

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л.Богдан

2025 г.

Регистрационный номер 112-1124



МЕТОД ПОСТАНОВКИ СУБЛИНГВАЛЬНО-ОРАЛЬНОГО  
ТЕСТА С ОКСИДОМ ТИТАНА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Аляхнович Н.С., к.м.н., доцент Янченко В.В., д.м.н., профессор Ищенко О.В., к.м.н., доцент Гончаров А.Е.

Витебск, 2025

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний и патологических состояний, связанных с гиперчувствительностью к титану и его соединениям.

Метод диагностики предназначен для врачей-аллергологов-иммунологов, врачей-стоматологов, врачей-травматологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с аллергическими реакциями на соединения титана в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

## **1. Показания к применению**

- L23 Аллергический контактный дерматит.
- L25 Контактный дерматит неуточненный.
- L27 Дерматит, вызванный веществами, принятыми внутрь.
- T78.1 Другие проявления патологической реакций на пищу.
- T84 Осложнения, связанные с внутренними
- T85 ортопедическими и другими протезными устройствами, имплантатами, в том числе зубными.
- T88.7 Неуточненная патологическая реакция на лекарственное средство или медикаменты.

## **2. Противопоказания к применению**

- Беременность.
- Хронические заболевания в стадии декомпенсации.
- Психические расстройства и расстройства поведения.
- Острые заболевания и обострения хронических заболеваний.
- Обострение иных аллергических заболеваний.

### **3. Перечень необходимых медицинских изделий и расходных материалов**

1. Весы торсионные или аналитические, позволяющие взвешивать до 500 мг, с ценой деления 0,1-1 мг.
2. Порошок пищевого оксида титана.
3. Микропробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5-2 мл.
4. Планшет плоскодонный полистироловый для иммуноферментного анализа.
5. Автоматические дозаторы, позволяющие отбирать объем жидкости 20-1000 мкл.
6. Наконечники для дозаторов 20-100 мкл.
7. Натрия хлорид, 0,9 % раствор.
8. Тетраметилбензидин (ТМБ) жидкий.
9. Стоп-реагент, готовый к использованию.
10. Центрифуга лабораторная с ускорением 3380 g.
11. Морозильная камера для хранения образцов при минус  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
12. Спектрофотометр, предназначенный для измерения оптической плотности растворов в 96-ти луночных плоскодонных планшетах в спектральном диапазоне измерений от 340 до 700 нм.

#### **4. Технология использования метода**

Проводится медицинский осмотр пациента. Анализируются анамнез заболевания и клинические признаки гиперчувствительности к титану и его соединениям.

##### **4.1. Подготовка к сублингвально-оральному тесту и получение исходных образцов**

Подготовить навеску частиц пищевого оксида титана в количестве 0,002 г, путем взвешивания на торсионных (аналитических) весах.

До тестирования пациент подписывает информированное согласие о проведении сублингвально-оральной пробы с оксидом титана. Проба выполняется натощак. Курение запрещается за 8 часов и во время тестирования. За 1 час до исследования пациент полощет рот питьевой водой в течение 1 минуты (воду выплевывает).

Перед проведением теста проводится визуальный осмотр слизистой полости рта и общеврачебный осмотр.

Ротовую жидкость в объеме по 0,5-1 мл собирают в 2 микропробирки типа Эппендорф, закрывают крышкой, маркируют как исходную пробу «До<sub>рж</sub>».

#### **4.2. Постановка сублингвально-орального теста с оксидом титана**

Навеску 0,002 г пищевого оксида титана в виде порошка высыпают под язык. Наблюдение за пациентом проводится в течение 20 минут. Визуально оценивают состояние слизистой оболочки полости рта, проводят общеврачебный осмотр.

Через 40 минут повторно собирают ротовую жидкость в объеме по 0,5-1 мл в 2 микропробирки типа Эппендорф, закрывают крышкой, маркируют с указанием слова «После<sub>рж</sub>».

#### **4.3. Подготовка образцов ротовой жидкости для дальнейших исследований**

Собранные образцы ротовой жидкости «До<sub>рж</sub>» и «После<sub>рж</sub>» центрифугируют в течение 10 минут при  $g=3380$ , переносят полученный супернатант в чистые микропробирки типа Эппендорф, с маркировкой «До» и «После» соответственно. При необходимости взятия образцов от нескольких пациентов образцы хранят при температуре минус  $20 \pm 1$  °С.

#### **4.4. Оценка результата сублингвально-орального теста**

Оценка пероксидазной активности образцов супернатанта ротовой жидкости «До» и «После» сублингвально-орального теста производится в

лунках планшета плоскодонного полистиролового для иммуноферментного анализа в единицах оптической плотности. Используются неразведенные и разведенные в 2, 4, 8 раз в 0,9% растворе натрия хлорида образцы в триплетах для каждого разведения.

Внесение и разведение образцов производится в соответствии со схемой (приложение 1).

Во все лунки планшета с внесенными образцами добавляют по 100 мкл тетраметилбензидина. Лунки с супернатантом ротовой жидкости постепенно окрашиваются в синий цвет.

Планшет оставляют в темном месте на 10 минут.

Через 10 минут во все задействованные лунки вносят по 25 мкл стоп-реагента.

Через 5 минут измеряют оптическую плотность проб при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра.

Вычисление пероксидазной активности проб до и после сублингвально-орального теста производят по изменению оптической плотности образцов «После», по сравнению с образцами «До».

Вычисляют среднее значение оптической плотности (ОП) в триплетах неразведенных и разведенных в 2, 4, 8 раз образцов «До» и «После».

