

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
18.11.2011
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: канд. мед. наук, доц. К.У. Вильчук, канд. мед. наук, доц. Т.В. Гнедько,
И.И. Паюк

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 развития 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Медицинское и лабораторное оборудование для оценки иммунного статуса новорожденного 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».

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Методика исследования субпопуляционного состава лимфоцитов

У новорожденного ребенка на 3–4-е сут 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 ч) венозная кровь с солью EDTA в качестве антикоагулянта. В пробирку для анализа клинических образцов добавляют конъюгат антител, затем 100 мкл цельной венозной крови и перемешивают на

вортексе. Инкубируют в течение 15–20 мин при комнатной температуре +18–25 °С в защищенном от света месте. Добавляют лизирующий раствор и перемешивают на вортексе в течение 1 с, снова инкубируют 10 мин и добавляют 2 мл буферного раствора. Подсчет результатов проводят на проточном цитометре.

Для получения абсолютных значений сочетают гематологические показатели периферической крови и проточной цитометрии, используя формулу: абсолютное значение (клеток/мл) = общее количество лейкоцитов (клеток/мл) × % лимфоцитов × % положительно окрашенных клеток/10⁴.

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 к 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 CD19+; 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 (таблица 1).

Таблица 1 — Перцентильное распределение показателей клеточного состава лимфоцитов у здоровых новорожденных на 4–5-е сут жизни

Показатель	3	10	25	50	75	90	97
Лейкоциты ×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+, абс.	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+, абс.	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+, абс.	0,3	0,4	0,5	0,6	0,85	1,28	1,30
CD19+, %	2,48	5,4	7,4	8,8	11,9	15,9	20,2
CD19+, абс.	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+, абс.	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

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 (таблица 2).

Таблица 2 — Перцентильное распределение показателей клеточного состава лимфоцитов у детей, рожденных после применения метода ЭКО на 4–5-е сут 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+, абс.	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+, абс.	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+, абс.	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+, абс.	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+, абс.	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 обследования здоровых детей и рожденных после применения метода ЭКО рассчитаны дифференциально-диагностические значения, характеризующиеся нормальными и патологическими показателями:

- абсолютное содержание клеточного состава лимфоцитов CD3+ абс.с выше 3,7 (специфичность теста — 78,8%, чувствительность — 62,5%, $p < 0,03$);
- CD4+ абс. выше 2,1 (специфичность — 60,6%, чувствительность — 81,2%, $p < 0,004$);
- CD8+ абс. выше 0,7 (специфичность — 69,7%, чувствительность — 81,2%, $p < 0,001$);
- CD19+ абс. выше 0,36 (специфичность — 63,6%, чувствительность — 81,2%, $p < 0,0003$);
- CD56+ абс. выше 0,08 (специфичность — 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.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствует.