



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.4.012>
УДК 616.155.194.18-07-053.31



Дикая Т.В.¹, Козлякова О.В.^{✉1}, Артюшевская М.В.^{2,3}, Сухарева А.П.³, Скурко И.А.³,
Климович О.В.¹, Заяц И.А.¹, Цыганкова О.В.¹

¹Городской центр трансфузиологии 6-й городской клинической больницы,
Минск, Беларусь

²Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

³Клинический родильный дом Минской области, Минск, Беларусь

Интегрированный подход к диагностике гемолитической болезни новорожденного по системе АВО: клинический случай

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция статьи, редактирование, обработка, написание текста – Дикая Т.В., Козлякова О.В., Артюшевская М.В., Сухарева А.П., Климович О.В., Цыганкова О.В.; сбор материала и его обработка – Скурко И.А., Заяц И.А.

Информированное согласие: авторы имеют подписанные информированные согласия на анонимное опубликование данных в медицинском издании.

Подана: 08.07.2024

Принята: 01.11.2024

Контакты: olga-kozlyakova@yandex.by

Резюме

Введение. Для своевременной диагностики генеза и прогнозирования гемолитической болезни новорожденного по системе АВО важна комплексная интерпретация как лабораторных, так и клинических показателей.

Цель. Представить клинический случай интегрированного подхода к диагностике гемолитической болезни новорожденного.

Материалы и методы. Проведен динамический анализ лабораторных и клинических данных у беременной женщины и ее ребенка с гемолитической болезнью новорожденного.

Результаты. При иммуногематологическом исследовании крови беременной Ш. было установлено: группа крови по системе АВО – O(I), по системе Rh – антиген D-отрицательный, Rh-фенотип – Ccddee. В сыворотке крови матери определяли группоспецифические антитела с применением гелевых технологий в автоматическом режиме (с использованием автоматического иммуногематологического анализатора IH-500) анти-A (IgM) в титре 1:64 и анти-B (IgM) в титре 1:256, а также анти-B (IgG) в титре 1:16. У младенца установлено: группа крови по системе АВО – B(III), по системе Rh – антиген D-положительный, Rh-фенотип – CcDee, положительный полиспецифический прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ). Проведение моноспецифического ПАГТ на эритроцитах новорожденного основывалось на определении иммуноглобулинов IgG. Для идентификации антител провели элюирование связанных с эритроцитами антител с последующей идентификацией антител в непрямом антиглобулиновом тесте (НАГТ). Элюат с эритроцитов ребенка содержал иммунные анти-B антитела (IgG). При исследовании сыворотки новорожденного в НАГТ

с тест-эритроцитами выявлены анти-B антитела класса IgG. Динамический анализ клинико-лабораторных данных у новорожденного ребенка соответствовал клинической картине гемолитической болезни новорожденного. Увеличение показателя незрелых ретикулоцитов, нормальное значение содержания гемоглобина в ретикулоцитах в неонатальном периоде у младенца указывают на отсутствие дефицита железа в качестве причины анемии у данного пациента.

Заключение. Комплексный анализ иммуногематологических исследований (как прямого, так и непрямого антиглобулинового теста у матери и новорожденного, исследование элюата с эритроцитов у новорожденного ребенка) и клинико-лабораторных показателей у новорожденного ребенка (повышение концентрации билирубина, снижение гемоглобина и др.) существенно помогает в ранней диагностике, определении генеза гемолитической болезни новорожденного и прогнозировании выраженности гемолиза.

Ключевые слова: гемолитическая болезнь новорожденного, ABO-несовместимость, антиглобулиновый тест, элюат, фракции ретикулоцитов

Dzikaya T.¹, Kazliakova V.¹✉, Artsiusheyskaya M.^{2,3}, Sukhareva A.³, Skurko I.³, Klimovich V.¹, Zayats I.¹, Tsyhankova V.¹

¹ City Transfusiology Center of the 6th City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

² Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

³ Clinical Maternity Hospital of the Minsk Region, Minsk, Belarus

Integrated Approach to the Diagnosis of ABO Hemolytic Disease of Newborn: A Case Report

Conflict of interest: nothing to declare.

