабораторної діагностики.

Поставлену задачу вирішують створенням способу діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі, що включає вимірювання рН ротової рідини індикаторним папером з рН 5,2-7,4, оцінку інтенсивності електрохімічних процесів у порожнині рота, забір матеріалу порожнини рота та з дорсальної поверхні язика, визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори, згідно з корисною моделлю, визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори виконують шляхом визначення загальної бактеріальної маси, кількісних співвідношень: *Lactobacterium spp.*, сумарних *Enterobacterium spp.*, *Streptococcaceae spp.*, *Gardnerella spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Eubacteriaceae spp.*, *Mycoplasma (hominis+genitalium)*, та *Candida spp.* методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу за допомогою комплексу реагентів "Фемофлор 8" (ООО "НПО ДНК-Технология", Росія, РУ ФСР 2009/04663).

Дисбіотичні процеси характеризуються порушенням кількісних співвідношень нормальної та умовно патогенної мікрофлори. Метод ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу дозволяє проводити багатофакторний кількісний аналіз умовно патогенної мікрофлори. Набір реагентів "Фемофлор 8" (ООО "НПО ДНК-Технология", Росія, РУ ФСР 2009/04663) включає: суміш для ПЛР ампліфікації, специфічну для всіх бактерій (для визначення загальної бактеріальної маси), суміш, специфічну для нормофлори (*Lactobacillus spp.*) і суміші, специфічні для умовно-патогенних мікроорганізмів. Безсумнівною перевагою методу ПЛР у реальному часі є його надзвичайна чутливість і швидкість. У середньому для проведення аналізу біологічного матеріалу методом ПЛР необхідно від 2-х до 4-х годин. Надзвичайна чутливість методу дозволяє фахівцям гарантовано виявляти поодинокі збудники в біологічному матеріалі на основі їх генетичної інформації.

Запропонований спосіб діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі здійснюють наступним чином.

Після збору анамнезу виконують вимірювання рН ротової рідини індикаторним папером з рН 5,2-7,4, оцінку інтенсивності електрохімічних процесів у порожнині рота вимірювання гальванометром, забір матеріалу порожнини рота та з дорсальної поверхні язика. Перед забором матеріалу порожнини рота проводять ретельне трикратне полоскання порожнини рота фізіологічним розчином. Забір матеріалу для проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу здійснюють за допомогою спеціальних одноразових стерильних зондів типу Cervex brush або Voba-brush, що мають вигляд йоржика і забезпечують отримання великої кількості клітинного матеріалу з досліджуваної ділянки, або за допомогою стерильного екскаватора/гладилки. Після забору матеріалу зонд опускають в пластикову пробірку, що містить 100 мкл стерильного фізіологічного розчину, ретельно перемішують, залишки рідини на зонді віджимають об стінки пробірки, зонд витягують (викидають у контейнер з дезінфікуючим розчином), а приготувану таким чином пробу із стерильним фізіологічним розчином, протягом години передають в лабораторію.

Визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори проводять у лабораторних умовах методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (РЧПЛР) за допомогою комплексу реагентів "Фемофлор 8" (ООО "НПО ДНК-Технологія", Росія, РУ ФСР 2009/04663) відповідно до інструкції виробника. Після проходження ампліфікації результати реєструють за допомогою детектуючого ампліфікатора ДТ-322 (НПО "ДНК-Технологія", Росія), програмно обчислюють кількості ген-копій за показником індикаторного циклу; кількісні результати відображають у десяткових логарифмах. Визначають загальну бактеріальну масу, кількісні співвідношення: *Lactobacterium* spp., сумарних *Enterobacterium* spp., *Streptococcaceae* spp., *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Eubacteriaceae* spp., *Mycoplasma*(*hominis*+*genitalium*), та *Candida* spp. При використанні тесту Фемофлор® основним критерієм дисбіотичних порушень є співвідношення кількості *Lactobacillus* spp. і кожного з умовно патогенних мікроорганізмів, автоматично розраховується програмним забезпеченням.

Приклад

Пацієнтка М., 40 років, звернулася до клініки зі скаргами на сухість слизової оболонки порожнини рота, кислий присмак, відчуття печіння в області язика, яке підсилюється під час їжі. Зазначені симптоми з'явилися після протезування, проведеного 1,5 роки тому.

Після збору анамнезу було проведено обстеження запропонованим способом діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі: було виконано вимірювання рН ротової рідини індикаторним папером з рН 5,2-7,4, - незначний зсув рН у кислу сторону (6,8); проведено вимірювання інтенсивності електрохімічних процесів у порожнині рота: 90 мв. Найбільш високі показники різниці електрохімічних потенціалів відзначені в області краю металевого каркасу коронки - 90 мв, при нормі(74-80 мв). В результаті обстеження було поставлено діагноз: стан після протезування - часткова вторинна адентія, на верхній щелепі 2 класу Кеннеді, 2 підклас, на нижній щелепі 1 клас, 1 підклас. Порушення герметизації крайового прилягання опірної коронки з руйнуванням фіксуючого шару цементу, розцементування коронки, гальваноз порожнини рота, з ознаками дисбіозу порожнини рота.

