

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2018 г.



Регистрационный номер № 102-1018

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ КОНТАКТНОЙ АЛЛЕРГИИ
НА КЛЕЙКИЕ ВЕЩЕСТВА И ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**
(инструкция по применению)

Учреждение-разработчик:

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Авторы: к.м.н., доцент Карпук И.Ю., Угалев А.Н., к.м.н. Карпук Н.А.

Витебск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
30.11.2018
Регистрационный № 102-1018

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ КОНТАКТНОЙ АЛЛЕРГИИ
НА КЛЕЙКИЕ ВЕЩЕСТВА И ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. И. Ю. Карпук, А. Н. Угалев, канд. мед. наук
Н. А. Карпук

Витебск 2018

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) и контактной, вызванной клейкими (L23.1) или другими химическими веществами (L23.5), путем постановки аппликации мукоадгезивной пленки на слизистую оболочку щеки с мономерами акрилатов и метакрилатов и оценки полученных результатов через 3 ч с момента постановки.

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

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Стерильные пакеты (3 шт.).
2. Холодильник.
3. Производные, мономеры акрилатов и метакрилатов: гидроксиэтилметакрилат (HEMA), уретандиметакрилат (UDMA), бисфенол А-глицидилметакрилат (Bis-GMA), триэтиленгликольдиметакрилат (TEGDMA), этиленгликольдиметакрилат (EGDMA), метилметакрилат (MMA) (далее — испытуемые вещества).
4. Вода очищенная (Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2, с. 309).
5. Метилцеллюлоза (Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2, с. 276).
6. Натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2, с. 276).
7. Вода аммиачная (Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2, с. 70).
8. Этиловый спирт 96 % (Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2, с. 295).
9. Краситель эозин.
10. Ацетат-целлюлозные диски.
11. Весы электронные лабораторные.
12. Ступка фарфоровая с пестиком.
13. Сушильный шкаф.
14. Микроскоп (увеличение x400).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Аллергический контактный дерматит, вызванный клейкими (L23.1) или другими химическими веществами (L23.5).
2. Аллергия неуточненная (Т78.4) (на полимерные материалы).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Наличие везикул, пузырей и язв на слизистой оболочке полости рта (пробы можно ставить только на слизистой оболочке щеки физиологической окраски).

2. Период после острой аллергической реакции 3–4 недели (рефрактерный период).

3. Прием пациентом антигистаминных лекарственных средств, трициклических антидепрессантов, топических стероидов.

Ограничением к применению служит обострение основного и сопутствующих заболеваний.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Изготовление мукоадгезивных пленок с гидрофобным испытуемым веществом.

Для этого к охлажденной до 4 °С дистиллированной воде объемом 25 мл медленно добавляют 0,45 г метилцеллюлозы и 7 капель глицерина, тщательно перемешивают смесь и оставляют на 10 мин для набухания. Затем тонким слоем равномерно насыпают второй компонент – 0,45 г натрий-карбоксиметилцеллюлозы и оставляют для набухания при комнатной температуре на 30 мин. Полученную смесь гомогенизируют и помещают в холодильник при 4 °С на 24 ч. По истечении 1 сут производят повторную гомогенизацию смеси.

Отдельно в каждую готовую основу вводят испытуемое вещество с массовой долей 0,1 %, представленное мономерами акрилатов и метакрилатов и их производными — НЕМА, UDMA, Bis-GMA, TEGDMA, EGDMA, MMA. Полученную смесь перемешивают и разливают на ячейки в силиконовой подложке диаметром 20 мм и помещают в сушильный шкаф при температуре 37 °С на 24 ч. После полного высыхания получают гладкие, прозрачные, эластичные мукоадгезивные пленки в форме диска толщиной 2 мм. Упаковывают пленки в стерильные пакеты. Хранят в холодильнике при температуре от 2 до 5 °С. Обновлять пленки необходимо не реже 14 дней.

2. Слизисто-аппликационное тестирование.

Контрольный тест

Для этого пациент за 1 сут до тестирования не употребляет алкоголь, продукты с кофеином, никотин, за 2-е сут — противоаллергические лекарственные средства (антигистаминные, глюкокортикостероиды), исключает потенциально аллергенные продукты и напитки. За 1 ч до исследования не принимает пищу. Пациент ополаскивает рот водой, а затем полощет рот 50 мл физиологического раствора хлорида натрия 0,9 % в течение 3 мин. Через 10 мин участок слизистой оболочки щеки просушивают струей воздуха и делают отпечаток ацетатно-целлюлозным диском $d = 13$ мм (d пор = 0,45 мкм) в течение 3–5 с (образец 1, контрольная проба).