Author's contribution: article concept, editing, processing, writing – Dzikaya T., Kazliakova V., Artsiusheyskaya M., Sukhareva A., Klimovich V., Tsyhankova V.; material collection and processing – Skurko I., Zayats I.

Informed consent: the authors have signed informed consents for anonymous publication of patients' data in a medical journal.

Submitted: 08.07.2024

Accepted: 01.11.2024

Contacts: olga-kozlyakova@yandex.by

Abstract

Introduction. Comprehensive interpretation of laboratory and clinical indicators is crucial for timely diagnosis and prognosis of ABO hemolytic disease of the newborn (ABO HDN).

Purpose. To present a clinical case demonstrating an integrated approach to diagnosing hemolytic disease of the newborn.

Materials and methods. A dynamic analysis of laboratory and clinical findings of a pregnant woman and her child with HDN was performed.

Results. The pregnant woman Sh. was found to have blood group O, RhD-negative, Ccddee phenotype, according to immunohematological tests. Group-specific antibodies were detected in the mother's serum using gel technology (automatic immunohematological analyzer IH-500): anti-A (IgM) at a titer of 1:64, anti-B (IgM) at a titer of 1:256, and anti-B



(IgG) at a titer of 1:16. The newborn had blood group B, RhD-positive, phenotype CcDee, with a positive polyspecific direct antiglobulin test (PAGT). Monospecific PAGT on the newborn's erythrocytes revealed the presence of IgG immunoglobulins. Erythrocyte-bound antibodies were eluted and identified in an indirect antiglobulin test (IAGT). The eluate from the newborn's erythrocytes contained immune anti-B antibodies (IgG), which were also detected in the serum by IAGT. Clinical and laboratory data analysis corresponded to the clinical picture of HDN. An increased immature reticulocyte count and a normal hemoglobin reticulocyte count in the neonatal period indicated the absence of iron deficiency as a cause of anemia in this patient.

Conclusion. The comprehensive analysis of immunohematological tests (both direct and indirect antiglobulin test (AGT) in the mother and newborn, and eluate erythrocyte test in the newborn) along with clinical and laboratory findings of the newborn (increased bilirubin level, decreased hemoglobin, etc.) aids substantially in early diagnosis, determining hemolytic disease genesis and predicting hemolysis severity in HDN.

Keywords: hemolytic disease of the newborn, ABO incompatibility, antiglobulin test, eluate, reticulocyte fractions

■ ВВЕДЕНИЕ

Развитие гемолитической болезни новорожденного (ГБН) остается актуальной проблемой как для акушеров-гинекологов, так и для неонатологов. В Республике Беларусь за 2020 г. заболеваемость ГБН составила 6,41 на 1000 живорожденных детей. В настоящее время вследствие проводимой профилактики резус-конфликта в клинической практике наблюдается рост развития ГБН при ABO-несовместимости [1]. Часто неонатологи сталкиваются со сложностью определения генеза ГБН, а следовательно, и прогноза течения заболевания у новорожденных детей при наличии одновременно возможного конфликта как по системе ABO, так и по системе Rh. Общепринятый прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ) не имеет специфичности и не может быть использован для дифференциальной диагностики [2]. Поэтому поиск лабораторных маркеров ГБН для уточнения генеза и прогнозирования течения заболевания остается актуальным в настоящее время.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представить клинический случай интегрированного подхода к диагностике гемолитической болезни новорожденного.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ лабораторных (иммуногематологических) данных у беременной Ш. и клинико-лабораторных показателей ее новорожденного ребенка.

