**Диагностика и специфическая терапия инвазии ротовых простейших у больных пародонтитом**

Методические рекомендации

Харьковский институт усовершенствования врачей Харьков – 1996

В методических рекомендациях представлены сведения о ап-робированых методах лабораторной диагностики инвазии ротовых простейших у больных пародонтитом, подробно изложена сравни -тельная оценка этих методов. Даны рекомендации о методах специфической протистоцидной терапии при заболеваниях пародонта.

Методические рекомендации предназначены для врачей-стоматологов, врачей-интернов, слушателей факультетов усовершенствования врачей, паразитологов, лаборантов. Могут быть полезны инфекционистам, оториноларингологам, микробиологам.

Методические рекомендации составили: профессор В.Ф.Куцевляк; профессор В.А.Никитин; профессор Ю.Л.Волянский; профессор С.В.Бирюкова; к.м.н. Н.Ф.Дзюбан; ассистент Ю.В.Лахтин.

Кафедры терапевтической стоматологии, клинической микробиологии и иммунологии Харьковского института усовершенствования врачей.

Рецензент: профессор Г.Ф.Катурова

15ВМ 966-566-013-6

В полости рта, в частности пародонталышх карманах, у больных пародонтитом встречается два вида протистов: Entamoeba gangivalis- десневая амеба и Trichomonas tenax - ротовая трихомонада. Они обитают и в кариозных полостях зубов, криптах миндалин. Многочисленные исследования, посвященные этой проблеме, не позволяют окончательно решить вопрос о роли их в патологическом процессе.

Присутствие ротовых протистов у лиц с интактным паро -донтом дают основание авторам отнести их не к паразитам, а к комменсалам. Однако клинические и лабораторные наблюдения показывают, что при разных патологических состояниях изменяется морфологическая структура десневых амеб, а при инвазии ротовыми трихомонадами течение заболевания более длительное, затяжное. Особенно тяжело протекает пародонтит, при этом наблюдается обильное гнойное отделяемое из пародонтальных карманов. Кроме того, в данных случаях пародонтит плохо поддается лечению обычными лекарственными средствами, а назначение специфической протистоцидной терапии быстро приводит к купированию воспалительного процесса.

В пародонтологической практике к назначению протистоцидных средств прибегают довольно часто, нередко вслепую, без лабораторного подтверждения инвазии простейшими. Поэтому своевременная лабораторная диагностика протоинвазии ротовой полости и обоснованное проведение протистоцидной терапии у больных пародонтитом приобретают актуальное значение.

К методам протозоологической диагностики инвазии ротовых протистов относятся следующие: протозооскопия нативного препарата, протозооскопия окрашенного мазка и культуральное.

исследование.

**1. Протозооскопия нативного препарата**

Принцип метода: взятый экссудат из пародон-тального кармана смывают в капле физиологического раствора на предметном стекле и просматривают под микроскопом.

Реактивы и оборудование:

- стерильная корневая игла с турундой;

- предметное и покровное стекла;

- физиологический раствор или раствор Рингера-Локка;

- микроскоп.

Забор материала производят из пародонтальных карманов. Стерильную корневую иглу с турундой вводят в пародонтальный карман и поворачивают вокруг своей оси, затем переносят в каплю физиологического раствора, помещенную на предметном стекле, смывают в ней содержимое с иглы, покрывают покровным стеклом и микроскопируют при об. 40, ок. 7.

Физиологический раствор должен быть теплым, поскольку двигательная активность трихомонад в холодном растворе снижается или прекращается вообще, что может привести к отрицательному результату. Для этого применяют специальные нагревательные столики. Мы в этих целях используем в качестве источника света небольшую бытовую лампу, для чего вынимаем зеркало-отражатель в микроскопе и вставляем лампу под конденсор. Инфракрасное излучение лампы нагревает предметное стекло с физиологическим раствором.

Entamoeba gangivalis в нативном препарате выявляются в 100% случаях. Они округлой формы, очень медленно передвигаются за счет выпячивания псевдоподий. Псевдоподии появляются с одного полюса либо сразу с нескольких в разном направлении. Они прозрачные, выступают в виде языков с закругленным концом. Появление псевдоподии является главным отличительным признаком амеб от лейкоцитов, которые при воспалительном процессе в пародонте порой занимают все поле зрения. При невнимательном, беглом просмотре поля зрения за амебы можно принять разрушенные лейкоциты, которые теряют четкую круглую форму и ядро выходит за пределы оболочки. Если псевдоподии прозрачные, то центр амеб мутный, можно увидеть фагоцитированные ядра лейкоцитов. Размеры их вариабельны-: с лейкоцит и даже меньше, крупнее лейкоцита, иногда достигают гигантских размеров.