Провокационный тест с испытуемым веществом

Мукоадгезивную пленку с испытуемым веществом, апплицируют к слизистой оболочке щеки. Через 3 ч образец с испытуемым веществом удаляют. С участка фиксации пленки получают второй отпечаток (образец 2, опытная

проба). В качестве отрицательного контроля используют чистую карбоксиметилцеллюлозную пленку без аллергенов.

3. Подготовка образцов к исследованию.

Диски-отпечатки, полученные до и после воздействия испытуемого вещества, погружают в емкость с ксилолом до полного просветления ацетатно-целлюлозного диска (1 мин). Далее погружают в гематоксилин на 30 мин, последовательно отмывают в двух флаконах: одном — аммиачной воды и одном — дистиллированной. Затем помещают в емкость с эозином (спиртовой раствор на 1–2 с, водный на 20 мин), отмывают в двух флаконах этилового 96 % спиртового раствора, далее помещают на предметное стекло, наносят 1–2 капли полистирола и накрывают покровным стеклом. Световую микроскопию выполняют на микроскопе при увеличении $\times 400$. Счет общего количества нейтрофилов ведут по зигзагу на всей поверхности диска-отпечатка.

4. Учет результатов.

Проба считается положительной в случае, если происходит снижение числа нейтрофилов в опытной пробе по сравнению с контрольной пробой более чем на 20 %.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствуют.

Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа:

1. Несоблюдение условий приготовления и хранения испытуемых веществ.
2. Нарушения технологии выполнения тестирования.

Обоснование целесообразности использования метода

Мономеры акрилатов и метакрилатов являются основными полимеризующими компонентами смол, применяемых при изготовлении полимерных материалов в строительстве, пищевой промышленности, водоснабжении, одежды, обуви, тканей, предметов косметологии, а также в составе биокompозитных имплантатов при реконструктивных операциях, зубных протезов, стоматологических пломбировочных материалов. При биodeградации медицинских полимеров — выделяются различные химические вещества, которые в определенных условиях могут воздействовать на систему иммунитета.

Проблеме непереносимости полимерных материалов посвящен ряд исследований, что указывает на ее высокую актуальность. Отсутствие четко выраженных патогномичных симптомов, характерных только для аллергии на полимерные материалы, не позволяет в большинстве случаев точно установить аллергическую этиологию непереносимости, что мешает адекватной оценке диагностической эффективности методик, предлагаемых для диагностики аллергии.

Одним из методов диагностики аллергии является постановка кожных тестов. Но несмотря на достижения в области диагностики аллергии на металлические компоненты специалисты сталкиваются с проблемой неясных результатов кожных тестов при оценке чувствительности на полимерные материалы; это связано, например, с нерастворимостью и ограниченной диффузией макромолекул полимеров, и как следствие, преодолением клеточного барьера в виде гидрофильно-гидрофобной мембраны поверхностных клеток кожи.

Полость рта — это входные ворота в желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути. Высокая степень проницаемости слизистых оболочек в отношении белков, растворимых в ротовой жидкости и назальном секрете, позволяет быстро презентовать компоненты полимерных материалов (гаптены) эпителиальным клеткам, которые посредством хемокина стимулируют процесс эмиграции через эпителий нейтрофилов. Это является признаком развивающегося аллергического воспалительного процесса.

В настоящее время внутриротовые механизмы диагностики гиперчувствительности слизистой оболочки полости рта на полимерные материалы до конца не изучены. Однако считается, что контакт аллергена со слизистой оболочкой ротовой полости как начального отдела желудочно-кишечного тракта является залогом успешной диагностики, так как провокационные тесты на слизистых оболочках выполняются в шоковом органе, где непосредственно развивается аллергическое воспаление.

Анализ специальной литературы убедительно показывает, что применяется слизисто-десневой тест, однако он рекомендован для диагностики лекарственной аллергии. Данный тест основан на использовании высоких доз предполагаемого аллергена, который представлен в гидрофильной форме. Этот факт ограничивает применение потенциальных полимерных аллергенов, которые представлены нерастворимыми в воде мономерами и сополимерами композитов.

Существует проблема интерпретации слизисто-десневого теста; по нашему мнению, это связано с тем, что аллерген контактирует на всем участке слизистой

оболочки, и при смывах в ротовую жидкость мигрируют клетки с участков хронического воспаления в полости рта, а также не всегда достигается нужная экспозиция.

