



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2023.08); A61B 5/00 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023128730, 07.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.11.2023

Дата регистрации:
06.02.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.11.2023

(45) Опубликовано: 06.02.2024 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

450008, г.Уфа, ул.Ленина, 3, БГМУ, Ахатов
Искандер Шаукатович

(72) Автор(ы):

Усманова Ирина Николаевна (RU),
Сенина Валерия Олеговна (RU),
Лакман Ирина Александровна (RU),
Ишмухаметова Амина Насимовна (RU),
Авзалетдинова Диана Шамильевна (RU),
Шангареева Алия Ирековна (RU),
Туйгунов Марсель Маратович (RU),
Борцова Юлия Львовна (RU),
Титова Татьяна Николаевна (RU),
Абдуллина Гузель Маратовна (RU),
Мусина Альфия Фанилевна (RU),
Усманова Диана Ирековна (RU),
Сафина Гузель Иршатовна (RU),
Абдуллина Наиля Мустафаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2597777 C1, 20.09.2016 . RU
2433400 C2, 10.11.2011. RU 2473902 C1,
27.01.2013. UA 16048 U, 17.07.2006. Усманова
И. Н. Оптимизация диагностики, лечения и
профилактики воспалительных заболеваний
пародонта и слизистой оболочки рта у лиц
молодого возраста. Диссер. д.м.н. Уфа, 2016,
267с. Xuan Xiao et al. Advances in the oral
microbiota and rapid (см. прод.)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ДИСБИОЗА ПОЛОСТИ РТА У ПАЦИЕНТОВ С
МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ ИЛИ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к терапевтической стоматологии и лабораторной
диагностике, и касается диагностики дисбиоза

полости рта у пациентов с метаболическим
синдромом или сахарным диабетом 2 типа. В
ротовой жидкости определяют уровень глюкозы,

уреазную активность, концентрацию аммиака, состояние pH и свободно-радикального окисления. В микробиоте полости рта - количество дрожжевых грибов рода *Candida* и уреазопозитивных микроорганизмов. При значении уровня глюкозы 0,18 ммоль/л, уреазной активности 2,011 мкмоль·мин⁻¹ на мг белка, уровня аммиака 0,084 ммоль, pH 6,1, светосуммы свечения 22,36 у/е, в микробиоте полости рта количества уреазопозитивных *Staphylococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. в количестве 104 КОЕ/ед., грамположительных факультативно-анаэробных палочек *Lactobacillus* spp. в количестве 104 КОЕ/ед. и дрожжевых грибов рода *Candida* в дрожжевой форме в количестве 103-4 КОЕ/ед. диагностируют дисбиоз полости рта на фоне

метаболического синдрома. При значении уровня глюкозы 0,34 ммоль/л, уреазной активности 2,678 мкмоль·мин⁻¹ на мг белка, уровня аммиака 0,139 ммоль, pH 6,5, светосуммы свечения 16,6 у/е, в микробиоте полости рта количества уреазопозитивных *Staphylococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. в количестве 105 КОЕ/ед., грамположительных факультативно-анаэробных палочек *Lactobacillus* spp. в количестве 105 КОЕ/ед. и дрожжевых грибов рода *Candida* в мицелиальной форме в количестве 104-5 КОЕ/ед. диагностируют дисбиоз полости рта на фоне сахарного диабета 2 типа. Использование изобретения обеспечивает повышение точности диагностики. 2 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

detection of oral infectious diseases. Sec. Infectious Agents and Disease. Front. Microbiol. Volume 14, 06 February, 2023.

