

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

« 20 » _____ 2016 г.

Регистрационный номер № 001-0116



МЕТОД ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИИ НЕУТОЧНЕННОЙ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор Новиков Д.К., д.м.н., профессор Новиков П.Д.,
к.м.н., доцент Карпук И.Ю., к.м.н., доцент Смирнова О.В.,
Аляхнович Н.С.

Витебск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
18.03.2016
Регистрационный № 007-0116

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИИ НЕУТОЧНЕННОЙ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Д.К. Новиков, д-р мед. наук, проф. П.Д. Новиков, канд. мед. наук, доц. И.Ю. Карпук, канд. мед. наук, доц. О.В. Смирнова, Н.С. Аляхнович

Витебск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику аллергии неуточненной (Т-78.4), путем сравнения пероксидазной активности в слюне до и после провокационной пробы с аллергенами и гаптенами.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-аллергологов-иммунологов, врачей-лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с симптомами, характерными для аллергических реакций.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ.

1. Центрифуга (3000 об./мин).
2. Стерильные пробирки 10–20 мл (20–30 шт.).
3. Микропробирки 1,5 мл с крышкой (10–20 шт.).
4. Стерильные бумажные фильтры крупной пористости 3,5–4 мкм (10 шт.).
5. Холодильник.
6. Автоматические дозаторы 20–200 мкл.
7. Планшеты полистироловые для иммуноферментного анализа (ИФА).
8. Иммуноферментный анализатор, предназначенный для выполнения иммуноферментного анализа в планшетном формате (спектральный диапазон 340–620 нм).
9. Физиологический раствор хлорида натрия на фосфатном буфере (ФРФ), рН = 7,2, или раствор Хенкса.
10. Фосфат-цитратный буферный раствор с рН = 5,0.
11. Дистиллированная вода.
12. Перекись водорода 0,015% раствор.
13. Хромоген: тетраметилбензидин (ТМБ).
14. Серная кислота 4%.
15. Физиологический раствор хлорида натрия 0,9%.
16. Аллергены (стоматологические материалы, растворы металлов, пищевые добавки, лекарственные средства, раствор экстракта сигарет).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Аллергия неуточненная (Т78.4).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютные противопоказания — обострения аллергических заболеваний или иных хронических заболеваний.

Ограничения к применению:

1. Повреждения и заболевания ротовой полости.
2. Гипосаливация у пациента — менее 1 мл слюны.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Подготовка аллергенов

1.1. Аллергены используют в концентрациях, принятых для кожного тестирования (от 100 до 1000 PNU).

1.2. Стоматологические материалы, входящие в них металлы в виде солей NiCl_2 , CrCl_3 , CoCl_2 , CuCl_2 , TiO_2 , раствор акрила, местные анестетики перед постановкой теста разводят 1:100, 1:1000 стерильным физиологическим раствором натрия хлорида 0,9%.

1.3. Аллергены — красители пищевые и лекарственные 0,002 г в капсулах для перорального применения или 0,2% растворы — для трансбуккального.

1.4. Для приготовления экстракта сигареты используют табак одной сигареты 0,87 г и 5,0 мл стерильного физиологического раствора натрия хлорида 0,9%. Сигарету измельчают, заливают стерильным физиологическим раствором, настаивают 24 ч при комнатной температуре. Затем настой фильтруют. Маточный раствор готов. Хранить в холодильнике при температуре 2–6°C не более 24 ч. Непосредственно перед постановкой теста маточный раствор разводят 1:100 стерильным физиологическим раствором натрия хлорида 0,9%.

2. Провокационный тест

2.1. Забор слюны пациента

2.1.1. Пациент за 12 ч до тестирования не употребляет алкоголь, продукты с кофеином, никотин, противоаллергические лекарственные средства (антигистаминные, глюкокортикостероиды), исключает продукты с высоким гликемическим индексом.

2.1.2. За 1 ч до исследования не принимает пищу.

2.1.3. Пациент полощет рот 100 мл физиологического раствора хлорида натрия 0,9% в течение 10 мин (раствор выплевывает).

2.1.4. Через 10 мин слюну в объеме 1 мл собирают в пробирки Эппендорф, закрывают крышкой (исходная проба № 1).

3. Провокация аллергенами выброса пероксидазной активности лейкоцитами

3.1. Вариант 1. Трансбуккальная проба. Пациент полощет рот растворами аллергенов или токсикантов 100 мл 3 мин (раствор выплевывает).

Вариант 2. Пероральная проба. Пациент принимает перорально 2 мг пищевого красителя в виде порошка, запивает водой.

3.2. Через 40 мин (при варианте 1 или 2) слюну в объеме 1 мл собирают в микропробирки и закрывают крышкой (проба № 2).

4. Ход реакции

- в шесть лунок планшета для ИФА вносят 0,100 мл (100 мкл) дистиллированной воды;

- в первую лунку добавляют 0,100 мл (100 мкл) слюны, собранной до проведения провокационного теста, перемешивают, получается разведение слюны 1:2;

- во вторую лунку вносят 0,100 мл (100 мкл) разведенной (1:2) слюны из первой лунки, перемешивают — разведение 1:4;

- в третью лунку вносят 0,100 мл (100 мкл) разведенной (1:4) слюны из второй лунки, перемешивают — разведение 1:8, 100 мкл выливают;
- процедуру повторяют в такой же последовательности с 4–6 лунками для слюны, полученной после провокационной пробы;
- внесение проявляющего раствора. Во все лунки планшеты для ИФА к разведенной слюне добавляют по 100 мкл хромоген-субстратной смеси (0,015% перекись водорода и ТМБ, разведенные фосфат-цитратным буфером с рН = 5,0). Проявляющий раствор готовят непосредственно перед внесением;
- инкубируют при комнатной температуре в течение 10–25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета;
- реакцию останавливают внесением 50 мкл 4% серной кислоты, цвет раствора изменяется на желтый.

5. Учет результатов

Оценку реакции проводят через 10 мин на фотометре при длине волны 450 нм.

Реакция считается положительной, если оптическая плотность пробы после провокационного теста превышает таковую до провокационного теста не менее чем на 30% и она не меньше 0,600 единиц оптической плотности.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Интенсивное окрашивание в лунке отрицательного контроля:

1. Не допускать недостаточного или избыточного разведения слюны (разводить слюну по инструкции до 1:2, 1:4, 1:8).
2. Проверить правильность приготовления и активности проявляющего раствора.

Одинаковое окрашивание всех лунок опытных проб:

3. Не допускать повреждения лейкоцитов пациентов.