



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **65337** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРОДОНТОПАТОГЕННОЇ ФЛОРИ**

1

2

(21) u201100737

(22) 24.01.2011

(24) 12.12.2011

(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.

(72) КАЙДАШЕВ ІГОР ПЕТРОВИЧ, ВЕСНІНА ЛЮДМИЛА ЕДУАРДІВНА, ШЛИКОВА ОКСАНА АНАТОЛІЙВНА, ІЗМАЙЛОВА ОЛЬГА ВАТАЛІЙВНА, БОБРОВА НЕЛЛЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

(73) ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ"

(57) Спосіб використання мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції для визначення наявності та співвідношення окремих мікроорганізмів, який **відрізняється** тим, що визначення проводять в порожнині рота, як мікроорганізми визначають - *Lactobacillus* spp./BK, *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/**Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Mycoplasma genitalium+hominis*, *Candida* spp., а полімеразну ланцюгову реакцію проводять в режимі реального часу.

Корисна модель належить до медицини, а саме до стоматології, лабораторної діагностики, і може бути використана для визначення складу мікрофлори порожнини рота з метою ранньої діагностики та профілактики не тільки захворювань пародонту, а також аутоінфекційних процесів та дисбактеріозів, що важко усуваються.

Дослідження останніх десятиліть показали, що порушення кількісного та якісного складу мікрофлори порожнини рота призводить не тільки до розвитку інфекцій органів ротової порожнини, пародонтиту, а і є чинниками розвитку різноманітних патологічних станів. Виявлено, що розвиток клінічно вираженого важкого пародонтиту у молодих осіб може відображати субклінічний перебіг атеросклерозу коронарних артерій (Sever periodontitis in young adults is associated with sub-clinical atherosclerosis/ Cairo F, Castellani S, Gori AM, Nieri M, Baldelli G, Abbate R, Pini-Prato GP.//2008 - 35 (6): 465-472). Показано, що інфекції органів ротової порожнини, пародонтит є чинниками розвитку ендотеліальної дисфункції пацієнтів з ішемічною хворобою серця (Oral infection - inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease./ Y. Higashi, C. Goto, T. Hidaka, J. Soga, S. Nakamura, Y.Fujii, T.Hata, N. Idei, N. Fujimura, K. Chayama// Atherosclerosis, 2009 - 206(2), P. 604-610).

Традиційно визначення мікрофлори порожнини рота базується на методах мікроскопії нативних (фазовоконтрастна або темнопольова) та забарвлених позитивно та негативно (світлова імерсійна)

препаратів. Методи визначення мікрофлори порожнини рота, якими користуються сьогодні досить складні, трудомісткі, вимагають багато часу, викликають проблеми зі збереженням та транспортуванням біологічних зразків.

До аналогів способу, що заявляється, можна віднести метод визначення мікрофлори, суть якого полягає в визначенні складу мікроорганізмів порожнини рота за допомогою бактеріоскопічного та бактеріологічного методів досліджень («Мікрофлора патологических очагов у больных с одонтогенными абсцессами и флегмонами, отягощенными наркоманией» А.А.Тимофеев, А.В. Дакал - Современная стоматология.-2009.-№3.-С.91-95). Однак, даний метод не дозволяє ідентифікувати деякі окремі види мікроорганізмів, провести їх точний якісний та кількісний аналіз. Тому направленість досліджень повинна бути спрямована на пошук та розробку точних критеріїв діагностики патологічних змін мікрофлори порожнини рота.

Найбільш близьким до запропонованого є «Спосіб діагностики патологических изменений полости рта (Царев В.Н., Ушаков Р.В. патент RU 2324182 C1 МПК G01N 33/48, 10.05.2008., Бюл.№13). Суть якого полягає в тому, що досліджують ДНК, виділену з ротової рідини або зубного нальоту хворого, методом ПЛР з використанням олігонуклеотидних праймерів, специфічних для *Actinibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacterteroides forsythi*, що дозволяє проводити одночасно ідентифікацію трьох вказаних видів мікроорганізмів.

(13) **U**(11) **65337**(19) **UA**

Недоліками даного способу є, перш за все, невелика кількість мікроорганізмів, що виявляються, та неможливість оцінки співвідношення резидентної мікрофлори порожнини рота та транзитної, що надходить з зовні, відсутність внутрішнього контролю проведення ПЛР, що може призводити до появи хибно негативних результатів.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу визначення складу мікрофлори порожнини рота, що дозволяє ідентифікувати 8 видів/родів як постійної (фізіологічної) мікрофлори так і сапрофітних та патогенних мікроорганізмів, що входять до складу набору реагентів для проведення мультиплексної полімеразної реакції: загальна бактеріальна маса, *Lactobacillus* spp./BK, *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Mycoplasma genitalium+hominis*, *Candida* spp.. Ідентифікація проводиться з метою визначення співвідношення окремих мікроорганізмів в порожнині рота для підвищення ефективності профілактики і лікування різних патологічних станів в організмі, що можуть виникати в наслідок дисбіозу мікрофлори порожнини рота.

Поставлена задача вирішується створенням способу одночасного визначення наявності та співвідношення окремих мікроорганізмів з використанням мультиплексної полімеразної реакції, який відрізняється від відомого тим, що визначення проводять в порожнині рота, як мікроорганізми визначають - *Lactobacillus* spp./BK, *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Mycoplasma genitalium+hominis*, *Candida* spp., а полімеразну ланцюгову реакцію проводять в режимі реального часу.

Спосіб реалізується таким чином: матеріал зі слизової оболонки порожнини рота брали натщесерце стерильним зондом обертальними рухами, видаляли зонд, не доторкуючись губ, та вносили в пробірку з реагентом для термо-коагуляційного кондиціювання ДНК. В підготовлених зразках ДНК проводили кількісне визначення загальної бактеріальної маси, *Lactobacillus* spp./BK, *Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Mycoplasma genitalium+hominis*, *Candida* spp.. за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

Приклад практичного використання способу. Проведено визначення стану мікрофлори порожнини рота у двох осіб з встановленим діагнозом хронічний пародонтит в стадії ремісії. Отримано відмінність у складі мікрофлори обох осіб. У першої особи знайдено *Streptococcus* spp. - log 5,3 та *Eubacterium* spp. - log 5,2, загальна бактеріальна маса становила - log 6,7. У другій особи отримано наступні показники складу мікрофлори порожнини рота: загальна бак. маса - log 4,4 *Enterobacterium* spp. - log 4,9 та *Eubacterium* spp. - log 4,4.

Таким чином, за допомогою способу, що заявляється, доцільно визначати якісний стан мікрофлори порожнини рота, кількісну оцінку різних груп мікроорганізмів умовно-патогенної флори і виявлення співвідношення між ними та загальною бактеріальною масою, кількісну оцінку нормофлори.

Визначення співвідношення окремих видів мікроорганізмів в порожнині рота за допомогою способу, є зручним у використанні, інформативним, високоспецифічним, дозволить забезпечити об'єктивну, специфічну та чутливу діагностику дисбіозів, а також допоможе точніше контролювати перебіг захворювань порожнини рота та ефективність їх терапії.