RU 2813065 C1

RU 2813065 C1

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY(19) **RU** (11)
(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01)**2 813 065**⁽¹³⁾ **C1**(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(52) CPC
G01N 33/50 (2023.08); *A61B 5/00* (2023.08)(21)(22) Application: **2023128730, 07.11.2023**(24) Effective date for property rights:
07.11.2023Registration date:
06.02.2024

Priority:

(22) Date of filing: **07.11.2023**(45) Date of publication: **06.02.2024** Bull. № 4

Mail address:

**450008, g.Ufa, ul.Lenina, 3, BGMU, Akhatov
Iskander Shaukatovich**

(72) Inventor(s):

**Usmanova Irina Nikolaevna (RU),
Senina Valeriia Olegovna (RU),
Lakman Irina Aleksandrovna (RU),
Ishmukhametova Amina Nasimovna (RU),
Avzaletdinova Diana Shamilevna (RU),
Shangareeva Aliia Irekovna (RU),
Tuigunov Marsel Maratovich (RU),
Bortsova Iuliia Lvovna (RU),
Titova Tatiana Nikolaevna (RU),
Abdullina Guzel Maratovna (RU),
Musina Alfiia Fanilevna (RU),
Usmanova Diana Irekovna (RU),
Safina Guzel Irshatovna (RU),
Abdullina Nailia Mustafaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «BAShKIRSKII
GOSUDARSTVENNYI MEDITSINSKII
UNIVERSITET» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**(54) **METHOD OF DIAGNOSTICS OF ORAL CAVITY DYSBIOSIS IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME OR TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; therapeutic dentistry; laboratory diagnostics.

SUBSTANCE: invention concerns the diagnosis of oral dysbiosis in patients with metabolic syndrome or type 2 diabetes. In the oral fluid, the level of glucose, urease activity, ammonia concentration, pH state and free radical oxidation are determined. In the oral microbiota — the number of yeast fungi of *Candida* genus and urease-positive microorganisms. With glucose level of 0.18 mmol/l, urease activity value of 2.011 mcmol·min⁻¹ per mg of protein, ammonia level of 0.084 mmol, pH 6.1, luminescence sum 22.36 u/e, urease-positive *Staphylococcus* spp. and *Enterobacteriaceae* spp. in an amount of 104 CFU/unitin the mouth, gram-positive facultative anaerobic rods *Lactobacillus* spp. in an amount of 104 CFU/unit and opportunistic yeast-like fungi of *Candida* genus in yeast form in an amount of 103-4 CFU/unit oral dysbiosis is diagnosed against the background of metabolic syndrome. With glucose level of 0.34 mmol/l, urease activity value of 2.678 mcmol·min⁻¹ per mg of protein, ammonia level of 0.139 mmol, pH 6.5, luminescence sum 16.6 u/e in the mouth, urease-positive *Staphylococcus* spp. and *Enterobacteriaceae* spp. in an amount of 105 CFU/unit, gram-positive facultative anaerobic rods *Lactobacillus* spp. in an amount of 105 CFU/unit and opportunistic yeast-like fungi of *Candida* genus in yeast form in an amount of 104-5 CFU/unit

oral dysbiosis is diagnosed against the background of
type 2 diabetes mellitus.

EFFECT: use of the invention improves prediction

accuracy.

1 cl, 2 ex, 1 tbl

R U 2 8 1 3 0 6 5 C 1

R U 2 8 1 3 0 6 5 C 1

Изобретение относится к медицине, а именно к терапевтической стоматологии и лабораторной диагностике, и может быть использовано для диагностики дисбиоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа на основании анализа в пробах ротовой жидкости уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, состояния pH и свободно-радикального окисления, выявления в микробиоте полости рта дрожжевых грибов рода *Candida* и уреазопозитивных микроорганизмов.

Дисбиоз полости рта представляет собой изменение антагонизма соотношения состава микробиоты, которое проявляется в ускоренном росте дрожжевого гриба рода *Candida* на фоне других условно-патогенных микроорганизмов. Полость рта является первичным резервуаром для активного роста представителей Грам+ факультативно - анаэробных кокков (стафилококков), Грам- и Грам+ факультативно-анаэробных палочек (энтеробактерий и лактобактерий), дрожжевых грибов рода *Candida*.

Патогенез дисбиоза полости рта имеет прямую зависимость от концентрации глюкозы, наличия уреазопозитивной и дрожжевой условно-патогенной микрофлоры, состояния pH (5,8-6,5) и свободно-радикального окисления ротовой жидкости.

