

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

2024 г.



Регистрационный № 023-0424

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
КОМПОНЕНТАМ ВАКЦИН ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ АНТИГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО
ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Щурок И.Н., д.м.н., профессор Ищенко
О.В., к.м.н., доцент Семенова И.В.

Витебск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения гиперчувствительности к компонентам вакцин для диагностики аллергии на введение вакцин с использованием реакции антиген-индуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ).

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей аллергологов-иммунологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, проводящих вакцинацию в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

Показания к применению

Аллергические реакции на введение вакцин (острая аллергическая реакция, ангионевротический отек, одышка и т.д.) в анамнезе.

Тяжелые аллергические реакции в анамнезе.

Противопоказания

Прием иммунодепрессантов или кортикостероидов системного действия.

Перечень необходимых медицинских изделий, расходных материалов и лекарственных средств

1. Одноразовые пластиковые вакуумные пробирки для взятия крови с гепарином натрия; цвет крышки пробирок: зеленый, вместимостью 6,0 мл.
2. Центрифуга лабораторная с центробежным ускорением 3380 g.
3. Счетная камера Горяева.
4. Стеклообразные центрифужные пробирки вместимостью 10 мл.
5. Стеклообразная палочка.
6. Термостат, позволяющий поддерживать температуру $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$

7. Автоматические дозаторы, позволяющие отбирать объем жидкости 20 – 1000 мкл.
8. Пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5мл.
9. Световой микроскоп с объективами 10/0,25 или 20/0,4.
10. 0,9% раствор натрия хлорида.
11. 0,1% раствор трипанового синего.
12. 0,85% раствор хлорида аммония.
13. Полисорбат 80 (Твин 80), или полиэтиленгликоль 2000 (ПЭГ 2000), или иные вспомогательные компоненты вакцин.

Описание технологии применения метода с указанием этапов

Этапы метода:

1. Взятие венозной крови пациента утром натощак в одноразовые пластиковые вакуумные пробирки с гепарином натрия вместимостью 6,0 мл.
2. Подготовка клеточной суспензии для проведения теста:
 - 2.1 Инкубация крови в пробирке, которая наклонена под углом 45⁰ в термостате, в течение 30-40 минут для отделения плазмы крови.
 - 2.2 Плазма в объеме 1 мл переносится в стеклянную центрифужную пробирку.
 - 2.3 К плазме добавляется 1 мл 0,85% раствора хлорида аммония для лизиса эритроцитов в течение 1 минуты.
 - 2.4 Отмывание лейкоцитов:
 - 2.4.1 смесь центрифугируют при 1000 оборотах (3380 g) в течение 5 мин;
 - 2.4.2 отделяют надосадочную жидкость путем декантации, к осадку добавляют 0,9% раствор хлорида натрия объемом 5 мл;

2.4.3 суспензию центрифугируют при 1000 оборотах (3380 g) в течение 5 мин;

2.4.4 отделяют надосадочную жидкость путем декантации, к осадку добавляют 5 мл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия;

2.4.5 суспензию центрифугируют при 1000 оборотах (3380 g) в течение 5 мин.

3. Добавление потенциального аллергена

3.1 В 2 пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл помещают по 100 мкл суспензии лейкоцитов и в каждую пробирку добавляют 100 мкл полисорбата 80 (Твин 80) или полиэтиленгликоля 2000 (ПЭГ 2000), или иные вспомогательные компоненты вакцин в разведении (Приложение 1).

3.2 Тест-контроль: в пробирке типа Эппендорф к 100 мкл суспензии лейкоцитов добавляют 100 мкл 0,9% раствора хлорида натрия.

4. После инкубации в термостате в течение 30-40 минут добавляют 100 мкл 0,1% раствора трипанового синего, смесь ресуспендируют стеклянной палочкой.

5. Учет и интерпретация результатов

На стекло камеры Горяева наносится 1 капля полученной суспензии для подсчета клеток: неокрашенных (живых) и окрашенных (поврежденных) лейкоцитов.

Цитотоксический индекс (ЦИ) высчитывают по формуле:

$$ЦИ = \frac{a-b}{a} \times 100\%, \quad (1)$$

где: a – количество живых клеток на 100 клеток в поле зрения в контроле после инкубации с 0,9% физиологическим раствором хлорида натрия); b – количество живых клеток на 100 клеток в поле зрения после инкубации с аллергеном.

Если цитотоксический индекс больше 15%, то результат считается положительным, что указывает на наличие гиперчувствительности лейкоцитов к испытываемому антигену и является критерием диагностики аллергии на введение вакцин.

При получении положительных результатов с вспомогательными компонентами необходимо отказаться от применения вакцин и лекарственных средств, содержащих данные компоненты.

Результаты оценки регистрируют в листке регистрации (Приложение 2).

Возможные ошибки и их устранение

При соблюдении техники использования метода осложнения и ошибки маловероятны.

Приготовление растворов вспомогательных компонентов вакцин для проведения лабораторного аллергологического тестирования.

1. Полисорбат 80 (Твин 80) - 20% w/v

20 мг полисорбат 80 (Твин 80) + 100 мл вода для инъекций

2. ПЭГ 2000 - 50% w/v

50 мг полиэтиленгликоль 2000 (ПЭГ 2000) + 100 мл вода для инъекций

Листок регистрации

Тест с _____

ФИО _____

Дата _____ 20__ г.

Наименование компонентов вакцин	Оценка реакции (цитотоксический индекс, %)
Вещество 1	
Вещество 2	
Контроль	

Заключение: тест

Подпись врача _____

Подпись пациента _____