

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



МЕТОД ДИАГНОСТИКИ СТОМАТИТА

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Авторы: к.м.н. Карпук Н.А., д.м.н., профессор Рубникович С.П., д.м.н., доцент Карпук И.Ю., к.м.н., доцент Самсонова И.В., Афанасьев Д.В., Пожарицкая А.А.

Витебск-Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

06.03.2019

Регистрационный № 006-0219

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ СТОМАТИТА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Н. А. Карпук, д-р мед. наук, проф. С. П. Рубникович, д-р мед. наук, доц. И. Ю. Карпук, канд. мед. наук, доц. И. В. Самсонова, Д. В. Афанасьев, А. А. Пожарицкая

Витебск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику стоматита (К12) и аллергии неуточненной (Т-78.4) после зубопротезирования, путем оценки морфофункциональных изменений слизистой оболочки полости рта (СОПР) у пациентов с использованием целлюлозно-ацетатных дисков (ЦАД).

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-стоматологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с симптомами стоматита.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Стерильные пакеты.
2. Этиловый спирт 96 % (Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2, с. 295).
3. Целлюлозно-ацетатные диски (диаметр 13 мм, размер пор 0,44 мкм).
4. Микроскоп (увеличение x400).
5. Пинцет.
6. Предметное стекло.
7. Ксилол.
8. Гематоксилин.
9. Эозин.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Стоматит (К12).
2. Аллергия неуточненная (Т78.4) (после зубопротезирования).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Способ осуществляется в несколько этапов следующим образом:

ЦАД (диаметр 13 мм, размер пор 0,44 мкм) разрезают на 4 части. Части диска укладывают пинцетом на поверхности десны с вестибулярной и оральной сторон, на язык и щеку в области причинной ортопедической конструкции так, чтобы основание располагалось ближе к ортопедической конструкции, а верхушка на нижней челюсти — с вестибулярной стороны к переходной складке и ко дну полости рта — с оральной; на верхней челюсти — к переходной складке с вестибулярной стороны и к небу — с оральной. Диск мягко прижимают к поверхности СОПР в течение 2–5 с, после чего его удаляют пинцетом, помещают на предметное стекло вверх клеточным материалом и фиксируют 96 %-м раствором этилового спирта. Далее клеточный материал просветляют в ксилоле и окрашивают гематоксилином и эозином. Световую микроскопию выполняют на микроскопе Leica DM2500 при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 1000$.

Методика фиксации клеточного материала

ЦАД помещают на предметное стекло вверх клеточным материалом, наносят одну каплю 96 %-го этилового спирта и оставляют высыхать при комнатной температуре в течение 10 мин (а20091200 от 04.08.2009 «Способ фиксации цитологического материала, полученного импрессионным методом»).

Методика окрашивания клеточного материала

Клеточный материал окрашивают гематоксилином и эозином с предварительным просветлением в ксилоле (а20091100 от 04.08.2009 «Способ окрашивания цитологического материала, полученного импрессионным методом»):

1. ЦАД с клеточным материалом погружают в емкость с ксилолом до полного просветления (1 мин).

2. ЦАД с клеточным материалом погружают в гематоксилин на 30 мин.

3. ЦАД с клеточным материалом последовательно отмывают в двух флаконах дистиллированной воды, одном — аммиачной воды и снова в одном — дистиллированной.

4. ЦАД с клеточным материалом погружают в емкость с эозином (спиртовой раствор — на 1–2 с, водный раствор — на 20 мин).

5. ЦАД с клеточным материалом последовательно отмывают в двух флаконах 96 %-го спиртового раствора.

6. ЦАД помещают на предметное стекло, в зоне нахождения клеточного материала наносят 1–2 капли полистирола и накрывают покровным стеклом.

После фиксации и окрашивания клеточного материала проводят световую микроскопию с оценкой клеточного состава и его морфофункционального состояния.

Морфофункциональные изменения слизистой оболочки полости рта, в т. ч. при гиперчувствительности к зубопротезным материалам, оценивают с использованием светового микроскопа Leica DM2500 при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 1000$.

При световой микроскопии клеточных образцов, полученных методом импрессионной цитологии, учитывают:

- 1) клеточный состав образца;
- 2) дистрофические изменения в эпителиоцитах СОПР (эпителиоциты и их варианты, фибробласты, фиброциты, клетки воспалительного ряда и др.);
- 3) митотическую активность эпителиоцитов;
- 4) лимфоцитарно-нейтрофильный индекс;
- 5) наличие бактериальной и (или) грибковой флоры;
- 6) адгезию микроорганизмов к клеткам эпителия СОПР.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения отсутствуют.