Проявления дисбиоза полости рта от 5% до 10% случаев наблюдается при преддиабете и сахарном диабете (СД) 2 типа [Qin H., Li G., Xu X., Zhang C, Zhong W., Xu S., Yin Y., Song J. The role of oral microbiome in periodontitis under diabetes mellitus. *J Oral Microbiol.* 2022; 14(1):2078031 <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2078031>].

Метаболический синдром (МС) определяется ВОЗ как патологическое состояние, характеризующееся абдоминальным ожирением, инсулинорезистентностью, гипертензией и гиперлипидемией. Этот синдром приводит к распространению таких заболеваний, как диабет 2-го типа, ишемическая болезнь, инсульт и другие недуги [Saklayen M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(2):12 <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z> N.Chew, C.H. Ng, D.Tan, G.Kong, C.X. Lin, Y.H. Chin, R. Foo, M. Chan, M. Muthiah, Global burden of metabolic diseases: data from Global Burden of Disease 2000-2019. A cosortium of metabolic disease. *European Heart Journal.* 2023;44(1)779.131, <https://doi.org/10.1093/eurhearti/ehac779.131>]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время СД страдает около 422 млн. человек во всем мире, и ежегодно 1,6 млн. смертей напрямую связаны с СД. Ожидается, что в 2045 году число больных диабетом возрастет до 629 млн. человек. По оценкам специалистов, в 2017 году в мире насчитывалось 451 млн человек (в возрасте 18-99 лет), страдающих диабетом. Ожидается, что к 2045 году эти показатели увеличатся до 693 млн. По оценкам, почти половина всех людей (49,7%), живущих с диабетом, не диагностированы. Кроме того, по оценкам, 374 млн человек имеют нарушенную толерантность к глюкозе (НТГ), и прогнозируется, что почти 21,3 млн живорожденных женщин пострадали от той или иной формы гипергликемии во время беременности [Cho N.H., Shaw J.E., Karuranga S., Huang Y., da Rocha Fernandes J.D., Ohlrogge A.W., Malanda B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 138:271-281 <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023> Ogurtsova K., Fernandes J.D., Huang Y., et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice.* 2017;128:40-50 <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>].

Клинические особенности дисбиоза полости рта заключаются в появлении отека и воспаления на слизистой оболочке рта. В жалобах преобладают наличие неприятного запаха (галитоз), сухости в виде проявлений на фоне гипосаливации слюнных желез.

В норме в пробах ротовой жидкости уровень глюкозы в норме составляет 0,06-0,17

ммоль/л [Вавилова Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта: учебное пособие / Вавилова Т.П. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - 208 с. - ISBN 978-5-9704-5006-2. - Текст: электронный // URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970450062.html>].

Повышенный уровень глюкозы в ротовой жидкости способствует увеличению
 5 лактобактерий и уреазопозитивной микрофлоры (*Staphylococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp.), а также росту дрожжевых грибов рода *Candida*, [Qin H., Li G., Xu X., Zhang C, Zhong W., Xu S., Yin Y., Song J. The role of oral microbiome in periodontitis under diabetes mellitus. *J Oral Microbiol.* 2022;14(1):2078031 <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2078031>]. По
 10 данным литературы, в норме среднее количество стафилококков, энтерококков, лактобактерий, дрожжевых грибов рода *Candida* в полости рта не превышает

концентрацию 10^2 - 10^3 КОЕ/мл [Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Туров А.В., Изотова Г.Н., Старостина А.Е., Лапченко А.С. Клинико-микробиологическая характеристика
 дисбиотических изменений слизистой оболочки полости рта и ротоглотки. *Медицинский Совет.* 2016;(6):32-35 <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2016-6-32-35>]. Важным