Trichomonas tenax в нативном препарате нами выявляются в 35,4% из всех положительных находок. Они имеют несколько вытянутую форму, похожи на плод груши. Отличительной чертой их от других клеточных элементов содержимого пародонтальных карманов является выраженная двигательная активность. Движение трихомонад энергичное, "порхающее", сопровождается выбрасыванием жгутиков на одном из полюсов. Во время движения тело простейших сокращается и они то вытягиваются по оси, то округляются. Двигательная активность их настолько энергична, что они могут быстро покидать поле зрения. В тех случаях, когда нативный препарат приготавливают в большом количестве физиологического раствора, капля получается толстой и три-хомонады быстро "уходят" в глубину капли, что может привести к отрицательным результатам. Количество особей в препарате незначительное, от 1 до 2-3, поэтому нативный препарат следует просматривать тщательно.

При выраженном воспалительном процессе в пародонте с плазма всегда базофильно окрашена, цвет колеблется от нежно-голубого до насыщенно-синего. Она разделена на интенсивно окрашенную с вакуолями и включениями эндоплазму и более просветленную гомогенную эктоплазму в виде узкой полоски по периферии, где никаких включений и вакуолей не обнаруживается. За счет эектоплазмы образуются выросты или псевдоподии. В эндоплазме есть вакуоли, фагоцитированные лейкоциты и бактерии, очень редко эритроциты. Размеры амеб разные. Около 40% экземпляров крупные, превышают лейкоциты.

В мазке, окрашенном метиленовым синим, четко просматривается оболочка амеб, ядро темно-синего цвета, цитоплазма светло-синяя, вакуоли бесцветные.

Характер экссудата влияет на количество амеб. При гнойном экссудате их число возрастает более чем в 2 раза по сравнению с серозным,

Результаты, полученные нами, показали, что 63,9% особей фагоцитируют лейкоциты. В среднем на одну амебу при серозном экссудате приходится по 1,8 фагоцитированному лейкоциту, при гнойном экссудате интенсивность поглощения лейкоцитов возрастает до 2,42. Ядра фагоцитированных лейкоцитов окрашиваются в интенсивный фиолетовый цвет. Эритрофагия и бактериофагия встречаются значительно реже.

У 72,58% особей мы обнаруживали псевдоподии. С увеличением размеров амеб увеличивается частота обнаружения псевдоподий. Аналогичная ситуация наблюдалась и с вакуолями в цитоплазме. Характер экссудата существенно влияет на качественные изменения в структуре простейших: при гнойном экссудате псевдоподии более выражены, иногда их много, вакуоли крупнее.

Выявляемость амеб в мазке и отпечатке одинакова и составляет 98,13%. В отпечатке протисты скапливаются сразу по несколько экземпляров в поле зрения. Так как отпечаток занимает небольшую площадь на предметном стекле, то этот способ приготовления препарата имеет преимущества перед мазком, особенно в тех случаях, когда количество простейших невелико. Однако фон препарата, состоящий из большого скопления лейкоцитов, эпителиальных клеток и обильной микрофлоры, не позволяет детально изучать их морфологию. Этот недостаток отсутствует в мазке, но при этом приходится просматривать большую площадь мазка.

Trichomonas tenax в окрашенном препарате имеют свою специфическую структуру. В 62,82% они округлой формы, несколько реже грушевидной, веретенообразной или в виде усеченной пирамиды. На одном из полюсов имеется ядро, расположенное эксцентрично. Ядро имеет вид косточки сливы, удлиненное у 56,4% экземпляров, округлое у 37-42% простейших. Очень редко оно точечное, каплевидное.

По Романовскому-Гимза ядро окрашивается оксифильно, бледно. Цитоплазма окрашена базофильно, слабо, имеет сетчатую структуру, иногда гомогенная. У единичных особей в цитоплазме встречаются фагоцитированные бактерии. Поглощения лейкоцитов трихомонадами мы не наблюдали.

Несмотря на высказывания некоторых авторов об окрашивании жгутиков и аксостиля краской Романовского, мы не встретили ни одного экземпляра трихомонад, у которых эти органы прокрашивались.

При окраске метиленовым синим ядро трихомонад интенсивно окрашено в синий цвет, протоплазма нежная, сетчатая, светло-синяя, вакуоли бесцветные.

