



УКРАЇНА

(19) UA (11) 51373 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СКРИНІНГОВОЇ ОЦІНКИ КОЛОНІЗАЦІЙНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНИНИ РОТА

1

(21) u201001414

(22) 11.02.2010

(24) 12.07.2010

(46) 12.07.2010, Бюл.№ 13, 2010 р.

(72) ЧЕРЕДА ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ПЕТРУШАНКО ТЕТЯНА ОЛЕКСІЇВНА, ЛОБАНЬ ГАЛИНА АНДРІЇВНА

(73) ЧЕРЕДА ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ПЕТРУШАНКО ТЕТЯНА ОЛЕКСІЇВНА, ЛОБАНЬ ГАЛИНА АНДРІЇВНА

(57) Спосіб скринінгової оцінки колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота, що включає взяття зскрібка із внутрішньої поверхні щоки, приготування мазка, його висушування, фіксацію, забарвлення, підрахунок середньої кількості адгезованих бактеріальних клітин на одному букальному епітеліоциті, який **відрізняється** тим, що підрахунок підлягають тільки адгезовані стрептококи (адгезивне число), додатково підраховують відсоток епітеліоцитів, що адгезували більше 10

2

оральних стрептококів (адгезивний індекс), за їхніми значеннями визначають показники колонізаційної резистентності в балах, за умов адгезивного числа 20-60 оральних стрептококів та адгезивного індексу більше 50 %, показник колонізаційної резистентності дорівнює 1 бал, що характеризує високий рівень колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота, за умов адгезивного числа менше 20 і адгезивного індексу менше 50 %, показник колонізаційної резистентності становить 0 балів, що характеризує пригнічення бар'єру колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота, зниження антагоністичних властивостей нормальної мікрофлори, за умов адгезивного числа більше 60 і адгезивного індексу 100 %, показник колонізаційної резистентності дорівнює 2 бали і свідчить про збільшення напруги колонізаційного бар'єру, кількісне зростання мікроорганізмів, серед яких можуть бути не тільки симбіотні, але і умовно патогенні та патогенні.

Запропонований спосіб відноситься до медицини, зокрема до стоматології.

Разом з їжею, водою, повітрям у порожнину рота постійно потрапляє велика кількість мікроорганізмів, серед яких можуть бути і патогенні. Слизова оболонка порожнини рота є тим зовнішнім бар'єром, який запобігає потраплянню мікроорганізмів у внутрішнє середовище організму (перш за все у органи і тканини порожнини рота) Суттєве значення у здійсненні бар'єрно-захисної функції слизової оболонки порожнини рота має її колонізаційна резистентність, яка є першою лінією захисту від патогенних мікроорганізмів. Колонізаційна резистентність - це сукупність захисних факторів організму і конкурентних, захисних властивостей нормальної мікрофлори, що надають їй стабільність і попереджають колонізацію слизових оболонок сторонніми мікроорганізмами. Колонізаційна резистентність є одним з факторів місцевого імунітету, яким забезпечують неспецифічні та специфічні фактори захисту. Важливе значення у формуванні колонізаційної резистентності має

нормальна мікрофлора і епітеліоцити та їх рецептори, комплементарні адгезинам бактерій, які формують мікробіоценоз конкретного біотопа. Класичним методом оцінки мікрофлори порожнини рота є бактеріологічний метод, який полягає у визначенні кількісного і якісного її складу. Ці дослідження потребують значного матеріально-технічного забезпечення та часу.

У доступних інформаційно-пошукових системах ми не виявили способи скринінгової оцінки колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота.

Найбільш близьким до запропонованого є "Способ определения состояния слизистой оболочки полости рта и тканей пародонта" [ат. RU 2158426 C1 МПК G01N33/48 / Лукиных Л. М., Зеленова Е. Г., Присада Т. В. - № 99110346/14, заявл. 12.05.1999 опубл. 27.10.2000] Відомий спосіб полягає у взятті зскрібка епітеліоцитів із внутрішньої поверхні щоки, їх відмиванні, приготуванні мазка, його фіксації та забарвленні підрахунок середньої кількості адгезованих бактеріальних

(13) U

(11) 51373

(19) UA

клітин на одному епітеліоциті визначенні індексу колонізації букального епітелію (ІКБЕ) у балах. За умов ІКБЕ від 0 до 9 стану слизової надають 0 балів і оцінюють як схильність до запальних захворювань, при ІКБЕ від 10 до 59 - 1-2 бали - стан як нормальний, при ІКБЕ від 60 до 89 - 3 бали - група ризику, при ІКБЕ від 90 до 119 - 4 бали - як компенсований, при ІКБЕ від 120 до 159 - 5 балів - як субкомпенсований, при ІКБЕ від 160 і вище - 6-10 балів - як некомпенсований стан слизової оболонки порожнини рота і тканин пародонта.