Ошибка 1. Пропитывание ЦАД ротовой жидкостью препятствует прикреплению клеток к поверхности, в результате чего количество клеточного материала недостаточно для верной оценки.

Устранение: просушивать СОПР слабой струей воздуха, диск укладывать через 2–5 с.

Ошибка 2. Пропитывание ЦАД ротовой жидкостью препятствует его просветлению в ксилоле, в результате чего плотная основа диска затрудняет световую микроскопию либо делает ее полностью невозможной.

Устранение: диск укладывать через 2–5 с после просушивания СОПР слабой струей воздуха.

Обоснование целесообразности использования метода

Прототипом метода являются способы цитологического контроля как инвазивные (биопсия), так и малоинвазивные, такие как мазки-отпечатки по методу М. П. Покровской и М. С. Макарова (1942) и соскобы эпителия по методу М. Ф. Камаева (1970). Однако по ряду причин они не имеют широкого применения в стоматологической практике. С учетом анатомических особенностей рта, выполнение мазков-отпечатков предметным стеклом вызывает определенные трудности, в результате чего получить клеточный материал представляется возможным лишь из доступных зон. Метод соскобов стоматологическим шпателем в силу травматичности имеет ограниченное применение и также позволяет оценивать клеточный материал только из доступных мест. Кроме того, информативность данного способа может измениться из-за неудачного взятия материала: неправильно выбрано место для получения материала, слишком поверхностный соскоб или, наоборот, слишком глубокое (травматичное) взятие материала.

Задачей метода является разработка простого, доступного нетравматичного, легко выполнимого и высокоинформативного способа получения клеточного материала, который позволит оценить состояние СОПР в любой зоне и оценивать результаты лечения. Поэтому представляется актуальным применение импрессионной цитологии в стоматологической практике для оценки морфофункционального состояния роговицы при бактериальном кератите.

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач
УЗ «Витебский областной клинический
стоматологический центр»
_____ О. Ю. Богинский
_____ 2019 г.

Отчет о предварительном клиническом испытании метода диагностики стоматита

Обследовано 75 пациентов, обратившихся в клинику кафедры общей стоматологии с курсом ортопедической стоматологии и клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ» с жалобами на зуд и жжение СОПР, давших добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Все пациенты указывали на наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним. У пациентов с жалобами на непереносимость стоматологического материала (НСМ) период от момента установки ортопедических конструкций до появления симптомов их непереносимости варьировал от нескольких дней до 5 лет.

В ходе клинического обследования пациенты с жалобами на НСМ были разделены на 5 групп:

1-я группа (n = 18) — пациенты с наличием объективных клинических симптомов НСМ: гингивит, стоматит и/или хейлит, локализованные в области несъемных протезов, из них 2 мужчин и 16 женщин. Медиана возраста пациентов данной группы составила 53,4 [36; 69] года;

2-я группа (n = 20) — пациенты с протезным стоматитом (ПС) и идентифицированными кандидами, из них 3 мужчины и 17 женщин с медианой возраста 57,4 [39; 67] года;

3-я группа (n = 20) пациенты с ПС без поражения грибами рода *Candida*, из них 2 мужчин и 18 женщин с медианой возраста 61 [57; 70] год;

4-я группа (n = 18) — пациенты без объективных клинических симптомов, но с жалобами на НСМ. Медиана возраста в данной группе составила 55 [46; 65] лет; из них 3 мужчин и 15 женщин.

5-я группа (n = 21) — группа сравнения — лица без жалоб на НСМ и без ПС, сопоставимые по полу, возрасту, типу конструкций и количеству зубопротезных единиц, согласившиеся пройти обследование на наличие гиперчувствительности к зубопротезным материалам перед плановой заменой ортопедических конструкций. Группу составили 3 мужчин и 18 женщин с медианой возраста 56,9 [42; 69] года.

Уровень гигиены оценивали по упрощенному индексу гигиены полости рта ОНІ-S, а выраженность воспалительного процесса — при помощи индекса GІ (оценивали зубы симметричной локализации противоположной стороны челюсти).