Как и десневые амебы трихомонады имеют вариабельные размеры. Около 40% экземпляров приближаются к размерам лейкоцитов в препарате, остальные либо значительно меньше лейкоцитов, либо несколько превышают их.

Из всех выявленных случаев трихомонадной инвазии в отпечатке протистов обнаруживали в 50,77%, в мазке - 89,23%, Так как количество простейших этого вида в препарате составляет от 1-3 до 15-20, то при их небольшом числе обильный фон в отпечатке не позволяет четко дифференцировать протистов. В мазке же все клеточные элементы разрознены, обособлены друг от друга, поле зрения хорошо просматривается, поэтому даже единичные экземпляры легко идентифицируются. Но для этого необходимо просматривать весь препарат, их поиск представляет определенные трудности.

**3. Культуральное исследование**

П ринцип метода: содержимое пародонтальных карманов засевают в питательную среду и после инкубации микроскопируют раздавленную каплю.

Реактивы и оборудование:

- стерильная корневая игла с турундой;

- предметное и покровное стекла;

- пробирки;

- капилляр или пипетка;

- питательная среда;

- термостат;

- микроскоп.

Забор содержимого пародонтальных карманов производят аналогично предыдущим методам, однако наиболее приемлемым является забор стерильным стоматологическим экскаватором № 2 из глубины кармана. Содержимое смывают в жидкую питательную

среду, которую затем инкубируют в термостате при Т - 37° С.

Культура развивается в течение 3-6 суток. По окончании срока инкубации со дна пробирки капилляром или пипеткой берут

осадок, каплю помещают на предметное стекло, покрывают покровным и микроскопируют с об. 40, ок. 7.

Применяется много питательных сред, но основными ингридиентами их являются физиологический раствор, сыворотка и углеводы.

Рекомендуют использовать простую сывороточную среду. Она проста в приготовлении и дает хороший рост трихомонад. Для ее приготовления берут 9 частей стерильного физиологического раствора, добавляют 1 часть лошадиной или бычьей сыворотки и 1 петлю стерильного рисового крахмала. Среду разливают в стерильные пробирки по 5-10 мл.

Наш опыт по культуралъной диагностике ротовых простейших показал, что простая сывороточная среда не всегда дает положительные результаты. Очевидно, это связано с региональными физико-химическими характеристиками воды, из которой готовят физиологический раствор. Физиологический раствор, приготовленный аптекой, у нас всегда имел рН 5,1 и питательная среда на таком растворе без добавления буферных солей роста трихомонад не давала.

Поэтому мы рекомендуем применять среду Павловой. Способ приготовления: хлористый натрий - 4,25 г, двузамещенный фосфорнокислый натрий /Na2HPO4 X 2 H2O2 , можно и Na2HPO4 X 12 H2O2 - 0,3 г, однозамещенный фосфорнокислый калий / K2HPO4 - 0,23 г, дистиллированная вода - 500,0 мл. Раствор стерилизуют в автоклаве при 1,5 атм в течение 20 минут. Перед засеванием материала раствор разливают в пробирки по 9,5 мл, добавляют О,5 мл лошадиной сыворотки и петлю стерильного рисового крахмала.

В качестве сыворотки применяют нормальную лошадиную сыворотку для приготовления питательных сред или сыворотку лошадиную сухую. Предварительно флакон с нормальной лошадиной сывороткой раскупоривают и оставляет в термостате на 3-е суток для испарения консерванта, а сухую растворяют в дистиллированной воде.

Культуральным методом на среде Павловой десневые амебы выявлены в незначительном числе /3,74% из всех положительных результатов, полученных другими протозоологическими методами/, поэтому для выделения их лучше использовать среду следующего еоетава: физиологический раствор - 1000,0 мл, мясо-пептонный бульон - 20,0 мл, печеночный экстракт -20,0 мл, глюкоза - 2,5 г, Na2HPO4- 0,45 г, K2HPO4 - 0,45 г, рН = 7,4- 7,8, К простерилизованной среде добавляют 10,0 -15,0 мл инактивированной лошадиной сыворотки, разливают в пробирки; по 6— 10,0 мл ив каждую вносят 1-2 петли стерильного рисового крахмала.

Амебы развиваются в щелочной среде, а трихомонады предпочитают кислую.

Рост трихомонад на жидкой питательной среде Павловой выявлен в 76,92% среди всех положительных случаев. Определение в культуре этих простейших не представляет особого труда, посколько в поле зрения скапливается от 5 до 30-50 особей. Незначительная часть ротовых трихомонад имеет тот же вид, что и в нативном препарате. Подавляющее же число особей округляется, приобретает шарообразную форму. В цитоплазме видны заглоченные зерна крахмала. Выбрасывание жгутиков активное, у некоторых крупных трихомонад можно увидеть движе ние ундулирующей мембраны в виде волны, пробегающей по длиннику тела.