Було виконаний забір матеріалу для проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу за допомогою спеціального одноразового стерильного зонду типу Cervex brush, у вигляді йоржика. Перед забором матеріалу порожнини рота проведено ретельне трикратне полоскання порожнини рота фізіологічним розчином. Після забору матеріалу зонд помістили у пластикову пробірку, що містить 100 мкл стерильного фізіологічного розчину, ретельно перемішували, залишки рідини на зонді віджимали об стінки пробірки, приготувану таким чином пробу із стерильним фізіологічним розчином, одразу передали в лабораторію для визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (РЧПЛР) за допомогою комплексу реагентів "Фемофлор 8" (ООО "НПО ДНК-Технологія", Росія, РУ ФСР 2009/04663). Визначали загальну бактеріальну масу, кількісні співвідношення: *Lactobacterium* spp., сумарних *Enterobacterium* spp., *Streptococcaceae* spp., *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Eubacteriaceae* spp., *Mycoplasma*(*hominis*+*genitalium*), та *Candida* spp. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою стандартного пакету програм "STATISTICA 6.0 for Windows" (StatSoft Inc., США). Використовували непараметричні методи: критерій Вілкоксона та Вандер-Вердена, R-критерій рангової кореляції Спірмена.

Дослідження проводилося на базі кафедри післядипломної освіти лікарів-стоматологів ВДНЗУ "УМСА", та Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Української медичної стоматологічної академії, м. Полтава. Результат проведеної мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу

показав зміну мікробного пейзажу в бік появи переважно умовно - патогенної мікрофлори (*Lactobacillus* spp. 20 %) та значне зростання грибів *Candida*, що свідчить про вплив подразнюючої електрогальванічної дії на мікроекосистему порожнини рота, а саме про наявність дисбіозу порожнини рота на тлі гальванозу.

5 Запропонованим способом діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі було обстежено 17 пацієнтів.

Результат обстежень запропонованим способом діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (РЧПЛР) за допомогою комплексу реагентів "Фемофлор 8" (ООО "НПО ДНК-Технологія", Росія, РУ ФСР 2009/04663), дозволяє зробити висновки, що у ротовій порожнині при гальванозі відмічаються різні клінічні прояви на слизовій оболонці порожнини рота та зміни мікробного пейзажу у бік появи переважно умовно патогенної мікрофлори і грибів роду *Candida* в різних комбінаціях. Кількісні показники загальної бактеріальної маси, *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp. достовірно

10

15 перевищували показники за фізіологічних умов, тому можуть служити критеріями діагностики дисбіозу порожнини рота. Ступінь тяжкості дисбіозу ротової порожнини не завжди корелює з силою струму при гальванозі.

Запропонований спосіб діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі шляхом визначення загальної бактеріальної маси, кількісних співвідношень: *Lactobacterium* spp., сумарних *Enterobacterium* spp., *Streptococcaceae* spp., *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Eubacteridaceae* spp., *Mycoplasma (hominis+genitalium)*, та *Candida* spp. методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу за допомогою комплексу реагентів "Фемофлор 8" (ООО "НПО ДНК-Технологія", Росія, РУ ФСР 2009/04663), дозволяє проводити багатofакторний кількісний аналіз мікрофлори порожнини рота по числу ген-копій мікроорганізмів, що є новим підходом до діагностики стану порожнини рота.

20

25

Запропонований спосіб діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі має суттєві переваги у порівнянні зі способом-прототипом, більш простий у виконанні, найбільш інформативний, відповідає поставленій задачі, дозволяє досягти розширення діагностичних

30

можливостей виявлення дисбіотичних порушень у порожнині рота при гальванозі та забезпечує підвищення ступеню достовірності та ефективності діагностики дисбіозу порожнини рота при гальванозі.

Запропонований спосіб діагностики дисбіозу ротової порожнини при гальванозі апробований і впроваджений на кафедрі пропедевтики ортопедичної стоматології ВДНЗУ УМСА, і може бути

35

рекомендований для використання у стоматологічній практиці для діагностики дисбіозу порожнини рота при гальванозі.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

40 Спосіб діагностики дисбіозу порожнини рота при гальванозі, що включає вимірювання рН ротової рідини індикаторним папером з рН 5,2-7,4, оцінку інтенсивності електрохімічних процесів у порожнині рота, забір матеріалу з порожнини рота та з дорсальної поверхні язика, визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори, який **відрізняється**

45

тим, що визначення співвідношення нормальної та умовно патогенної мікрофлори виконують шляхом визначення загальної бактеріальної маси, кількісних співвідношень: *Lactobacterium* spp., сумарних *Enterobacterium* spp., *Streptococcaceae* spp., *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Eubacteridaceae* spp., *Mycoplasma (hominis+genitalium)* та *Candida* spp. методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу за допомогою комплексу реагентів "Фемофлор 8".

50

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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

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