

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
\_\_\_\_\_ Д.П.Пиневич  
23.12.2011г.  
Регистрационный № 118-1111



## МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НАРУШЕНИЙ ПОСТНАТАЛЬНОЙ АДАПТАЦИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ:

к.м.н. доцент Вильчук К.У., к.м.н. доцент Гнедько Т.В., Паюк И.И.

Минск 2011

В настоящее время иммунофенотипирование клеток крови с применением метода проточной цитометрии является «золотым стандартом» в диагностике аутоиммунных и инфекционных заболеваний. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови позволяет оценить тяжесть воспалительного процесса, состояние клеточного иммунитета и прогнозировать течение заболевания.

Дети от женщин с нарушениями репродуктивного здоровья составляют группу риска по развитию перинатальной патологии. Данная группа новорожденных не выделена в отдельную категорию наблюдения, а комплексная оценка их развития, объем и состав лабораторно-инструментального обследования проводится без учета факторов риска развития и реализации патологии со стороны органов и систем (центральная нервная система, иммунная). Исходя из этого, для практической педиатрии существенное значение имеет раннее определение доклинических параметров, характеризующих вероятность формирования патологии и ее прогнозирование у данной когорты детей.

### **1. Показания к применению:**

Новорожденные, а также младенцы, рожденные после применения методов вспомогательных репродуктивных технологий.

### **2. Перечень необходимого оборудования, изделий медицинского назначения и инструментария, реактивов, лекарственных средств.**

Медицинское и лабораторное оборудование для оценки иммунного статуса новорожденного ребенка должно соответствовать приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь №1044 от 14.11.2008. «Об утверждении примерного табеля оснащения изделиями медицинского назначения и медицинской техники амбулаторно-

поликлинических и больничных организаций здравоохранения».

Показания для исследования иммунного статуса в стационарном учреждении III-IV уровня перинатальной помощи определены приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь №81 от 28.01.2011 «Об утверждении клинических протоколов диагностики, реанимации и интенсивной терапии в неонатологии».

### **3. Описание технологии использования метода прогнозирования нарушений постнатальной адаптации у новорожденных детей.**

3.1 Методика исследования субпопуляционного состава лимфоцитов

У новорожденного ребенка на 3-4 сутки жизни исследуют гематологические показатели периферической крови (лейкоциты и лимфоциты), далее производят забор венозной крови в количестве 1 мл для исследования фенотипирования лимфоцитов. Для исследования субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной цитометрии требуется свежая (24 часа) венозная кровь, с солью EDTA в качестве антикоагулянта. В пробирку для анализа клинических образцов добавляют конъюгат антител, затем добавляют 100 мкл цельной венозной крови и перемешивают на вортексе. Инкубируют в течение 15-20 минут при комнатной температуре +18-25 С в защищенном от света месте. Добавляют лизирующий раствор и перемешивают на вортексе в течение 1 секунды, снова инкубируют 10 минут и добавляют 2 мл буферного раствора. Подсчет результатов проводят на проточном цитометре.

Для получения абсолютных значений сочетают результаты гематологические показатели периферической крови и проточной цитометрии, используется формула: абсолютное значение (клеток/ мл) =

общее количество лейкоцитов (клеток/ мл) x% лимфоцитов x% положительно окрашенных клеток/ $10^4$ .

### 3.2 Оценка результатов исследования популяционного состава лимфоцитов

Для оценки клеточного состава лимфоцитов используется относительное и абсолютное число иммунокомпетентных клеток:

Общие Т - лимфоциты определяются с помощью моноклональных антител к CD3+ антигенам. Уровень Т хелперов (Тх) и Т цитотоксических (Тц) лимфоцитов определяется с помощью моноклональных антител CD3+/CD4+ (Тх), CD3+/CD8+ (Тц) антигенам, соответственно. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) - соотношение CD3+/CD4+ (Тх), CD3+/CD8+ (Тц). Общее количество В лимфоцитов определяется с помощью моноклональных антител к антигенам CD 19+. Маркер натуральных киллеров - с помощью моноклональных антител CD56+.

Оценка результатов исследования популяционного состава лимфоцитов проводится в соответствии с перцентильной таблицей, включая разработанные данные, полученные у здоровых доношенных новорожденных детей (табл.1).