15 патогенетическим звеном в развитии дисбиоза полости рта является окислительный стресс, развитие которого обусловлено нарушением баланса между антиоксидантной и прооксидантной системами. Основную роль в этом процессе играют активные формы кислорода (АФК), тем самым инициируются реакции свободнорадикального окисления (СРО), в том числе перекисное окисление липидов - (ПОЛ), приводящие к химической
 20 модификации и разрушению биомолекул, нарушению тканевого дыхания во внутренней мембране митохондрий и процессов гидроксилирования в микросомах. Избыточная продукция АФК и (или) нарушения нормального функционирования систем
 антиоксидантной защиты вызывают усиленное окислительное повреждение биомолекул, что приводит к развитию дисфункции клеток и тканей организма (окислительный
 25 стресс). В результате этого клетки, обладающие фагоцитарной активностью, тоже вырабатывают радикалы кислорода, которые обеспечивают их микробицидность. При хроническом воспалении в полости рта увеличивается количество свободных радикалов, происходит деполимеризация гиалуроновой кислоты и образование активного фактора хемотаксиса, миграция нейтрофилов к месту воспаления, увеличивается проницаемость
 30 капилляров, инициируются процессы перекисного окисления липидов, нарушаются тканевое дыхание в митохондриях и процессы гидроксилирования в микросомах с выходом лизосомальных ферментов и окислительным повреждением тканей.

При снижении функциональной активности ротовой жидкости увеличивается
 35 количество уреазопозитивной микрофлоры и дрожжевых грибов рода *Candida*, что является фактором развития дисбиоза полости рта. Уреаза в ротовой жидкости имеет микробное происхождение, следовательно, ее повышенная концентрация в ротовой жидкости является следствием обсемененности полости рта уреазопозитивной
 микроборганизмами (актиномицеты, стафилококки, протеи, клебсиеллы и другие).

40 Таким образом, клинико-лабораторный подход к диагностике дисбиоза полости рта у с метаболическим синдромом или сахарным диабетом типа 2 основывается на выявлении взаимосвязи уреазопозитивной и дрожжевых грибов рода *Candida*, является критерием для разработки конкретных лечебно-профилактических схем при патологии слизистой оболочки рта. Анализ уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, состояния pH и свободно-радикального окисления в пробах ротовой жидкости,
 45 концентрации уреазопозитивной и дрожжевой микрофлоры является важным диагностическим критерием.

Наиболее близким аналогом изобретения является способ определения уреазной активности ротовой жидкости для скрининга обсемененности полости рта

уреазопозитивной микробиотой [патент RU 2597777 от 20.09.2016].

Определение уреазной активности проводят следующим образом: в одну из лунок микропланшета вносят водный раствор мочевины с фосфатным буфером, в две другие вносят водные растворы мочевины с фосфатным буфером, содержащие уреазу с известной концентрацией 5 и 10 Ед/л соответственно, а в остальные лунки вносят водный раствор мочевины с фосфатным буфером и образцами ротовой жидкости, затем во все лунки вносят фенол/нитропруссидный реагент и гипохлорит, после чего измеряют оптическую плотность на микропланшетном ридере при длине волны 546 нм и рассчитывают концентрацию уреазы в образцах ротовой жидкости в Ед/л, при значении уреазной активности выше $15,85 \pm 2,11$ Ед/л регистрируют обсемененность полости рта уреазопозитивной микробиотой.

Однако известный способ не позволяет проводить диагностику дисбиоза полости рта, поскольку не выявляет взаимосвязи уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, состояния pH и свободно-радикального окисления, в микробиоте полости рта дрожжевых грибов рода *Candida* и уреазопозитивных микроорганизмов, что дает возможность дифференцированного подхода к оценке степени дисбиоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа.

Задачей изобретения является разработка способа клинико-лабораторной диагностики проявлений дисбиоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа на основании анализа уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, состояния pH и свободно-радикального окисления в ротовой жидкости, количества дрожжевых грибов рода *Candida*, уреазопозитивных микроорганизмов в составе микробиоты полости рта

Технический результат при использовании изобретения - повышение точности диагностики.

Предлагаемый способ диагностики дисбиоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа осуществляется следующим образом.

Проводят комплексное клинико-стоматологическое обследование (врач эндокринолог, стоматолог), сбор анамнеза и жалоб, лабораторным методом в пробах ротовой жидкости определяют уровень глюкозы, уреазную активность, концентрацию аммиака, состояние pH и свободно-радикального окисления, в микробиоте полости рта количество дрожжевых грибов рода *Candida* и уреазопозитивных микроорганизмов.