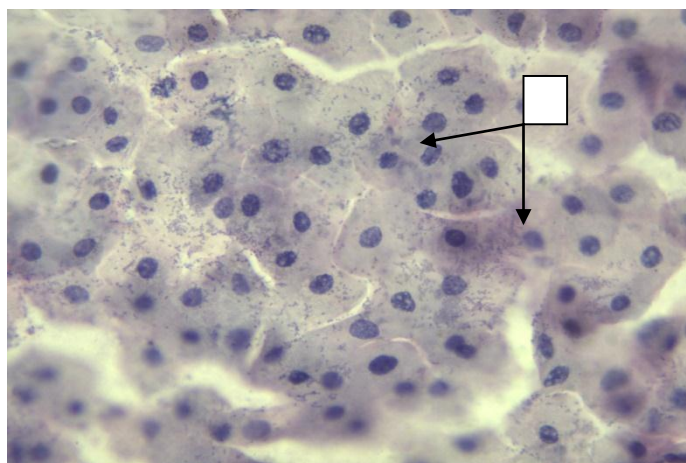
Результаты исследования

Клеточный состав образцов пациентов опытных групп и группы сравнения был сходным и представлен преимущественно эпителиальными клетками, среди которых в разном количестве встречались фибробласты, фиброциты, клетки воспалительного ряда. Однако морфометрическая обработка материала выявила количественные различия в исследуемых образцах.

Результаты морфометрической обработки исследованных образцов данной группы представлены в таблице.

В материале, полученном методом импрессионной цитологии у пациентов 1-й группы с наличием объективных клинических симптомов НСМ в виде гингивита, стоматита и/или хейлита, локализованных в области несъемных протезов, отмечалось присутствие среди эпителиоцитов поверхностных слоев покровного эпителия значительного количества сегментоядерных нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов.

В образцах пациентов группы сравнения среди эпителиальных клеток преимущественно поверхностных слоев эпителия (рисунок 1) определялись единичные фибробласты, фиброциты, клетки воспалительного ряда.



**Рисунок 1. — Импрессионная цитология СОПР группы сравнения.
Окраска гематоксилином и эозином (×400); 1 — эпителиоциты**

Среди эпителиоцитов определялись клетки с вакуолизацией цитоплазмы и ядер, явлениями кардио- и цитоллизиса (рисунок 2, таблица). Отдельные эпителиоциты были двуядерными (амитоз) и с явлениями полиплоидии.

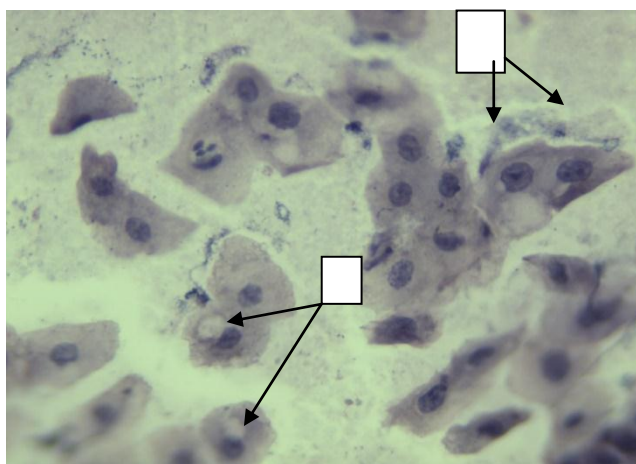
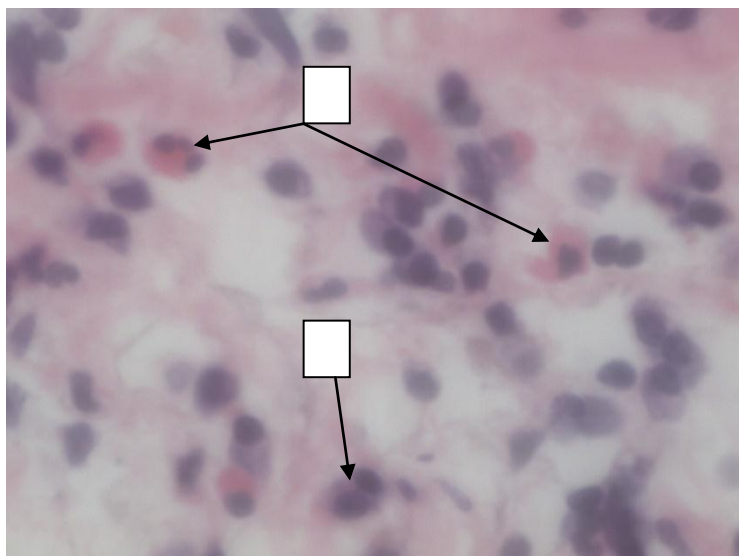


