



УКРАЇНА

(19) UA (11) 36429 (13) A

(51) B C12Q1/18

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ БІОЛОГІЧНОЇ РІДИНИ

(21) 99126865

(22) 16.12.1999

(24) 16.04.2001

(33) UA

(46) 16.04.2001, Бюл. № 3, 2001 р.

(72) Гужевська Наталія Станіславівна, Білько Іван Петрович, Політун Антоніна Михайлівна

(73) Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця (НМУ)

(57) Спосіб визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини, що включає засів живильного середовища індикаторним мікроорганізмом, інкубацію у відповідних умовах та облік

результатів за ознаками росту індикаторного мікроорганізму, який відрізняється тим, що живильне середовище засівають газом стандартною суспензією *Micrococcus lysodeikticus* в концентрації  $10^8$  мікробних тіл на 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, накладають на нього паперовий диск, попередньо просочений біологічною рідиною, і після інкубації визначають діаметр зони затримки росту індикаторного мікроорганізму навколо диску, в мм, і при його значенні 0 мм констатують відсутність антимікробної активності, при 1-9 мм - слабкий її ступінь, 10-15 мм - середній, >15 - високий.

Винахід відноситься до медицини, зокрема, до лабораторної діагностики, а точніше - до лабораторної діагностики в стоматології, і призначений для визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини.

В клінічній медицині, зокрема, в стоматології, важливе значення для діагностики, оцінки ефективності лікування, прогнозування перебігу захворювань та їх профілактики має визначення резистентності тканин до ушкодження, яка певною мірою пов'язана з антибактеріальними властивостями біологічних рідин: крові, слини, ліквору тощо.

Звичайно антибактеріальну активність біологічної рідини оцінюють за активністю антибактеріальних факторів, таких як лізоцим, S Ig A, лактопероксидаза та інших речовин білкової природи.

Проте лабораторні методи, які використовуються для визначення цих показників, потребують значних витрат реактивів, трудомісткі, не мають чітко визначених кількісних критеріїв.

Так, відомий спосіб визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини (наприклад, змішаної слини), в якому використовують визначення антибактеріальних субстанцій, наприклад, лізоциму, S Ig A [1]. Спосіб передбачає використання радіальної імунодифузії в гелі з моноспецифічними (активність лізоциму) чи стандартними (вміст S Ig A) сироватками. Результати такого дослідження дозволяють судити про стан неспецифічної резистентності організму, але одним з недоліків є відсутність чітких кількісних критеріїв, які можна було б використати з метою діагностики та прогнозу. Метод трудомісткий потребує забору

великої кількості біорідини, спеціального лабораторного обладнання та реактивів. Результати реакцій надто варіюють залежно від віку, наявності соматичної патології, що значно утруднює їх інтерпретацію.

Найбільш близьким до даного способу (прототипом) є спосіб визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини шляхом використання серійних розведень її в рідких чи твердих живильних середовищах з наступним засівом живильного середовища індикаторним мікроорганізмом, інкубацією у відповідних умовах [2]. Облік результатів проводять за наявністю чи відсутністю ознак росту індикаторного мікроорганізму на живильному середовищі з відповідним розведенням досліджуваної біологічної рідини. При цьому за мінімальну антибактеріальну активність біологічної рідини приймають те її найбільше розведення в живильному середовищі, яке затримує ріст індикаторного мікроорганізму.

Суттєвими недоліками прототипу є його трудомісткість, значна витрата живильних середовищ, лабораторного посуду, відсутність чітких кількісних критеріїв для визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини.

Винахід вирішує завдання визначення об'єктивних показників ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини більш простим і зручним способом проведення дослідження.

Технічний результат від використання винаходу полягає в значному зниженні трудомісткості дослідження і підвищенні його точності за рахунок

(19) UA (11) 36429 (13) A

використання більш чітких критеріїв оцінки отриманих результатів.

Вирішення завдання здійснюється так, що у відомому способі визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини здійснюється засівом живильного середовища індикаторним мікроорганізмом, інкубацією у відповідних умовах та обліком результатів за ознаками росту індикаторного мікроорганізму. Згідно з винаходом, живильне середовище засівають газом стандартною суспензією *Micrococcus lysodeikticus* в концентрації  $10^6$  мікробних тіл на 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду і накладають на нього паперові диски, попередньо просочені біологічною рідиною. Після інкубації визначають діаметр зони затримки росту індикаторного мікроорганізму навколо дисків, в мм, і при його значенні 0 мм констатують відсутність антимікробної активності, при 1-9 мм - слабкий її ступінь, 10-15 мм - середній, >15 мм - високий.

Відмінною особливістю запропонованого способу визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини є використання стандартного паперового диска, попередньо просоченого досліджуваною біологічною рідиною, який накладають на живильне середовище, засіяне газом суспензією *Micrococcus lysodeikticus* зі стандартною концентрацією мікробних тіл. Ступінь антибактеріальної активності досліджуваної біологічної рідини оцінюють після інкубації при  $37^{\circ}\text{C}$  в залежності від діаметра зони затримки росту індикаторного мікроорганізму. Це забезпечує значне зняття трудомісткості дослідження (зокрема, його тривалість скорочується з 24 годин до 6-8 годин) при більш чіткій кількісній оцінці результатів. З доступних літературних джерел такий спосіб визначення ступеня антибактеріальної активності біологічної рідини не відомий.

