

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

09.08.2012

Регистрационный № 004-0112

**МЕТОД ИММУНИЗАЦИИ БЕРЕМЕННЫХ ЛИМФОЦИТАМИ МУЖА  
В ЛЕЧЕНИИ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УЗ «Могилевская областная станция переливания крови», УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: Е.И. Антух, канд. мед. наук, доц. И.В. Смирнова, Т.Ф. Шепило

Витебск 2011

Предлагаемый метод иммунизации женщины аллогенными лимфоцитами мужа разработан с целью предотвращения развития нарушений репродуктивной функции женщин и будет способствовать оптимизации тактики ведения беременности у пациенток с высоким риском невынашивания и предназначен для врачей-акушеров-гинекологов.

Область применения: акушерство и гинекология.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Лабораторное оборудование: термостат, центрифуга, инвертированный флуоресцентный микроскоп, стерильная лабораторная посуда: пробирки 10 мл, микропланшеты, микрошприцы Hamilton.

2. Микропланшеты с типизирующими сыворотками, содержащими анти-HLA антитела.

3. Комплемент.

4. Раствор акридинового оранжевого/этидия бромид.

5. Гепарин, урографин, буферный раствор (PBS).

6. Контейнер для заготовки 400 мл крови, плазмоэкстрактор.

7. 6% раствор полиглюкина, 10% раствор глюкозы.

8. Оборудование для исследования общего анализа крови; группы крови и резус-принадлежности.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Беременность у женщины, в анамнезе которой имеются 2 и более самопроизвольных аборта в сроках беременности до 12 недель, женщины, у которых 2 и более неудачных попытки ЭКО в анамнезе, женщины с идиопатическим бесплодием.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Наличие в крови мужа антител к вирусу гепатита С, поверхностного антигена вируса гепатита В, антител к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов и антигена Р24 ВИЧ-1, суммарных антител классов G и M к возбудителю сифилиса. Аутоиммунные заболевания супругов.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Методика отбора состоит из основного диагностического протокола, который проводится всем беременным, и дополнительных, выборочных исследований. Беременных в анамнезе имеющих два и более самопроизвольных аборта в сроках беременности до 12 недель, обследуют для исключения антифосфолипидного синдрома, генетических аномалий, эндокринных нарушений. При отсутствии выявляемой патологии и причин невынашивания беременности супружеские пары направляются для определения антигенов HLA первого класса локусов ABC.

Определение антигенов НЛА первого класса у супружеских пар проводится микролимфоцитотоксическим методом. Перед микролимфоцитотоксическим тестом готовят лимфоциты мужчины и женщины. Для этого в пробирку с 20 мкл гепарина набирают 9 мл крови биологического отца ребенка, добавляют 50 мг карбонильного железа, перемешивают и инкубируют 30 мин в термостате при 37°C, периодически перемешивая. После этого разводят данный образец крови буферным раствором в соотношении 1:2 (1 часть крови, 2 части буферного раствора). В отдельную химическую пробирку помещают 5–7 мл лимфофлота и наслаивают на него разведенный образец крови, затем центрифугируют при 2700 оборотов 13 мин. Полученные лимфоциты переносятся в центрифужную пробирку и перемешиваются с буферным раствором, после повторного центрифугирования концентрация лимфоцитов в буферном растворе доводится до  $2-2,5 \times 10^3$ /мл. Таким же образом выделяют и лимфоциты женщины.

Микролимфоцитотоксический тест проводится по следующей методике: типизирующую панель размораживают при комнатной температуре непосредственно перед использованием. Приготовленную взвесь лимфоцитов вносят в количестве 1 мкл в каждую лунку типизирующей панели под масло (реакция антиген-антитело) и инкубируют 45 мин при комнатной температуре. Смешивают 1 мл комплемента с 50 мкл основного красящего раствора, добавляют по 5 мкл полученного разведения в каждую лунку. Инкубируют 60 мин в темноте при комнатной температуре, останавливают реакцию добавлением 5 мкл 1% раствора туши в каждую лунку. Результаты учитывают с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа.

Для процедуры иммунизации отбираются пары, у которых совпали два и более антигенов лимфоцитов в локусах А и В. Перед иммунизацией муж как предполагаемый донор лимфоцитов обследуется согласно инструкции по обследованию доноров крови и ее компонентов. Выполняются тесты на наличие в сыворотке крови антител к вирусу гепатита С, определяется поверхностный антиген вируса гепатита В, антитела к вирусу иммунодефицита человека первого и второго типов и антигена Р24 ВИЧ-1, суммарные антитела классов G и M к возбудителю сифилиса. Все вышеуказанные тесты выполняются методом иммуноферментного анализа. Кровь обоих супругов обследуется на групповую принадлежность по системе АВО, типирование эритроцитов на наличие антигенов системы резус, наличие антигена Келл. Эти исследования проводятся методом прямой агглютинации с использованием моноклональных реагентов соответствующей специфичности.

Перед процедурой жена предупреждается о возможных негативных последствиях иммунизации лимфоцитами мужа и подписывает информационное согласие на проведение медицинской манипуляции.

Получение лейковзвеси для иммунизации проводится по следующей технологии: в условиях соблюдения асептики из контейнера для заготовки 400 мл крови удаляют стерильным одноразовым шприцем 55% объема находящегося в контейнере консерванта и вводят в контейнер 20 мл 6% стерильного раствора полиглюкина. В этот контейнер заготавливают 170 мл крови биологического отца. Контейнер помещают в

термостат при температуре 37°C на 1 ч. После экспозиции полученную надосадочную жидкость с помощью плазмоекстрактора отжимают в стерильный контейнер без консерванта. Затем из контейнера жидкость переносят в стерильные центрифужные пробирки. Пробирки центрифугируют при 1500 об./мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость из пробирок удаляют стерильным шприцем. В первую пробирку добавляют 1,5 мл 10% раствора глюкозы, после перемешивания раствор переносят в следующую пробирку, снова перемешивают и переносят в следующую и так до последней пробирки. Количество используемых пробирок зависит от объема снятой надосадочной жидкости после экспозиции контейнера с кровью в термостате. Обычно объем составляет от 30 до 40 мл, поэтому используется от 4 до 6 пробирок объемом 10 мл, пробирки наполняются по 8 мл. Полученная взвесь является взвесью для иммунизации.

#### **Методика иммунизации**

Методика иммунизации и реиммунизации осуществляется следующим образом: в условиях соблюдения асептики взвесь для иммунизации женщине вводится внутривенно в верхнюю наружную треть плеча (8–10 папул). Папулы делают инсулиновым шприцем, объем одной папулы 0,1–0,2 мм. На место введения накладывается стерильная повязка, 3–4 дня следует избегать попадания воды.

#### **Сроки иммунизации**

В течение беременности существуют периоды с высокой степенью вероятности прерывания: 6–17; 21–22 и 29–30 недель. За 2 недели перед каждым критическим сроком необходимо исследовать сыворотку крови беременных на анти-HLA активность и при отсутствии антител вводить лимфоциты.

#### **Сроки реиммунизации**

Через 14 дней после иммунизации и в последующем при реиммунизации сыворотка крови женщины обследуется на анти-HLA активность методом комплементзависимой цитотоксичности. Если антитела к антигенам лимфоцитов биологического отца не выявляются, то процедура введения лимфоцитов повторяется.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При соблюдении технологии приготовления лимфоцитов ошибки исключены. Из осложнений возможна аллергическая реакция в месте введения лимфоцитов. Предварительная пробная инъекция лимфоцитов мужа при возникновении аллергической реакции устранил риск развития данного осложнения.