Таблица 1 - Перцентильное распределение показателей клеточного состава лимфоцитов у здоровых новорожденных на 4-5 сутки жизни

Показатель	3	10	25	50	75	90	97
1	2	3	4	5	6	7	8
Лейкоциты $\times 10^9$ /л	9,4	10,4	11,5	13,5	15,6	21,5	23,5
Лимфоциты (%)	21,5	25,2	31	47	53	58,4	65
CD3+(%)	67,7	77,3	82	84,7	87,9	90,6	96
CD3+(abc)	0,99	1,6	2	2,5	3,4	5,3	6,3
CD3+/ CD4+ (%)	51,3	54,7	59,5	63,3	70,2	77,8	79,3
CD3+/ CD4+ (abc)	0,79	1,04	1,5	1,8	2,7	3,68	3,91
CD3+/ CD8+ (%)	12,4	15,7	17,9	20,8	25,4	32,7	33,8
CD3+/ CD8+ (abc)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,85	1,28	1,30

Продолжение таблицы 1							
1	2	3	4	5	6	7	8
CD19+(%)	2,48	5,4	7,4	8,8	11,9	15,9	20,2
CD19+(abc)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,58	1,04
CD56+(%)	0,3	0,62	0,9	1,8	3,2	4,28	4,51
CD56+(abc)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,13	0,2	0,26
CD4+/CD8+	1,79	2,22	2,6	3	4	5,12	5,91

I

Оценка результатов исследования популяционного состава лимфоцитов у детей, рожденных после применения метода ЭКО, проводится в соответствии с перцентильной таблицей, включая разработанные данные, полученные у данной категории детей (табл.2).

Таблица 2 Перцентильное распределение показателей клеточного состава лимфоцитов у детей, рожденных после применения метода ЭКО на 4-5 сутки жизни

Показатель	3	10	25	50	75	90	97
Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	7,92	8,86	10,8	11,9	14,4	15,6	17,5
Лимфоциты (%)	22,6	33,6	42	49	58	60,4	62,8
CD3+(%)	60,7	72,7	81,8	85,4	89,5	92,3	93,2
CD3+(abc)	1,84	2,17	2,8	3,97	5	6,13	8,72
CD3+/ CD4+ (%)	45,1	52,6	60,7	66	69,9	73,2	77,8
CD3+/ CD4+ (abc)	1,4	1,6	2,2	2,76	3,5	4,97	6,5
CD3+/ CD8+ (%)	14,1	15,7	18,2	23,2	26,5	32,5	37,5
CD3+/CD8+ (abc)	0,33	0,5	0,7	1	1,6	2,06	3,47
CD19+(%)	4,69	5,13	7,55	8,6	11,9	13,54	16,41
CD19+(abc)	0,15	0,22	0,3	0,48	0,7	0,98	1,1
CD56+(%)	0,7	0,82	1,25	2,35	3,7	4,4	5,6
CD56+(abc)	0,02	0,04	0,06	0,13	0,2	0,37	0,63
CD4+/CD8+	1,66	1,83	2,20	2,8	3,95	4,53	5,01

На основании результатов исследования здоровых детей и рожденных после применения метода ЭКО, дифференциально-диагностическими значениями, характеризующими нормальные и патологические показатели, являются:

- абсолютное содержание клеточного состава лимфоцитов CD3+ абс выше 3,7 (специфичность теста 78,8%, чувствительность 62,5%,  $P < 0,03$ );

CD4+абс выше 2,1 (специфичность теста 60,6%, чувствительность 81,2%,  $p < 0,004$ );

- CD8+абс выше 0,7 (специфичность теста 69,7%, чувствительность 81,2%,  $p < 0,001$ );

CD19+абс выше 0,36 (специфичность теста 63,6%), чувствительность 81,2%,  $p < 0,0003$ );

CD56+абс выше 0,08 (специфичность теста 63,6%», чувствительность 93,7%»,  $p < 0,03$ ).

Установление вышеперечисленных значений у новорожденного ребенка свидетельствует о высокой вероятности развития нарушений его постнатальной адаптации и требует перевода в специализированное отделение для дальнейшего наблюдения и обследования.

**4. Перечень возможных осложнений:** нет

**5. Противопоказания к применению:** нет.