В пробах собранной ротовой жидкости, сбор которой проводят натошак в течение 15 минут без предварительного полоскания полости рта, определяют уровень глюкозы (референтные значения нормы глюкозы по Вавиловой Т.П. (2019 г) составляют 0,06-0,17 ммоль/л) с использованием набора АО-«Вектор-Бест» Глюкоза GOD (диапазон измерений 0,06-30 ммоль/л). Обеспечение вхождения измеряемых концентраций глюкозы в исследуемых образцах слюны в диапазон линейности набора (0,5-56 ммоль/л) осуществлялось путем увеличения объема образца, взятого на анализ.

Уреазную активность определяют в пробах ротовой жидкости по количеству аммиака (ммоль), образовавшегося в результате работы фермента. Для определения аммиака 2 мл супернатанта смешивают с 250 μ л реактива Несслера, оптическую плотность определяют на спектрофотометре при длине волны 500 нм. Концентрацию аммиака, выделяющегося в результате стехиометрической реакции гидролиза мочевины, катализируемой ферментом, определяют колориметрически по реакции Несслера [Vinod K., Anisha N., Kharish B., Pallavi A. et al. Urease activity in saliva and plaque as endogenous protection against Dental caries in institutionalized blind children. Journal of Natural Science

Biology and Medicine. 2021;12(1):109. https://doi.org/10.4103/jnsbm.JNSBM_90_20].

Калибровочный график. Для приготовления калибровочного графика готовят растворы сульфата аммония, полученные путем разведения стандартного раствора (20 мг на 100 мл дистиллированной воды). К 3 мл разведений аликвот стандартного раствора добавляют 1 мл реактива Несслера и определяют оптическую плотность образцов при длине волны 500 нм. На основании полученных данных строят калибровочный график.

Определение уреазной активности (η моль-мин⁻¹ на мг белка) в пробах ротовой жидкости проводят следующим образом - к 0,5 мл слюны добавляют 3 мл 3% раствора мочевины, 1 мл 0,2 м фосфатного буфера и инкубируют пробы при; 55^о С в течение 15 мин. По истечении времени инкубации реакцию останавливают помещением проб в лед и добавлением 0,66 N раствора серной кислоты и 1 мл 10% раствора вольфрамата натрия, после чего пробы центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

Для определения аммиака 2 мл супернатанта смешивают с 250 μ л реактива Несслера, оптическую плотность определяют на спектрофотометре при длине волны 500 нм. Концентрацию аммиака выражали в нмоль аммиака/мин на мг белка.

Содержание белка в образцах ротовой жидкости определяют по Лоури [Lowry O.H., Rosebrough N.J., Fair A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. №1. P. 265-275].

Хемилюминесценцию (ХЛ) в пробах ротовой жидкости проводят на приборе ХЛ-003 [Фархутдинов Р.Р. Прибор для регистрации хемилюминесценции (Хемилюминомер - ХЛ-003). / Р.Р. Фархутдинов, В.А. Лиховских // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения, М., 2005, 155-172]. В качестве наиболее информативного показателя ХЛ определяют светосумму излучения (S y/e) за 5 минут исследования. Весь процесс измерения ХЛ и обработку результатов проводят в автоматическом режиме, что позволяет повысить точность и объективность получаемой информации.

Уровень pH ротовой жидкости определяют лакмусовыми бумажками.

Комплексное микробиологическое исследование включает бактериологический посев мазков с полости рта на дифференциально-диагностические среды серии HiCrome. Данное исследование включает выделение присутствующих Грам+ микроорганизмов, дрожжевых грибов рода Candida в (lg КОЕ/ед.). Кроме того, готовят мазки на предметных стеклах и окрашивают их по Грамму с дальнейшим культуральным и микроскопическим исследованием и определением количества и вида микробиоты. Исследование микробиоты полости рта выполняют с соблюдением Санитарных правил СП 1.2.731-99.