Рисунок 2. — Импрессионная цитология слизистой оболочки альвеолярного отростка (АО) пациента 1-й группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 400$); 1 — эпителиоциты с вакуолизацией цитоплазмы, 2 — цитоллизис

Таблица — Результаты морфометрической оценки в образцах СОПР, полученных методом импрессионной цитологии, пациентов исследуемых групп

Клетки	Группы пациентов				
	1-я (n = 18)	2-я (n = 20)	3-я (n = 20)	4-я (n = 18)	5-я (n = 21)
Эпителиоциты неизмененные	4,0 [3,0; 5,0]	5,0 [4,0; 5,0]	2,0 [1,0; 2,5]	11,0 [9,0; 12,0]	11,0 [10,0; 18,0]
Эпителиоциты с дистрофическими изменениями	8,0 [5,0; 7,5]	14,0 [11; 15,5]	16,0 [15; 19]	4,0 [1,0; 6,0]	3,0 [2,0; 3,0]
Эпителиоциты с некротическими изменениями	3,0 [2,5; 4,0]	6,0 [5,0; 7,5]	5,0 [3,0; 7,5]	1,0 [0,0; 2,0]	2,0 [1,0; 3,0]
Эпителиоциты двуядерные	0-3	0-2	0-1	0-1	0-3
Нейтрофилы	8,5 [8; 13]	13,0 [10,5; 16,5]	16,0 [13,5; 19,0]	2,0 [0; 2,0]	1,0 [0,0; 2,0]
Макрофаги	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [0,0; 2,0]	2,0 [1,5; 3,0]	1,0 [0,0; 1,5]	1,0 [0,0; 1,0]
Эозинофилы	2,0 [1,8; 2,7]	0,0 [0,0; 0,0]	1,0 [0,0; 2,0]	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,0]
Лимфоциты	0-2	1-2	0-1	0-1	0-1
Плазмоциты	1,9 [1,7; 2,0]	3,0 [2,5; 4,0]	2,0 [1,0; 3,0]	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,0]
Фибробласты, фиброциты	1,5 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 3,0]	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [0,0; 2,0]	1,0 [0,0; 2,0]

Наряду с этим в части образцов встречались эозинофилы (рисунок 3, таблица).



**Рисунок 3. — Импрессионная цитология слизистой оболочки АО пациента 1-й группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 630$);
1 — эозинофилы, 2 — сегментоядерный нейтрофил**

Данный тип цитограммы был определен нами как воспалительно-аллергический.

В образцах 2-й группы пациентов с ПС (съёмные протезы) преобладали эпителиальные клетки поверхностного и шиповатого слоев покровного эпителия (рисунок 4, таблица) с явлениями в большей части из них фестончатости ядер, кариолизиса, кариопикноза, кариорексиса, вакуолизации цитоплазмы, явлениями цитолизиса.

Наряду с этим встречались двуждерные эпителиальные клетки (амитоз), а также фибробласты, фиброциты.

Клетки воспалительного ряда, присутствовавшие в большом количестве, были представлены сегментоядерными (рисунок 5, таблица), в меньшей степени лимфоцитами, палочкоядерными нейтрофилами и макрофагами.

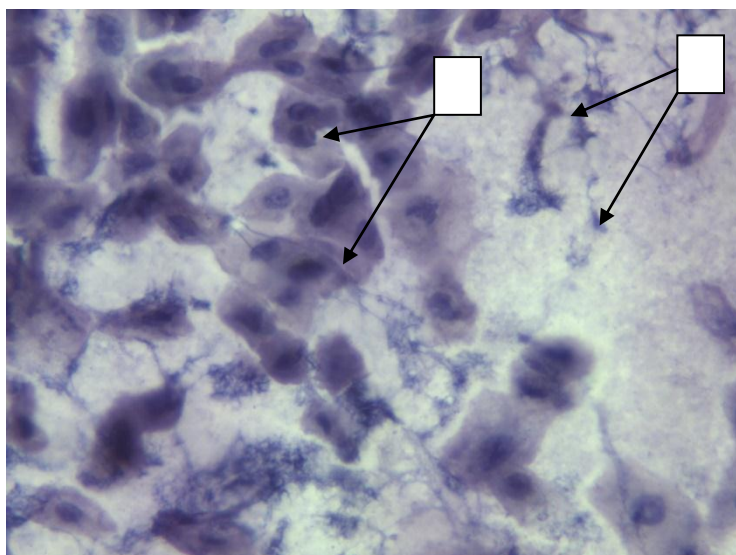


Рисунок 4. — Импрессионная цитология слизистой оболочки АО пациента 2-й группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 400$);
1 — эпителиоциты шиповатого слоя,
2 — эпителиоциты с явлениями цитолизиса