При оптической плотности пробы менее 0,6 единиц образец исключается из расчета.

Изменение пероксидазной активности ( $\Delta_{ПА}$ ), %, рассчитывается по формуле:

$$\Delta_{ПА} = (\text{ОП пробы «После»} - \text{ОП пробы «До»}) / \text{ОП пробы «До»} \times 100\%,$$

где  $\Delta_{ПА}$  - изменение пероксидазной активности, ОП - среднее значение оптической плотности, «До» и «После» – образцы супернатанта,

полученные из проб ротовой жидкости до и после сублингвально-оральной пробы соответственно.

Пероксидазная активность ротовой жидкости может увеличиваться или уменьшаться после сублингвально-орального теста.

#### **4.5. Установление диагноза гиперчувствительности к титану и его соединениям**

Диагноз устанавливается при увеличении пероксидазной активности ротовой жидкости после провокационного сублингвально-орального тестирования с оксидом титана на 15% и более и высокой вероятности гиперчувствительности к титану и его соединениям.

Если пероксидазная активность ротовой жидкости уменьшилась или увеличилась менее чем на 15% после сублингвально-орального тестирования, диагноз не подтверждается.

#### **5. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения**

При соблюдении технологии использования метода осложнения и ошибки маловероятны. Тестирование должно проводиться персоналом с необходимой квалификацией. Обязательно наличие противошоковой аптечки.

**Схема внесения образцов супернатанта ротовой жидкости в лунки планшета**

Схема внесения проб представлена в таблице:

1. По 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида (NaCl) в триплетах помещается в лунки рядов В, С, D, F, G, H планшета плоскодонного полистиролового для иммуноферментного анализа.

2. Проба «До» объемом 100 мкл в триплетах помещается в лунки рядов А и В, проба «После» вносится в лунки рядов Е и F (название лунок фиксируется).

3. В лунках второго ряда (В1, В2, В3) с внесенным NaCl и пробой «До» чистым наконечником содержимое перемешивается дозатором, таким образом проба «До» разводится в 2 раза (проба «До<sub>2</sub>»).

4 Из каждой лунки второго ряда (В1, В2, В3) с пробой «До<sub>2</sub>» чистым наконечником забирается по 100 мкл и вносится в лунки третьего ряда (С1, С2, С3), перемешивается дозатором, таким образом проба «До» разводится в 4 раза (проба «До<sub>4</sub>»).

5. Из каждой лунки третьего ряда (С1, С2, С3) с пробой «До<sub>4</sub>» чистым наконечником забирается по 100 мкл супернатанта и вносится в лунки четвертого ряда (D1, D2, D3), перемешивается дозатором, таким образом проба «До» разводится в 8 раз (проба «До<sub>8</sub>»).

6. Из каждой лунки четвертого ряда (D1, D2, D3) с пробой «До<sub>8</sub>» чистым наконечником забирается по 100 мкл и удаляется.

7. Пункты 3-6 повторить для проб «После» с заполнением рядов F, G, H.

Таблица 1. Схема внесения образцов «До» и «После» супернатанта ротовой жидкости в лунки планшета

	1	2	3
A	100 мкл «До»	100 мкл «До»	100 мкл «До»
B	100 мкл NaCl + 100 мкл «До» (разведение в 2 раза)	100 мкл NaCl + 100 мкл «До» (разведение в 2 раза)	100 мкл NaCl + 100 мкл «До» (разведение в 2 раза)
C	100 мкл NaCl + 100 мкл «До <sub>2</sub> » из лунки B1 (разведение в 4 раза)	100 мкл NaCl + 100 мкл «До <sub>2</sub> » из лунки B2 (разведение в 4 раза)	100 мкл NaCl + 100 мкл «До <sub>2</sub> » из лунки B3 (разведение в 4 раза)
D	100 мкл NaCl + 100 мкл «До <sub>4</sub> » из лунки C1 (разведение в 8 раз)	100 мкл NaCl + 100 мкл «До <sub>4</sub> » из лунки C2 (разведение в 8 раз)	100 мкл NaCl + 100 мкл «До <sub>4</sub> » из лунки C3 (разведение в 8 раз)
E	100 мкл «После»	100 мкл «После»	100 мкл «После»
F	100 мкл NaCl + 100 мкл «После» (разведение в 2 раза)	100 мкл NaCl + 100 мкл «После» (разведение в 2 раза)	100 мкл NaCl + 100 мкл «После» (разведение в 2 раза)
G	100 мкл NaCl + 100 мкл «После <sub>2</sub> » из лунки F1 (разведение в 4 раза)	100 мкл NaCl +100 мкл «После <sub>2</sub> » из лунки F2 (разведение в 4 раза)	100 мкл NaCl + 100 мкл «После <sub>2</sub> » из лунки F3 (разведение в 4 раза)
H	100 мкл NaCl + 100 мкл «После <sub>4</sub> » из лунки G1 (разведение в 8 раз)	100 мкл NaCl + 100 мкл «После <sub>4</sub> » из лунки G2 (разведение в 8 раз)	100 мкл NaCl + 100 мкл «После <sub>4</sub> » из лунки G3 (разведение в 8 раз)

Примечание: NaCl – 0,9% раствора натрия хлорида, «До», «После» – образцы супернатанта ротовой жидкости, полученные до и после сублингвально-орального теста, «До<sub>2</sub>», «До<sub>4</sub>», «После<sub>2</sub>», «После<sub>4</sub>» – образцы разведенного в 2 и 4 раза супернатанта ротовой жидкости, полученные до и после сублингвально-орального теста.