Недоліки відомого способу:

1. Лише кількісна оцінка адгезованих мікроорганізмів, не враховується їх якісний склад. Підраховуються всі адгезовані мікроорганізми, не проводиться морфологічна диференціація облигатної (симбіотної) і факультативної (умовно-патогенні мікроорганізми, характерні для окремих захворювань зубів, пародонта, слизової оболонки порожнини рота) мікрофлори.

2. Не враховується доля епітеліоцитів, які не мають адгезованих симбіотних мікроорганізмів, або їх кількість дуже незначна. Це має суттєве значення, тому що ці клітини мають велику кількість незайнятих адгезованих ділянок, до яких можуть приєднатись умовно-патогенні і патогенні мікроорганізми, викликаючи розвиток патологічних процесів.

3. Не зрозуміло, який стан слизової оболонки порожнини рота і тканин пародонта автори відомого методу пропонують оцінювати. У зв'язку з цим не коректними є твердження "нормальний стан слизової оболонки", "компенсований, субкомпенсований, некомпенсований стан слизової оболонки порожнини рота" і тим більше, "тканин пародонту", стан яких автори взагалі не визначали.

Запропонований спосіб має наступне наукове обґрунтування. В останні роки знайшла визнання координуюча роль епітелію слизових оболонок у реакціях успадкованого (неспецифічного) і адаптивного (специфічного) імунітету, в ініціації перебігу запальних процесів, яким належить ключова роль у патології зокрема і органів ротової порожнини [astogi D., Rather A. G., Prince A. Host-bacterial interactions of inflammation. // Paediatr. Respir. Rev. - 2001. - 2. - р. 245-252] Певне значення у цих процесах належить імунomodуючому впливу мікроорганізмів, який опосередковується через активацію мукозальних епітеліоцитів. Це справедливо для всіх видів епітеліальних клітин мукозального тракту, в тому числі для букальних епітеліоцитів - одних з найбільш доступних для аналізу категорії клітин. Використовуючи адгезивні контакти, колонізуючи епітеліальні букальні клітини патогенні, умовно-патогенні мікроорганізми або просто коменсиали викликають секрецію цитокінів і медіаторів запалення [chmalz G., Schweik H., Hiller K. A. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. // Eur. J. Oral Sci. - 2000. - 108. - р. 442-448] Разом з тим, клітини букального епітелію самі реагують на молекули міжклітинних комунікацій у бактерій, змінюють експресію генів і пов'язані з ними фенотипові (зокрема адгезивні) властивості [mith J. K., Siddiqui A. A., Krishnaswamy

G. A. et al. Oral use of interferon-alpha stimulates ISG-15 transcription and production by human buccal epithelia cells. // J. Interferon Cytokine Res. - 1999. - 19. - р. 923-928] Таким чином, функціональний стан букальних епітеліоцитів, їх рецепторні властивості не є сталою величиною, об'єктивно відображає колонізаційну резистентність у системі "нормальна мікрофлора - букальні епітеліоцити" та може бути використаний для скринінгових досліджень.

В основу корисної моделі покладене завдання шляхом удосконалення відомого способу підвищити ефективність ранньої діагностики мікроекологічних порушень слизової оболонки порожнини рота, спростити і пришвидшити визначення резистентності слизової оболонки порожнини рота до колонізації умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами, які можуть викликати захворювання у порожнині рота.

Поставлене завдання вирішується створенням способу скринінгової оціню колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота, що включає взяття зскрібка із внутрішньої поверхні щок, приготування мазка, його висушування, фіксацію забарвлення, визначення адгезивного числа /АЧ/ (середня кількість оральних стрептококів, адгезованих на 1 букальному епітеліоциті), адгезивного індексу /АІ/ (відсоток букальних епітеліоцитів, що адгезували більше 10 оральних стрептококів) показника колонізаційної резистентності /ПКР/ в балах. За умов АЧ=20-60 оральних стрептококів, АІ>50 % ПКР дорівнює 1 бал, що характеризує високий рівень колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота. АЧ<20 і АІ<50 % відповідає ПКР 0 балів і характеризує пригнічення бар'єру колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота та зниження антагоністичних властивостей нормальної мікрофлори. За умов АЧ>60, АІ=100 % ПКР дорівнює 2 бали і свідчить про збільшення напруги колонізаційного бар'єру, кількісне зростання мікроорганізмів, серед яких можуть бути не тільки симбіотні, але і умовно-патогенні та патогенні.

Спосіб здійснюється таким чином. Після полоскання порожнини рота водою шпателем з заокругленими краями проводиться взяття зскрібка з внутрішньої поверхні щок, приготування мазка на стерильному знежиреному предметному склі, висушування, фіксація етиловим спиртом 96 %, забарвлення за Романовським-Гімзою. За допомогою світлового мікроскопа під імерсійним об'єктивом (х 90) у мазку знаходять букальні епітеліоцити (у кількості 50) і проводять підрахунок адгезованих на них оральних стрептококів (кулясті мікроорганізми, що розташовані попарно або ланцюжками). Далі визначають адгезивне число /АЧ/ - середню кількість оральних стрептококів, адгезованих на 1 букальному епітеліоциті, адгезивний індекс /АІ/ - відсоток букальних епітеліоцитів, що адгезували більше 10 оральних стрептококів і показник колонізаційної резистентності /ПКР/ в балах. Інтерпретацію отриманих результатів проводять описаним вище чином.