Кроме того, остается открытым вопрос удержания аллергена на участке слизистой оболочки полости рта для пролонгированного высвобождения аллергена.

Через участки слизистой оболочки дыхательных путей и полости рта в значительной степени осуществляется сенсибилизация организма к компонентам полимерных материалов посредством их биodeградации, наличие мелкодисперсных и летучих соединений в составе при их производстве, а также непосредственном контакте слизистой оболочки со стоматологическими реставрационными и зубопротезными конструкциями. Важнейшими клеточными элементами воспаления и особенно аллергического воспаления в полости рта является наиболее многочисленная популяция — нейтрофилы. При иммунном ответе по замедленному типу, который развивается преимущественно при контактной аллергии, замедляется миграция нейтрофилов из сосудистого русла к поверхностным слоям слизистой оболочки щеки, что особо актуально при выявлении гиперчувствительности к стоматологическим полимерным материалам.

Таким образом, существует необходимость в разработке способа диагностики аллергии на клейкие вещества и полимерные материалы, позволяющего с высокой чувствительностью выявлять сенсибилизацию к ним при помощи длительной внутриротовой аппликации с испытуемым веществом и (или) аллергеном.

УТВЕРЖДАЮ
Зам. главного врача (по мед. части)
УЗ «Витебская областная клиническая больница»

_____ С. В. Огризко

_____ 2018

Отчет о предварительном клиническом испытании метода диагностики контактной аллергии на клейкие вещества и полимерные материалы

Обследовано 22 пациента в возрасте от 32 до 64 лет, из них 4 мужчин и 18 женщин, направленных в клинику кафедр клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО ВГМУ, общей стоматологии с курсами ортопедической стоматологии, ФПК и ПК с аллергонепереносимостью к полимерным материалам, имеющих в анамнезе клинические проявления после контакта с полимерами, входящими в состав накладных акриловых ногтей, синтетических тканей, искусственных кож, галантерейных изделий, бытовых полимерных изделий (смола, лаков, клеев), после постановки в полость рта протезных конструкций из акриловых пластмасс или композитного пломбирочного материала, а также профессионально-контактный дерматит на компоненты полимерных материалов.

Все пациенты указывали на наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов контактного дерматита и фактом контакта с полимеризующими смолами или полимерным материалом.

Группу сравнения составили 22 пациента (3 мужчин и 19 женщин) в возрасте от 32 до 64 лет, имеющие длительный контакт с полимерными изделиями без жалоб на непереносимость полимерных материалов и гиперчувствительности к ним, сопоставимые по типу полимерной конструкции и согласившиеся пройти обследование на наличие гиперчувствительности к полимерным материалам. Сформированные группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Все пациенты, включенные в исследование, собственноручно заполнили добровольное информированное согласие на участие в работе.

Результаты аппликационного адгезивного тестирования слизистой оболочке щеки с использованием мономеров акрилатов и метакрилатов

Количество нейтрофилов в отпечатке со слизистой оболочки щеки до провокационных тестов у пациентов опытной группы и группы сравнения не отличалось ($p > 0,05$).

После провокационных тестов с 1 % гидрофобными аллергенами НЕМА, UDMA, Bis-GMA, TEGDMA, EGDMA, MMA в составе мукоадгезивных пленок количество нейтрофилов в отпечатке у пациентов с клиническими проявлениями дерматита на полимеры достоверно снижалось по сравнению с исходным уровнем, а у лиц группы сравнения показатель практически не изменялся (таблица).

Таблица — Количество нейтрофилов в отпечатке со слизистой оболочки щеки у пациентов до и после провокационного теста (Ме [LQ; UQ])

Группы	До провокации	После провокации НЕМА	После провокации Bis-GMA	После провокации TEGDMA	После провокации EGDMA	После провокации MMA
Опытная (n = 22)	21 [19; 22]	16 [14; 18]*+	17 [16; 19]*+	18 [16; 19]*+	17 [15; 19]*+	16 [14; 17] *+
Контрольная (n = 22)	19 [18; 20]	17 [16; 18]	19 [17; 20]	18 [17; 19]	19 [18; 20]	16 [14;18]
* — отличие между группами с $p < 0,05$; + — отличие внутри группы с $p < 0,05$ до и после провокации.						

Результаты исследования убедительно свидетельствуют о пригодности метода диагностики аллергии на мономеры акрилатов и метакрилатов и их производные при помощи мукоадгезивной пленки с последующей цитологической оценкой количества нейтрофилов в месте контакта со слизистой оболочкой щеки.