Спосіб здійснюється таким чином:

Стандартні паперові диски (без антибіотиків) просочують біологічною рідиною (наприклад, слиною). Попередньо, за стандартною методикою, в чашках Петрі готують тверде живильне середовище, на яке засівають газом суспензією *Micrococcus lysodeikticus* концентрацією  $10^6$  мікробних тіл на 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Даний мікроорганізм обрано як індикаторний з огляду на ту обставину, що його клітини легко піддаються лізису під впливом лізоциму - ферменту, який є широко розповсюдженим у природі і який має антибактеріальні властивості. В організмі людини лізоцим знаходиться в слізній рідині, слині, секреті слизових оболонок носа, шлунковому і дуоденальному соках, грудному молоці, сироватці крові, екстрактах, отриманих з різних тканин та органів. Концентрація *Micrococcus lysodeikticus*  $10^6$  мікробних тіл на 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду є стандартною для мікробіологічних досліджень, а засів живильного середовища газом, як показали експериментальні дослідження, є оптимальним з огляду на обраний спосіб оцінки результатів - за діаметром затримки росту індикаторного мікроорганізму. Чашки Петрі з живильним середовищем, *Micrococcus lysodeikticus* і диском з біологічною рідиною інкубують при  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 6-8 годин. Результати оцінюють шляхом виміру діаметру (в мм), зони затримки росту *Micrococcus*

*lysodeikticus* навколо диску з біологічною рідиною. Ступінь антибактеріальної активності біологічної рідини визначають за кількісною величиною діаметра зони затримки росту *Micrococcus lysodeikticus*. Відсутність зони затримки росту *Micrococcus lysodeikticus* навколо диску свідчить про відсутність антибактеріальної дії досліджуваної біологічної рідини. Численними дослідженнями було визначено, що у разі наявності зони затримки росту *Micrococcus lysodeikticus* до 9 мм реакцію можна оцінювати як слабкий ступінь антибактеріальної активності біологічної рідини. Середньому ступеню антибактеріальної активності відповідає діаметр зони затримки росту мікроорганізмів від 10 до 15 мм, високому - понад 15 мм.

Конкретний приклад.

Хворий Б., 24 років, діагноз: генералізований пародонтит I ступеня загостреного перебігу. Хворіє протягом останніх трьох років. Вважає себе практично здоровим. Періодично лікувався у лікаря-пародонтолога, відмічає тимчасові покращання, часті загострення хвороби, особливо у весняний період.

При об'єктивному дослідженні виявлено набряк, гіперемію ясен, кровоточивість останніх при зондуванні, виявлено пародонтальні кишень гли-

биною 2-4 мм в області  $\frac{7621|1267}{7621|1267}$  зубів, з сероз-

но-гнійним ексудатом. На рентгенограмі відмічається нерівномірна резорбція міжальвеолярних перетинок на 1/3 їх висоти, остеопороз губчастої речовини.

З додаткових лабораторних досліджень визначена антибактеріальна активність слини за розробленим способом. Виявлено відсутність зони затримки росту індикаторного мікроорганізму (*Micrococcus lysodeikticus*) навколо диску, просоченого слиною, що свідчить про відсутність її антибактеріальної дії.

В комплексне лікування хворого на генералізований пародонтит, поряд з місцевим застосуванням протизапальних препаратів, було включено фітоконцентрати як місцево, так і внутрішньо, які мають антибактеріальну, протизапальну, імуномодулюючу дію. Повторне визначення антибактеріальної активності слини після проведеного, комплексного, лікування генералізованого пародонтиту виявило її середній ступінь (зона затримки росту індикаторного мікроорганізму становила 12 мм). Цей ступінь активності ротової рідини зберігався і в наступні терміни диспансерного спостереження (через 6-12 міс.).

В клініці терапевтичної стоматології Національного медичного університету з 05.1997 до 05.1999 рр. запропонований спосіб визначення ступеня антибактеріальної активності слини було застосовано у 120 хворих на генералізований пародонтит хронічного та загостреного перебігу віком від 20 до 45 років та у здорових з інтактним пародонтом. Відсутність антибактеріальної активності слини констатовано у 25,1% хворих, слабкий ступінь - у 48,5%, середній ступінь - у 26,4%. У жодного хворого не виявлено високої антибактеріальної активності слини. У здорових осіб з інтактним пародонтом у 91,6% обстежених виявлено високу антибактеріальну активність слини, у 8,4% - захис-

ні властивості її відповідали середньому ступеню антибактеріального захисту. Проведене комплексне лікування генералізованого пародонтиту з включенням фітоконцентратів багатоспрямованої дії (антибактеріальної, протизапальної, імуномодуючої) призвело до наступних змін. У жодного пацієнта після лікування не виявлено відсутності антибактеріальної дії слини, середній ступінь антибактеріальної активності виявлено у 42,7% хворих, високий - у 57,2% обстежених. Подібний стан захисних властивостей слини у хворих на генералізований пародонтит зберігається після одного курсу лікування протягом року.

Отримані дані свідчать про ефективність запропонованого способу як в діагностичному, так і в прогностичному плані.

Зменшення етапів постановки реакції, скорочення тривалості інкубації, зниження витрат на живильні середовища, лабораторний посуд обумовлюють значний економічний ефект від впровадження запропонованого способу.

Література.

1. Олейник И.И. Микробиология и иммунология полости рта // Боровский Е.В., Леонтьев В.К. Биология полости рта. - М.: Медицина, 1991. - С. 226-260.
2. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. - М.: Медицина, 1973. - С. 153-157.

---

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)  
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26  
(044) 295-81-42, 295-61-97

---

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2001 р. Формат 60x84 1/8.  
Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

---

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.  
(044) 268-25-22

---