Иммуногематологические исследования образца крови матери, выполненные с использованием автоматического анализатора IH-500, сводились к проведению скрининга аллоиммунных антиэритроцитарных антител (реагент ID DiaCell I–II–III и ID-карты LISS/Coombs) и определению:

- 1) группы крови по системе ABO с использованием ID-карт DiaClon ABO/D + Reverse Grouping;
- 2) фенотипа эритроцитов системы Rh, включая типирование эритроцитов системы Kell (K) с использованием ID-карт DiaClon Rh-Subgroups + K;
- 3) титров антител по системе ABO (анти-A и анти-B): нормальных (естественных) полных антител класса IgM методом агглютинации в геле (ID-карты NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins) и иммунных неполных антител класса IgG (с использованием ID-карт Coombs Anti-IgG).

Иммуногематологические исследования образца крови новорожденного на автоматическом анализаторе IH-500 состояли:

- 1) в определении у новорожденного антигенов по системам ABO/Rh и проведении ПАГТ с использованием ID-карт для новорожденных ABO/Rh for Newborns;
- 2) определении фенотипа эритроцитов системы Rh, включая типирование эритроцитов системы Kell (K) с использованием ID-карт DiaClon Rh-Subgroups + K;
- 3) проведении ПАГТ: моноспецифического (ID-карты Coombs Anti-IgG, ID-карты DC-Screening I);
- 4) определении рисков гемолиза в ID-картах DAT IgG-Dilution;
- 5) определении субклассов иммуноглобулинов IgG1 и IgG3 и оценке рисков гемолиза в ID-картах DAT IgG1/IgG3;
- 6) исследовании сыворотки новорожденного на выявление группоспецифических аллоантител анти-B (класса IgG) в ID-картах Coombs Anti-IgG со стандартными эритроцитами группы B(III) в НАГТ.

Проведен динамический анализ клинических и лабораторных данных у ребенка с ГБН.

С использованием автоматического анализатора Sysmex XN-350 оценено количество эритроцитов (RBC), определены концентрация гемоглобина (Hb), гематокрит (Ht), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), абсолютное и относительное количество ретикулоцитов (RET).

Параллельно были проанализированы параметры, характеризующие степень зрелости ретикулоцитов: фракция ретикулоцитов низкой флуоресценции (LFR), фракция ретикулоцитов средней флуоресценции (MFR), фракция ретикулоцитов высокой флуоресценции HFR, а также фракция незрелых ретикулоцитов (IRF), являющаяся суммой HFR и MFR крови новорожденного с ГБН в неонатальном периоде. Изучен показатель гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-HE).

Для достижения поставленной цели исследования были сформулированы следующие задачи:

- 1) провести анализ лабораторных (иммуногематологических) данных у беременной Ш. и ее новорожденного ребенка;
- 2) провести динамический анализ эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей, уровня билирубина и течения неонатального периода у новорожденного Ш.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинический случай

Беременная женщина Ш. 1986 г. р. наблюдалась во время беременности в Городском центре трансфузиологии и учреждения здравоохранения «б-я городская клиническая больница» г. Минска. Наблюдение и обследование проводилось в соответствии с клиническим протоколом «Медицинское наблюдение и оказание



медицинской помощи женщинам с резус-иммунизацией и другими формами изоиммунизации», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 30 декабря 2022 г. № 128. В анамнезе беременной – вторичное бесплодие и 3 выкидыша. При иммуногематологическом исследовании было установлено: группа крови по системе ABO – O(I), по системе Rh – антиген D-отрицательный, Rh-фенотип – Ccdee. В 28 недель беременности был введен иммуноглобулин человека антирезус анти-D (анти-RhD), повторно иммуноглобулин человека анти-RhD был введен после родов в первые сутки после рождения ребенка.