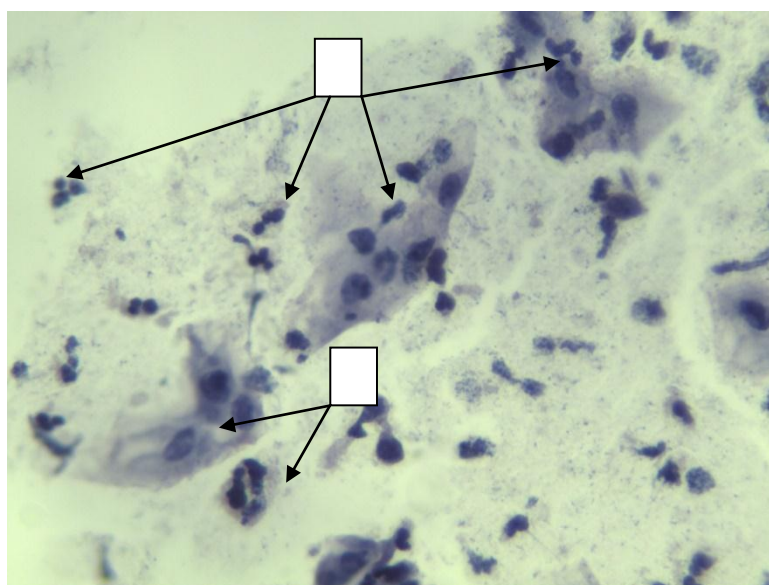
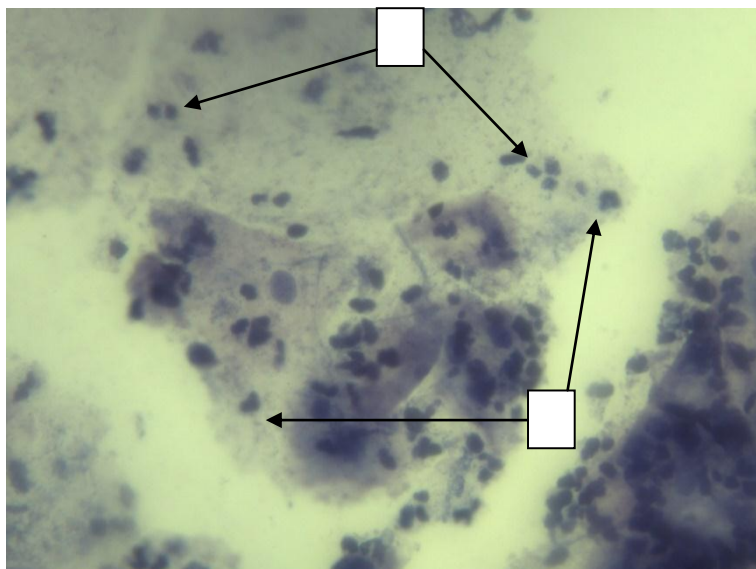


Рисунок 5. — Импрессионная цитология слизистой оболочки пациента 2-й группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 630$);
1 — сегментоядерные нейтрофилы,
2 — эпителиоциты с дистрофическими изменениями

Данный тип цитограммы нами расценивался как воспалительно-дистрофический.