Сравнивают взаимосвязь уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака с уровнем pH, свободно-радикального окисления в пробах ротовой жидкости, наличие в мазках с полости рта уреазопозитивной микрофлоры - Staphylococcus spp и Enterobacteriaceae spp., дрожжевых грибов рода Candida с условно нормативными показателями и определяют наличие дисбактериоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа:

При значении в пробах ротовой жидкости уровня глюкозы 0,18 ммоль/л, уреазной активности 2,011 η моль- мин⁻¹ на мг белка, уровня аммиака 0,084 мМоль, pH 6,1, светосуммы свечения 22,36 y/e, в микробиоте полости рта количества уреазопозитивных Staphylococcus spp.и Enterobacteriaceae spp.в количестве 10⁴ КОЕ/ед, грамположительных факультативно-анаэробных палочек Lactobacillus spp.в количестве 10⁴ КОЕ/ед, и

дрожжевых грибов рода *Candida* в дрожжевой форме в количестве 10^{3-4} КОЕ/ед диагностируют дисбиоз полости рта на фоне метаболического синдрома.

При значении в пробах ротовой жидкости уровня глюкозы 0,34 ммоль/л, уреазной активности 2,678 мкмоль-мин⁻¹ на мг белка, уровня аммиака 0,139 ммоль, pH 6,5, светосуммы свечения 16,6 у/е, в микробиоте полости рта количества уреазопозитивных *Staphylococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. в количестве 10^5 КОЕ/ед, грамположительных факультативно-анаэробных палочек *Lactobacillus* spp. в количестве 10^5 КОЕ/ед, и дрожжевых грибов рода *Candida* в мицелиальной форме в количестве 10^{4-5} КОЕ/ед диагностируют дисбиоз полости рта на фоне сахарного диабета 2 типа.

Достоинствами предлагаемого способа диагностики дисбиоза полости рта является воспроизводимость при высокой степени значимости и достоверности полученных результатов.

В доступной научно-медицинской и патентной литературе не обнаружен тождественный способ диагностики дисбиоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа в условиях клинико-лабораторного исследования и стоматологического осмотра, доступность и воспроизводимость при высокой степени значимости и достоверности полученных результатов. В то же время, предлагаемый нами способ диагностики проявлений дисбиоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа на основании оценки в пробах ротовой жидкости уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, уровня pH, состояния свободно-радикального окисления, наличия представителей уреазопозитивной и дрожжевой микрофлоры в составе микробиоты полости рта.

Выявление уреазопозитивных микроорганизмов, увеличение количества дрожжевых грибов рода *Candida* в дрожжевой или мицелиальной форме обусловлены выявленным дисбалансом уровня глюкозы, аммиака, уреазной активности, концентрацией аммиака, дисбалансом состояния оксидативного стресса и сдвигом pH ротовой жидкости в кислую сторону, что является одним из достоверных ранних маркеров проявления дисбиоза полости рта. Таким образом, заявляемое изобретение соответствует критерию «новизна». Исследованиями авторов впервые было установлено и доказано, что предлагаемые неинвазивные исследования в пробах ротовой жидкости уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, состояния pH и свободно-радикального окисления, присутствия в мазках с полости рта представителей уреазопозитивных микроорганизмов и дрожжевых грибов рода *Candida* в составе микробиоты полости рта являются информативными и достоверными критериями диагностики дисбиоза полости рта у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа.

Таким образом, заявляемое изобретение соответствует критерию «изобретательский уровень».

Нами было обследовано 35 пациентов с метаболическим синдромом, 35 с сахарным диабетом 2 типа. Лабораторными методами проведен анализ проб ротовой жидкости и анализ данных состава микробиоты полости рта на основании подписанного информированного согласия. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица

Взаимосвязь уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака с уровнем рН, свободно-радикального окисления ротовой жидкости, уреазопозитивных микроорганизмов – *Staphylococcus spp* и *Enterobacteriaceae spp.*, дрожжевых грибов рода *Candida spp* у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа

