MARCELA VIEIRA XAVIER CAMPOS

Correlação entre títulos de anticorpos anti-D e desfecho gestacional adverso em gestantes com antecedente de doença hemolítica perinatal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Marcela Vieira Xavier
Correlação entre títulos de anticorpos anti-D e desfecho gestacional adverso em gestantes com antecedente de doença hemolítica perinatal / Marcela Vieira Xavier Campos. -- São Paulo, 2015.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Adolfo Wenjaw Liao.

Descritores: 1.Eritroblastose fetal 2.Isoimunização Rh 3.Anticorpo anti-D 4.Anticorpos 5.Transfusão de sangue intrauterina 6.Natimorto 7.Morte fetal 8.Resultado da gravidez 9.Gestantes

USP/FM/DBD-287/15

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Elisabeti** e **Gesualdo**, pelo amor incondicional e por todo empenho dispensado na mais difícil tarefa que é educar outro ser humano. Agradeço a benção de ter como meus pais pessoas que admiro profundamente por traduzirem em suas trajetórias de vida o exemplo da determinação e dos valores que se esforçaram para ensinar.
Meu eterno amor e gratidão a vocês.

Ao meu amor, **Octavio**, por realçar o colorido da minha vida diariamente e pela grandiosidade de ser um homem generoso com todos que o cercam. O teu companheirismo e o seu carinho fortaleceram-me e ajudaram-me a perseverar na conclusão deste ciclo. Que nós sejamos sempre apoio um para o outro em nossa caminhada pela vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao**, pelos ensinamentos e pela sábia maneira de conduzir-me nesta trajetória, que me permitiu não apenas concluir uma etapa de minha vida acadêmica, mas aprender verdadeiramente com ela.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, digníssimo Professor Titular de Obstetrícia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprendizado e convivência na mais conceituada Clínica Obstétrica do país.

À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot**, pela generosidade ao transmitir seus conhecimentos em Medicina Fetal e pela conduta profissional ética e humanizada. Sua dedicação e amor pela ciência a tornam exemplo concreto da verdadeira essência do pesquisador. Agradeço ainda pelas importantes colocações durante a fase de qualificação que contribuíram efetivamente para a conclusão desta dissertação.

Ao **Prof. Dr. David Baptista da Silva Pares**, pela atenção e valiosas contribuições dispensadas a este estudo na fase de qualificação.

Ao **Dr. Nilton Hideto Takiuti**, pela avaliação cuidadosa e apontamentos enriquecedores a este estudo na fase de qualificação.

Aos membros suplentes na fase de qualificação, **Dra. Lisandra Stein Bernardes Ciampi de Andrade** e ao **Prof. Dr. Cleisson Fábio Andrioli Peralta,** pela disponibilidade e atenção.

À **Profa. Dra. Rossana Pulcineli Francisco**, coordenadora da Pós-Graduação do Departamento de Obstetrícia, pela oportunidade de desenvolver este estudo na Clínica Obstétrica.

Aos docentes da Clínica Obstétrica, **Prof. Dr. Victor Bunduki**, **Prof. Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho** e **Prof. Dr. Soubhi Kahhale,** pelos preciosos ensinamentos para minha formação em Medicina Fetal e Obstetrícia, pelas oportunidades e pelo apreço no convívio diário.

Aos médicos assistentes da Clínica Obstétrica **Prof. Dr. Seizo Miyadahira**, **Dr. Antônio Gomes de Amorim Filho** e **Dr. Wagner Rodrigues Hernandez**, pela generosidade ao dividir seus conhecimentos e pela agradável convivência.

Ao **Dr. Marcos Consonni**, pela amizade e por despertar o interesse por essa especialidade ímpar que é a Medicina Fetal.

À **Dra. Renata Almeida de Assunção** e à **Dra. Estela Naomi Nishie**, pela agradável convivência nos ambulatórios, pelos ensinamentos e companheirismo.

À **Dra. Mariana Azevedo Carvalho** e à **Dra. Marisa Akemi Takeno**, pela amizade e companheirismo nesta jornada que se iniciou no primeiro ano de graduação em medicina, passou pela residência médica e estendeu-se até a pós-graduação.

Às **Dras. Maria Cláudia Nogueira Afonso**, **Mariana Yumi Miyadahira, Janaina Negrão**, **Julianny Cavalheiro Nery**, **Lilia Araújo M. L. de Oliveira**, **Sandra Frankfurt Centofanti, Karen Chinoca** e **Amanda Amaral**, companheiras de pós-graduação, pela amizade e incentivo nos momentos difíceis.

Aos **estagiários** e **residentes** em Medicina Fetal, pela convivência e pelo companheirismo.

Às Sras. **Lucinda Cristina Pereira**, **Soraia Cristina Ferreira da Silva**, **Raquel Costa Cândido**, **Célia Nunes** e **Marina Martins da Silva**, secretária e funcionárias administrativas da Clínica Obstétrica, pela acessibilidade e boa vontade.

A todos os demais **assistentes** e **colegas da Clínica Obstétrica da FMUSP** que contribuíram muito para a minha formação profissional e científica.

À minha companheira de vida e amada irmã **Gláucia Vieira Xavier Lataro**, pelos incentivos de uma vida inteira, pelo amor sem medidas e pelo auxílio concreto nesta tese pela revisão ortográfica e gramatical.