Приклад 1. Досліджуваний Н., 20 років, скарг з боку органів порожнини рота немає. Об'єктивно:

Слизова оболонка блідо-рожевого кольору, помірно зволожена, не набрякла, без елементів ураження. Порожнина рота санована. Індекс гігієни за Федоровим-Володкіною - 1,2 бали.

Бактеріологічне дослідження виявило загальну мікробну заселеність ротової рідини $3,22 \times 10^7$ КУО/мл, серед них заселеність *Streptococcus* spp. *viridans* склала $3,15 \times 10^7$ КУО/мл, *Neisseria* spp. - $2,4 \times 10^5$ КУО/мл, *Lactobacterium* spp. - $3,0 \times 10^4$ КУО/мл *Staphylococcus epidermidis* - 3×10^2 КУО/мл. Активність лізоциму – 29 %.

Скринінгова оцінка колонізаційної резистентності слизової оболонки рота Адгезивне число (АЧ)=35,9, адгезивний індекс (АІ) = 80 %, показник колонізаційної резистентності (ПКР) = 1 бал. Запропонований спосіб свідчить про високий рівень колонізаційної резистентності порожнини рота, що підтверджується заселенням порожнини рота представниками симбіотної мікрофлори, яка має антагоністичну дію на умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми.

Приклад 2. Досліджуваний Г., 20 років, скарг з боку органів порожнини рота немає. Об'єктивно: Слизова оболонка блідо-рожевого кольору, помірно зволожена, не набрякла, без елементів ураження. Порожнина рота санована. Індекс гігієни за Федоровим-Володкіною - 1,2 бали.

Бактеріологічне дослідження виявило загальну мікробну заселеність ротової рідини $9,81 \times 10^5$ КУО/мл, серед них заселеність *Streptococcus* spp. *viridans* склала $8,4 \times 10^5$ КУО/мл *Neisseria* spp. - $1,4 \times 10^5$ КУО/мл, *Lactobacterium* spp. - $1,0 \times 10^3$ КУО/мл, *Escherichia* spp $1,0 \times 10^2$ КУО/мл. Активність лізоциму – 28 %.

Скринінгова оцінка колонізаційної резистентності слизової оболонки рота Адгезивне число (АЧ)= 11,4, адгезивний індекс (АІ) = 41 %, показник колонізаційної резистентності (ПКР) = 0 балів. Запропонований спосіб свідчить про пригнічення бар'єру колонізаційної резистентності слизової оболонки порожнини рота і зниження антагоністичних властивостей нормальної мікрофлори. Це

підтверджується бактеріологічним дослідженням, яке виявило зменшення симбіотної мікрофлори наявність алохтонних умовно-патогенних мікроорганізмів.

Приклад 3. Досліджуваний М., 21 років, скарг з боку органів порожнини рота немає. Об'єктивно: Слизова оболонка блідо-рожевого кольору, помірно зволожена, не набрякла, без елементів ураження. Порожнина рота санована. Індекс гігієни за Федоровим-Володкіною - 1,5 бали.

Бактеріологічне дослідження виявило загальну мікробну заселеність ротової рідини $4,42 \times 10^7$ КУО/мл, серед них заселеність *Streptococcus* spp. *viridans* склала $4,4 \times 10^7$ КУО/мл, *Neisseria* spp. - $2,1 \times 10^5$ КУО/мл, *Staphylococcus aureus* - $1,0 \times 10^2$ КУО/мл, *Streptococcus* spp. β - *haemolyticus* - $4,0 \times 10^4$ КУО/мл. Активність лізоциму – 23 %.

Скринінгова оцінка колонізаційної резистентності слизової оболонки рота Адгезивне число (АЧ)=84,3, адгезивний індекс (АІ) = 100 %, показник колонізаційної резистентності (ПКР) = 2 бали. Запропонований спосіб свідчить про збільшення напруги колонізаційного бар'єру. Це підтверджується загальним зростанням мікробної заселеності виявленням умовно-патогенних мікроорганізмів, які за певних умов можуть викликати розвиток патологічних процесів; зниженням активності лізоциму.

Запропонованим способом досліджено 50 здорових людей віком 18-22 роки, у 43 % обстежених ПКР=1 бал, у 37 % обстежених ПКР=0 балів, у 20 % обстежених ПКР=2 бали.

Таким чином, запропонований спосіб скринінгової оцінки колонізаційної резистентності порожнини рота простий у виконанні, дозволяє підвищити ефективність ранньої діагностики мікроекологічних порушень слизової оболонки порожнини рота, обстежити велику кількість людей за малий проміжок часу, передбачає мінімум матеріально-технічного забезпечення.