Показатели в единицах измерения /клинические группы пациентов	Метаболический синдром (n=35)	Сахарный диабет 2 типа (n=35)	Условная норма (n=35)
	p_1 – p-уровень при сравнении с показателем условной нормы согласно тесту Мана-Уитни, p_2 – p-уровень межгруппового сравнения согласно тесту Мана-Уитни.		
Глюкоза ротовой жидкости	$0,18 \pm 0,02^+$ $p_1=0,175$	$0,34 \pm 0,06^{**}$ $p_1=0,010$	$0,11 \pm 0,03$
	$p_2=0,044$		

(ммоль/л)			
Уреаза ротовой жидкости ($\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1}$ на мг белка)	$2,011 \pm 0,117^{***}$ $p_1 < 0,001$	$2,678 \pm 0,312^{***}$ $p_1 < 0,001$	0,584 $\pm$ 0,016
	$p_2 = 0,088$		
Аммиак ротовой жидкости (ммоль)	$0,084 \pm 0,016^{***}$ $p_1 < 0,001$	$0,139 \pm 0,061^*$ $p_1 = 0,049$	0,292 $\pm$ 0,018
	$p_2 = 0,118$		
рН ротовой жидкости	$6,1 \pm 0,3^*$ $p_1 = 0,047$	$6,5 \pm 0,2$ $p_1 = 0,098$	6,9 $\pm$ 0,1
	$p_2 = 0,214$		
Светосумма свечения (S y/e)	$22,3 \pm 0,6^{***, \#}$ $p_1 < 0,001$	$16,6 \pm 0,54^{***}$ $p_1 < 0,001$	8,9 $\pm$ 0,5
	$p_2 < 0,001$		
Грам (+) уреазопозитивная микрофлора			
Staphylococcus spp. (КОЕ/ед)	10^4^* $p_1 = 0,012$	10^4^* $p_1 = 0,013$	$10^3 - 10^4$
	$p_2 = 1,0$		
Enterobacteriaceae spp.	$10^4^{***, \#}$ $p_1 < 0,001$	10^5^{***} $p_1 < 0,001$	$10 - 10^2$
	$p_2 < 0,001$		
Lactobacillus spp.	$10^4^{***, \#}$ $p_1 = 0,028$	10^5^{***} $p_1 < 0,001$	$10^3 - 10^4$
	$p_2 < 0,001$		
Дрожжевые грибы			
Candida spp. (КОЕ/ед)	$10^3 - 10^4^{***, \#}$ $p_1 < 0,001$	$10^4 - 10^5^{***}$ $p_1 < 0,001$	$10^2 - 10^3$
	$p_2 < 0,001$		

, , - различия с условной нормой значимы при $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно.

†, †† - различия между группой пациентов с метаболическим синдромом и с сахарным диабетом значимы при $p < 0,05$ и $p < 0,001$, соответственно.

Предлагаемый способ иллюстрируется следующими клиническими примерами.

Пример 1.

Пациент Б., 45 лет. Профилактический осмотр стоматолога: Жалобы на наличие незначительной сухости, неприятный запах изо-рта. Объективно: на фоне бледно-розовой слизистой оболочки щек, дорсальной поверхности языка, преддверия полости рта определяются очаги гиперемии. Ротовая жидкость незначительно пенистая.

Сопутствующий диагноз - метаболический синдром.

Неинвазивное исследование проб ротовой жидкости:

Глюкоза ротовой жидкости -0,18 ммоль/л.

Уреаза ротовой жидкости $2,011 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$ на мг белка

аммиак ротовой жидкости 0,084 ммоль

рН 6,1

S -22,36 у.е.

В исследуемой микрофлоре полости рта:

уреазопозитивная микрофлора - *Staphylococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. 10^4 Кое/ед

молочно-кислые микроорганизмы *Lactobacillus* spp. 10^4 Кое/ед

5 дрожжевые грибы рода *Candida* в дрожжевой форме - 10^{3-4} КОЕ/ед.

Окончательный диагноз: Дисбиоз в сторону кандидоза. Кандидоз полости рта легкой степени тяжести.

Пример 2.