В сроке гестации 38 недель (267 дней) беременной женщине в плановом порядке выполнена операция кесарева сечения в Клиническом родильном доме Минской области. Родился мальчик с массой тела 3680 г, ростом 52,0 см с оценкой по шкале Апгар 8/9 баллов. Медицинская помощь оказывалась в отделении для новорожденных детей и в педиатрическом отделении для новорожденных (с перинатальной патологией и недоношенных) согласно клиническому протоколу «Оказание медицинской помощи в неонатологии», утвержденному приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 18 апреля 2022 г. № 34. Все данные получены из форм первичной медицинской документации акушерско-гинекологической и педиатрической служб Республики Беларусь: «История развития новорожденного» (форма 097/у), «История родов» (форма 096/у), «Медицинская карта стационарного больного» (форма 003/у).

У младенца установлено: группа крови по системе ABO – B(III), по системе Rh – антиген D-положительный, Rh-фенотип – CcDee. На основании развития гипербилирубинемии (прирост составил 6,4 мкмоль/л/час) к концу 1-х суток жизни, уровня гемоглобина при рождении ниже возрастной нормы и последующего его снижения со 140 г/л (при рождении) до 115 г/л (на 2-е сутки жизни), положительного ПАГТ было предположено развитие ГБН.

По данным литературы, несовместимость матери и плода по системе ABO обеспечивает в определенной степени защиту от аллоиммунизации по системе Rh. Несовместимость по группе крови A(II) между матерью и плодом создает 90%-ю защиту от аллоиммунизации к RhD-антигену, а несовместимость по группе крови B(III) дает только 55%-ю защиту [3]. Поэтому в данном случае необходимо было установить генез гемолиза для постановки диагноза и определить прогноз течения ГБН для выбора оптимальной тактики ведения.

Несмотря на общепринятое использование ПАГТ при диагностике ГБН, сегодня значимость этого теста является спорной. Как положительный, так и отрицательный результат не играет определяющей роли в установлении данного диагноза. До 90% детей с положительным ПАГТ не имеют признаков гемолитической болезни, и наоборот – были сообщения об отрицательном тесте у младенцев с ABO – ГБН [4]. Особенно для неонатальных эритроцитов ограничена чувствительность ПАГТ к анти-A (IgG) и анти-B (IgG). Поэтому в большинстве случаев характерные клинические симптомы при ABO-несовместимости протекают при отрицательном ПАГТ. В случае подозрения на ГБН неясного генеза рекомендуется использовать непрямой антиглобулиновый тест (НАГТ), в котором используют сыворотку новорожденного и стандартные эритроциты ABO (в зависимости от групповой принадлежности ребенка A(II) или B(III)), так как данный тест является более чувствительным к материнским аллоантителам в крови плода. В качестве лабораторного диагностического метода

в последние годы предлагается также анализ антител, элюированных с эритроцитов новорожденного. Данный метод состоит в использовании приема тепловой элюции антител с поверхности эритроцитов и последующем проведении идентификации антител. Анализ элюатов во многом более чувствителен к определению иммунных анти-А и анти-В антител по сравнению с прямым полиспецифическим антиглобулиновым тестом, и его можно использовать дополнительно при определении типа ГБН.

Для уточнения диагноза было проведено параллельное исследование образцов крови матери и новорожденного ребенка.

Установлено наличие в сыворотке крови матери ABO-антител, направленных против антигенов новорожденного (мать O(I) – новорожденный B(III)). Сыворотка крови матери не содержала антител другой специфичности, кроме анти-А и анти-В. Элюат с эритроцитов ребенка содержал анти-В антитела (IgG) в низком титре.

Был выставлен диагноз: ГБН (изоиммунизация по ABO) P55.1. Желтушно-анемическая форма, среднетяжелое течение.