**4. Люминесцентная протозооскопия**

Учитывая, что в некоторых случаях протозооскопия окрашенных препаратов не позволяет четко отдифференциовать мелкие особи десневых амеб без фагоцитированых лейкоцитов, вакуолей, псевдоподий от ротовых трихомонад, предложено использовать люминесцентную протозооскопию.

Принцип метода: приготовлений мазок или отпечаток обрабатывают флюоресцирующим веществом, после чего объект, невидимый в ультрафиолетовом свете, приобретает иной цвет.

Оборудование и реактивы:

- корневая игла с турундой;

- предметное стекло;

-фиксатор /10% раствор формалина/;

- флюоорохром /акридин оранжевый 1:10 000/;

- люминесцентный микроскоп.

Содержимое пародонтальных карманов переносят на предметное стекло в виде отпечатка или мазка, высушивают, фиксируют в10% растворе формалина в течение 10 минут, вновь высушивают и окрашивают раствором акридина оранжевого в течение 1 минуты. Микроскопию производят с иммерсионным объективом 90.

Впервые морфологическая характеристика ротовых простейших при помощи люминесцентной микроскопии дана П.С.Флис /1976/.

Десневые амебы, окрашенные флюорохромом, хорошо определяются. Для них характерно темно-зеленое свечение цитоплаз мы и более светло окрашенное ядро.

Ротовые трихомонады тоже имеют специфическое свечение. Цитоплазма окрашивается в кирпично-красный цвет, ядро люминесцирует достаточно ярко белесовато-оранжевым цветом. Четко виден аксостиль, жгутики чаще не определяются.

Лейкоциты, создающие фон препарата, имеют зеленоватый оттенок.

Не всегда ротовые простейшие обнаруживаются сразу всеми методами. Каждый из вышеназванных методов имеет свои преимущества и недостатки.

Протозооскопия нативного препарата в должной мере является объективным методом, однако его применение должно быть непосредственно после взятия материала и любое промедление во времени приводит к снижению двигательной активности трихомонад, что в дальнейшем приведет к затруднению в дифференциации с другими клеточными элементами.

Окрашенный препарат пригоден для выявления десневых амеб, но обильный фон в препарате не позволяет обнаружить единичные экземпляры трихомонад. В препарате, приготовленном в виде мазка, легче находить как десневые амебы, так и трихомонады, но при этом возникает необходимость просмотра большой площади мазка.

Культуральным методом на среде Павловой целесообразно выявлять только Trichomonas tenax. Недостатком метода является меньшая частота выявляемости простейших по сравнению с мазком. Это связано в большей части с техническими погрешностями: мало материала для исследования, помещение материала в не подогретую среду, несоблюдение режима инкубации, рН среды и т.д.



Указанные недостатки компенсируются тем, что диагностику протоинвазии осуществляют параллельно всеми методами.

Техника диагностических протозоологических исследований проста, оборудование и реактивы доступны для лабораторий и стоматологических учреждений любого уровня. Несмотря на это выявление ротовых простейших требует натренированности, терпения и внимания лаборантов.

**Специфическая терапия протоинвазии полости рта**

Терапия пародонтита строится на принципах максимально индивидуализированного комплексного подхода с учетом общего и местного статуса больных. Весь комплекс лечебных мероприятий должен быть направлен на ликвидацию этиологических и патогенетических звеньев развившегося процесса. У больных пародонтитом с инвазией ротовыми трихомонадами среди этих мероприятий важное значение приобретает воздействие на простейших в пародонтальных карманах. С этой целью применяют специфические протистоцидные препараты для местного и общего лечения.

Для местной терапии используют 1% р-р трихопола, 1% р-р трихомонацида, р-р фурацилина 1:5000, 1% р-р мефенамината натрия, 1,5% р-р метиленового синего, 0,5-1% р-р перманганата калия, 40% р-р гексаметилентетрамина. Вышеуказанные препараты вводят в пародонтальные карманы в виде инсталляций и орошений.

При выборе метода введения и экспозиции лекарственного вещества следует учитывать сроки гибели трихомонад.

По данным з.а.флис, И.А.Бенюмовой /1976/ растворы трихопола, трмхомонацида, фурацилина в раздавленной капле культуры протистов оказывают губительный эффект на 30-40 минуте, иногда на 60-й. Следовательно, их рационально оставлять в пародонтальных карманах под повязкой.