10 Пациент Б., 40 лет. Профилактический осмотр стоматолога: Жалобы на наличие проявлений сухости, жжения в полости рта, неприятный запах изо-рта. Объективно: на фоне бледно-розовой слизистой оболочки щек, ретромолярной области, дорсальной поверхности языка, преддверия полости рта определяются очаги гиперемии. Ротовая жидкость пенная, повышенной вязкости.

Сопутствующий диагноз - сахарный диабет типа 2.

15 Неинвазивное исследование проб ротовой жидкости:

Глюкоза в ротовой жидкости - 0,34 ммоль/л

уреазы ротовой жидкости $2,678 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$ на мг белка

аммиак ротовой жидкости 0,139 ммоль

pH 6,5

20 S-16,6 у.е.

В исследуемой микрофлоре полости рта:

уреазопозитивная микрофлора - *Staphylococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. 10^5 Кое/ед

25 молочно-кислые микроорганизмы *Lactobacillus* spp. 10^5 Кое/ед

дрожжевые грибы рода *Candida* в мицелиальной форме - 10^{4-5} КОЕ/ед.

Окончательный диагноз: Дисбиоз в сторону кандидоза. Кандидоз полости рта средней степени тяжести.

30 Таким образом, у лиц с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа на основании анализа в пробах ротовой жидкости уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, состояния pH и свободно-радикального окисления, выявления представителей уреазопозитивных микроорганизмов и дрожжевых грибов рода *Candida* в составе микрофлоры полости рта осуществляют диагностику проявлений дисбиоза в сторону кандидоза, что важно для разработки и планирования в дальнейшем

35 качественных лечебно-профилактических мероприятий у данной категории лиц.

Применение предлагаемого способа позволяет сократить время и повысить точность клинико-лабораторной диагностики проявлений дисбиоза у пациентов с метаболическим синдромом или сахарным диабетом 2 типа на основании изучения в пробах ротовой жидкости уровня глюкозы, уреазной активности, концентрации аммиака, состояния

40 pH и свободно-радикального окисления, выявления представителей уреазопозитивных микроорганизмов и дрожжевых грибов рода *Candida* в составе микрофлоры полости рта

Предлагаемый способ легко воспроизводим в условиях клинической лаборатории и при его использовании достигается указанный технический результат. Таким образом,

45 заявляемое изобретение соответствует критерию «промышленная применимость».

(57) Формула изобретения

Способ дифференциальной диагностики дисбиоза полости рта, включающий

определение уреазной активности ротовой жидкости, отличающийся тем, что в ротовой жидкости дополнительно определяют уровень глюкозы, концентрацию аммиака колориметрически по реакции Нesslera, уровень pH, светосумму свечения при хемиллюминесценции, в мазках с полости рта определяют концентрацию

уреазопозитивной и условно-патогенной микрофлоры и при значении уровня глюкозы

0,18 ммоль/л, уреазной активности 2,011 мкмоль·мин⁻¹ на мг белка, уровня аммиака 0,084 ммоль, pH 6,1, светосуммы свечения 22,36 у/е, в микробиоте полости рта количества

уреазопозитивных *Staphylococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. в количестве 10⁴ КОЕ/ед.,

грамположительных факультативно-анаэробных палочек *Lactobacillus* spp. в количестве

10⁴ КОЕ/ед. и дрожжевых грибов рода *Candida* в дрожжевой форме в количестве 10³⁻⁴

КОЕ/ед. диагностируют дисбиоз полости рта на фоне метаболического синдрома; при

значении уровня глюкозы 0,34 ммоль/л, уреазной активности 2,678 мкмоль·мин⁻¹ на

мг белка, уровня аммиака 0,139 ммоль, pH 6,5, светосуммы свечения 16,6 у/е, в

микробиоте полости рта количества уреазопозитивных *Staphylococcus* spp. и

Enterobacteriaceae spp. в количестве 10⁵ КОЕ/ед., грамположительных факультативно-

анаэробных палочек *Lactobacillus* spp. в количестве 10⁵ КОЕ/ед. и дрожжевых грибов

рода *Candida* в мицелиальной форме в количестве 10⁴⁻⁵ КОЕ/ед. диагностируют дисбиоз

полости рта на фоне сахарного диабета 2 типа.