Известно, что антитела класса IgG делятся на четыре основных подкласса. Антитела подклассов IgG1, IgG3, IgG4 беспрепятственно проникают через плаценту. С увеличением их концентрации в крови матери и ребенка повышается вероятность развития ГБН. Интенсивность гемолитического процесса зависит от подкласса IgG. Диагностическое значение имеют прежде всего IgG1 и IgG3, так как иммуноглобулины этих подклассов намного легче взаимодействуют с Fc-рецепторами клеток, чем IgG2 и IgG4. Кроме того, IgG3 обладают большей аффинностью к рецепторам макрофагов, что объясняет их более высокую гемолитическую активность. У беременных женщин характер изменения титров аллоантител по сравнению с небеременными женщинами и в динамическом наблюдении может быть различным: постоянным, снижающимся, возрастающим и скачущим [5–7]. Есть мнение о том, что частая смена подъемов и спадов титра аллоантител в первой половине беременности является характерным признаком иммунноконфликтных реакций между матерью и плодом [8]. Но насколько критичен пороговый уровень антител, при котором может развиться ГБН, остается спорным вопросом. В исследовании Cariani L. и соавт. показано, что нет определенных ассоциаций между титрами материнских анти-А/В антител IgG класса и риском ABO – ГБН [9]. Однако в большинстве работ по изучению ABO – ГБН выявлена корреляция между высокими титрами аллоантител у матери и степенью тяжести ABO – ГБН. Одни исследователи считают, что титры более 1:64 уже являются критическими [10], другие – что только титры более 1:128 или 1:512 являются опасными [11, 12]. У новорожденных с ГБН и отрицательным ПАГТ уровень IgG3 иногда слишком низок для детекции в прямом антиглобулиновом тесте, но его бывает достаточно для развития гемолиза [13].

Новорожденный ребенок Ш. получал следующее лечение: введение внутривенного иммуноглобулина, фототерапия, назначение фолиевой кислоты и витамина D₃. Выписан в удовлетворительном состоянии на 19-е сутки жизни.

Учитывая развитие анемии, проведен динамический анализ эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей в общем анализе крови у ребенка Ш. Соответствующие данные представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, у новорожденного ребенка Ш. в течение неонатального периода отмечается снижение эритроцитарных показателей (количество RBC на первые сутки составило $3,57 \times 10^{12}/л$ и снизилось до $3,14 \times 10^{12}/л$ на 18-е сутки).



Таблица 1
Динамика эритроцитарных показателей у новорожденного ребенка Ш.
Table 1
Evolution of erythrocyte indices in the newborn Sh.

Сут- ки жиз- ни	Тест, ед. измерения											
	Er, 10 ¹² /л	HGB, г/л	HCT, %	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л	RDW-CV, %	RDW-SD, фл	MicroR, %	MacroR, %	Нуро-HE, %	Hyper-HE, %
1	3,57	140	38,1	106,7	39,2	367	17,6	64,1	1,1	16,5	1,1	2,2
2	2,93	115	32,0	109,2	39,2	359	18,4	70,1	0,9	18,3	1,0	2,5
11	3,12	115	31,4	100,6	36,9	366	14,5	53,1	1,1	7,6	2,5	1,6
18	3,14	112	30,6	97,5	35,7	366	14,6	52,4	1,6	5,8	1,4	1,2

Таблица 2
Динамика ретикулоцитарных показателей у новорожденного ребенка Ш.
Table 2
Evolution of reticulocyte indices in the newborn Sh.

Сутки жизни	Тест, ед. измерения					
	RET, 10 ⁹ /л	RET, %	IRF, %	Ret-HE, пг	RBC-HE, пг	Delta-HE, пг
1	366,3	10,26	46,4	37,0	33,8	3,2
2	386,5	13,19	57,9	34,1	34,6	-0,5
11	80,2	2,57	36,4	31,8	32,3	-0,5
18	103,0	3,28	32,0	32,0	32,7	-0,7

Уровень HGB на 18-е сутки составил 112 г/л, HCT – 30,6%. Показатели MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD, MacroR, MicroR, Нуро-HE, Hyper-HE сохранялись в пределах возрастной нормы.

При рождении у ребенка Ш. уровень абсолютного и относительного количества RET составил 366,3×10⁹/л (10,26%) с последующим повышением до 386,5×10⁹/л (13,19%) на 2-е сутки как ответ на развитие анемии. Показатель IRF сохранялся высоким в течение всего периода наблюдения (табл. 2).