Свежеприготовленный 1% р-р мефенамината натрия на 5-18 минуте обездвиживает трихомонады, а хранившийся длительное время оказывает эффект на 20-30-й минуте.

0,5-1% раствор перманганата калия обездвиживает простейших на 10-30-й минуте. Эти вещества целесообразно вводить в виде инстилляций на турундах, при этом необходима частая замена на свежие турунды, так как концентрация лекарств снижается вследствие разбавления слюной, кровью, экссудатом.

Очень удобно иметь в кабинете навески с порошком мефенамината натрия по 0,5 г. Из них легко приготовить свежий 1% раствор /0,5 г порошка растворить в 50,0 мл дистиллированной воды/.

Гексаметилентетрамин /уротропин/ по нашим наблюдениям в большинстве случаев вызывает не только обездвиживание, но и распад трихомонад на протяжении 1-2-х минут. Им можно орошать пародонтальные карманы при помощи распылителя стоматологической установки.

Результаты наших исследований показали, что после воздействия на трихомонад 0,02% раствором декаметоксина основная масса особей прекращает движение на 4-7 минуте, 0,05% раствор хлоргексидина снижает двигательную активность простейших или прекращает ее на 7-10-й минуте.

Несмотря на положительный протистоцидный эффект указанных препаратов в раздавленной капле применение их в клинике не всегда приносит желаемый результат. Очевидно, это связано с труднодоступностью зубодесневых карманов.

Перед внесением лекарственных веществ следует тщательно удалить зубные отложения, провести обильное орошение карманов другими антисептическими средствами. Это будет способствовать механическому вымыванию простейших, микрофлоры, экссудата и таким образом протистоцидные препараты могут непосредственно воздействовать на паразитов.

Чувствительность Trichomonas tenax к лекарственным средствам имеет индивидуальные штаммовые колебания. Для выяснения протистоцидного эффекта назначаемого лекарства мы рекомендуем проводить определение чувствительности ротовых трихомонад в раздавленной капле.



С этой целью каплю штамма Trichomonas tenax9 выращенной на питательной среде, помещают на предметное стекло, покрывают покровным стеклом, добавляют исследуемое лекарственное вещество и исследуют под микроскопом. Сроком гибели простейших считают то время, когда наступил их распад.

Местная терапия не во всех случаях приводит к санации пародонтальных карманов от простейших. Обязательным условием для получения положительного результата является назначение протистоцидных препаратов внутрь.

Наиболее широкое применение получил трихопол /метрони-дазол) Его назначают по 0,25 г 2 раза в день в течение 10 дней или по одной из следующих схем:

1/ 1-й день - 0,5 г 2 раза в сутки; 2-й день - 0,25 г 3 раза в сутки; 3-4-5-6-й день - 0,25 г 2 раза в сутки.

2/ 1-й день и 2-Й день - 0,25 г 4 раза в сутки; 3-й и 4-й день - 0,25 г 3 раза в сутки; 5-6-7-й день - 0,25 г 2 раза в сутки ,

З/ по 0,25 г 4 раза в сутки в течение 5 дней.

Курсовая доза трихопола должна составлять 5,0 г.

Противопоказанием к назначению трихопола являются заболевания кроветворных органов, ЦНС, беременность. Во время приема препарата нельзя употреблять алкоголь, так как при взаимодействии с ним образуется дисульфирам, который способст вует возбуждению и развитию психоза.

В последнее время во всем мире регистрируется увеличение числа штаммов, резистентных к трихополу.

Нитазол /трихоцид, трихолавал/. Назначают по 0,1 г 3 раза в сутки после еды в течение 15 дней. Через 7-10 дней курс повторяют.

Тинидазол /фасижин/. Назначают 4 таблетки по 0,5 г за один прием во время или после еды. Противопоказания к назначению такие же, как и у трихопола.

Макмирор /нифурател/. Помимо протистоцидного эффекта оказывает влияние на смешанную бактериальную флору /стрептококки, стафилококки, кишечная палочка, протей/, грибки {Candida albikans). Активность воздействия на трихомонад в 10 раз выше, чем у метронидазола. Назначают по 3-6 таблеток /по 200 мг/ в день в течение 1-2 недель.

Следует подчеркнуть, что лечение пародонтита протистоцИдными препаратами проводят обязательно в комплексе с другими мероприятиями /консервативными, хирургическими, ортопедическими/. Не устранив пародонтозогенную ситуацию в полости рта, нельзя надеяться на удовлетворительный результат.