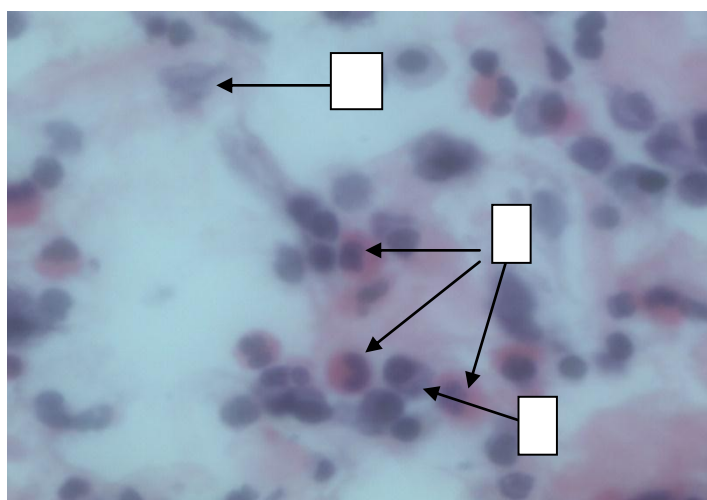
В образцах, полученных у пациентов 3-й группы, среди эпителиоцитов поверхностных слоев покровного эпителия присутствовали в значительном количестве сегментоядерные нейтрофилы (рисунок 6, таблица), макрофаги, лимфоциты, а также палочкоядерные нейтрофилы, плазмоциты. Наряду с этим в ряде образцов встречались эозинофилы (рисунок 6, таблица).



**Рисунок 6. — Импрессионная цитология слизистой оболочки АО пациента 3-й группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 400$);
1 — сегментоядерные нейтрофилы,
2 — эпителиоциты с дистрофическими изменениями**

Среди эпителиоцитов определялись клетки как с вакуолизацией цитоплазмы и ядер, так и с явлениями карио- и цитолизиса. Отдельные эпителиоциты были двуядерными (амитоз).

Данный тип цитограммы также нами определялся как воспалительно-аллергический.



**Рисунок 7. — Импрессионная цитология слизистой оболочки АО пациента 3-й группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 630$);
1 — эозинофилы, 2 — плазмоцит, 3 — эпителиоцит с явлениями цитолизиса**

В 4-й группе пациентов без объективных клинических симптомов, но с жалобами на НСМ клеточные образцы были представлены преимущественно

клетками поверхностных слоев покровного эпителия (рисунок 8, таблица), среди которых встречались единичные фибробласты, фиброциты, сегментоядерные нейтрофилы, макрофаги.

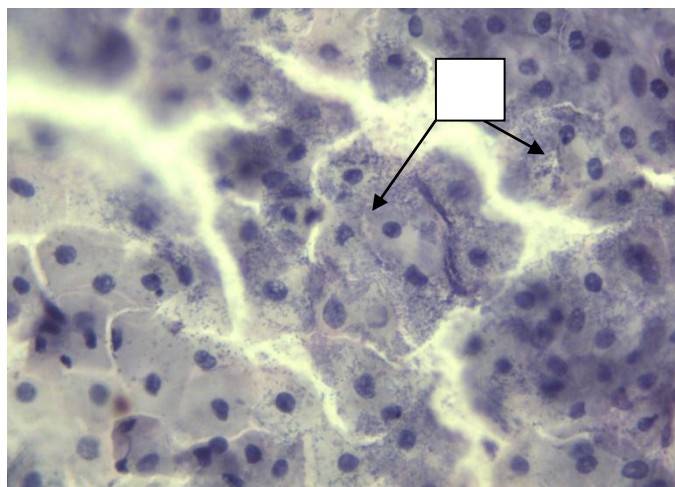


Рисунок 8. — Импрессионная цитология слизистой оболочки щеки пациента 4-й группы. Окраска гематоксилином и эозином (×400); 1 — эпителиоциты

В отдельных эпителиоцитах отмечались признаки набухания цитоплазмы.

Цитограмма данной группы приближалась по своему клеточному составу к таковой группы сравнения.

Анализ клеточных образцов выявил существенные различия в исследуемых группах, на основании чего нами выделены воспалительно-дистрофический и воспалительно-аллергический типы цитограмм.

Выявленные воспалительно-дистрофические изменения у пациентов 2-й группы и явились, надо полагать, результатом присутствия в полости рта съемных протезов. Это обуславливало развитие дистрофических изменений со стороны покровного эпителия СОПР, о чем свидетельствовало присутствие в образцах значительного количества эпителиоцитов с вакуолизацией цитоплазмы и ядер, явлениями кариопикноза, кариолизиса. Эти изменения, на наш взгляд, обуславливали снижение защитных свойств эпителия СОПР и способствовали вторичному инфицированию (в частности, кандидами).

Выводы

1. На основании анализа клеточных образцов СОПР выявлены существенные различия в исследуемых группах пациентов и выделены воспалительно-дистрофический и воспалительно-аллергический типы цитограмм.

2. Метод импрессионной цитологии в оценке состояния СОПР может быть использован для разработки новых подходов к диагностике, прогнозированию и обоснованию выбора наиболее информативных критериев оценки стоматита.