Значение Ret-HE было в пределах возрастной нормы у новорожденных детей [14]. Увеличение показателя IRF, нормальное значение содержания гемоглобина в ретикулоцитах указывают на отсутствие дефицита железа в качестве причины анемии.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Включение иммуногематологических исследований, таких как поли-/моноспецифический ПАГТ, а также НАГТ образцов крови новорожденного, дополнительное исследование элюата после проведения тепловой элюции эритроцитов у новорожденного в НАГТ в совокупности с комплексным анализом клинико-лабораторных показателей (повышение концентрации билирубина, снижение гемоглобина и др.) существенно помогают в определении генеза ГБН и определении тактики ведения пациента.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Obuhova P.S., Kachanov A.V., Pozdnyakova N.A., et al. ABO-Incompatibility of Mother and Fetus: The Role of Anti-Glycan Alloantibodies in the Hemolytic Disease of Newborn. *Medical Immunology*. 2021;23(1):17–34. doi: 10.15789/1563-0625-AOM-1977 (in Russian)
2. Hadley A.G. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transpl. Immunol.* 2002;10(2–3): 191–198.
3. Sidelnikova V.M., Antonov A.G. (2004) *Hemolytic disease of the fetus and the newborn*. Moscow: Triad-X. (in Russian)
4. Petrenko Yu.V., Ivanov D.O., Cherednikova E.S., et al. Analysis of the hemolytic disease of newborn with conflicts ABO-system. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii* [Bulletin of the Russian Military Medical Academy]. 2012;4:67–70. (in Russian)
5. Antonov A.G., Degtyarev D.N., Narogan M.V., et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn. Clinical recommendations. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obucheniye*. 2018;6(2):131–157. (in Russian)
6. Aydin M., Deveci U., Orman A., et al. Is the Antiglobulin Test a Good Marker for Predicting the Development of Hemolytic Disease of the Newborn in ABO Incompatibility? *Pediatr. Neonatol.* 2016;57(5):449. doi: 10.1016/j.pedneo.2015.11.006
7. Ukita M., Takahashi A., Nunotani T., et al. IgG subclasses of anti-A and anti-B antibodies bound to the cord red cells in ABO incompatible pregnancies. *Vox Sang.* 1989;56(3):181–186.
8. Mineeva N.V. (2020) *Human Blood Groups. Fundamentals of immunohematology*. St. Petersburg: Publishing and printing complex Gangut. (in Russian)
9. Cariani L., Romano E.L., Martinez N., et al. ABO-haemolytic disease of the newborn (ABO-HDN): Factors influencing its severity and incidence in Venezuela. *J. Trop. Pediatr.* 1995;41(1):14–21.
10. Owa J.A., Durosini M.A., Alabi A.O. Determinants of severity of neonatal hyperbilirubinaemia in ABO incompatibility in Nigeria. *Trop. Doct.* 1991;21(1):19–22.
11. Li P., Pang L.H., Liang H.F., et al. Maternal IgG anti-A and anti-B titer levels screening in predicting ABO hemolytic disease of the newborn: a meta-analysis. *Fetal Pediatr. Pathol.* 2015;34(6):341–350.
12. Ye H.H., Huang H.H., Wang X.L., et al. Analysis of correlation between IgG titer of pregnant women and neonatal hemolytic complications of different blood groups. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2017;25(5):1532–1536. (in Chinese)
13. Kaplan M., Na'amad M., Kenan A., et al. Failure to predict hemolysis and hyperbilirubinemia by IgG subclass in blood group A or B infants born to group O mothers. *Pediatrics*. 2009;123(1):e132–137.
14. Löfving A., Domellöf M., Hellström-Westas L., et al. Reference intervals for reticulocyte hemoglobin content in healthy infants. *Pediatr Res.* 2018;84(5):657–661. doi: 10.1038/s41390-018-0046-4