Ao meu grande amigo e cunhado **Danilo Tamega Lataro**, pelo ânimo e pelo auxílio como designer gráfico na elaboração da apresentação desta tese.

À minha querida sogra **Sonia Maria Arcos Campos**, pelo incentivo a não esmorecer diante das dificuldades.

A toda minha **família**, pelo incentivo e por ser a razão de tudo.

Às **gestantes** do ambulatório de aloimunização e **seus filhos**, motivação maior da realização deste estudo.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust

Esta dissertação está de acordo as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos xvii
Lista de Figuras xix
Lista de Tabelas xxi
Resumo xxiii
Summary xxv
1 INTRODUÇÃO 1
2 PROPOSIÇÃO 9
3 REVISÃO DA LITERATURA 11
3.1 Histórico 12
3.2 Antecedente obstétrico 13
3.3 Títulos de anticorpos anti-D 18
3.3.1 Métodos de quantificação de anticorpos 18
3.3.1.1 Titulação de anticorpo por técnicas manuais de aglutinação 19
3.3.1.2 Quantificação por técnicas automatizadas. 20
3.3.1.3 Gel teste 21
3.3.2 Títulos críticos de anticorpos anti-D 21
3.4 Títulos de anticorpos anti-D em gestantes com antecedente obstétrico de aloimunização 32
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS 38
4.1 Delineamento do estudo 39
4.2 Ética 39
4.3 Casuística 39
4.3.1 Critérios de inclusão 40
4.4 Protocolo assistencial 40
4.5 Coleta de dados 44
4.6 Variáveis 45
4.6.1 Demográficas maternas 45
4.6.2 Antecedente obstétrico 45
4.6.3 Desfechos de interesse 46
4.6.4 Pesquisa de anticorpos irregulares 46
4.6.5 Achados ultrassonográficos de anemia fetal 47

4.6.6 Transfusão intrauterina 48
4.6.7 Óbito fetal 49
4.6.8 Parto e recém-nascido 49
4.6.9 Evolução do recém-nascido no berçário 50
4.6.10 Análise estatística 51
4.6.11 Tamanho amostral 51
5 RESULTADOS 53
5.1 Descrição das variáveis maternas 55
5.2 Primeiro atendimento 57
5.3 Seguimento pré-natal 60
5.3.1 Achados ultrassonográficos 60
5.3.2 Transfusões intrauterinas 61
5.3.3 Óbito fetal 62
5.3.4 Tipagem sanguínea do produto conceptual desconhecida 64
5.4 O parto e o recém-nascido 65
5.5 Evolução do recém-nascido no berçário 67
5.6 Relação entre títulos de anticorpos maternos e desfechos gestacionais adversos 68
5.6.1 Títulos de anticorpos iniciais 68
5.6.2 Comportamento dos títulos de anticorpos 72
5.6.3 Associação com anticorpos atípicos 76
6 DISCUSSÃO 77
7 CONCLUSÃO 94
8 ANEXOS 96
9 REFERÊNCIAS 99

LISTAS

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACM	Artéria cerebral média
AIH	Autorização de internação hospitalar
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cm/s	Centímetro por segundo
dHb	Déficit de hemoglobina
DHPN	Doença hemolítica perinatal
dL	Decilitro
DP	Desvio padrão
EXT	Exsanguíneo transfusão
g	Grama
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IG	Idade gestacional
L	Litro
MF	Movimentação fetal
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MoM	Múltiplo da mediana
n	Número de casos
nm	Nanômetro
OF	Óbito fetal
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares

PCR	*Polymerase chain reaction*
Rh	Rhesus
RN	Recém-nascido
ROC	*Receiver Operating Characteristic*
TIU	Transfusão intrauterina
UI	Unidade internacional
Vmáx	Velocidade máxima
µg	Micrograma

FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de seguimento de gestações com antecedente obstétrico leve de aloimunização ou sem história prévia de doença hemolítica perinatal e títulos de anti-D ≥ 16 – HCFMUSP 43

Figura 2 - Fluxograma de seguimento de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP 44

Figura 3 - Histograma de distribuição da idade materna, por faixa etária, de 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal - HCFMUSP - 2006 a 2014 55

Figura 4 - Histograma de distribuição das gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com a idade gestacional na primeira avaliação no serviço - HCFMUSP - 2006 a 2014 57

Figura 5 - Histograma de distribuição das gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com os títulos de anticorpos anti-D iniciais - HCFMUSP - 2006 a 2014 58

Figura 6 - Histograma de distribuição da idade gestacional de parto dos 51 nascidos vivos de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com a necessidade de transfusão intrauterina (TIU) - HCFMUSP - 2006 a 2014 65

Figura 7 - Histograma de distribuição de peso ao nascimento dos 51 nascidos vivos de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com a necessidade de transfusão intrauterina (TIU) - HCFMUSP - 2006 a 2014 66

Figura 8 - Histograma de distribuição da frequência de exsanguíneo transfusões em 51 nascidos vivos de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo a necessidade de transfusão intrauterina (TIU) - HCFMUSP - 2006 a 2014 67

Figura 9 - Curva ROC para predição de necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal de acordo com os títulos maternos iniciais de anticorpos anti-D em gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal. Área sob a curva: 0,78 (IC95%: 0,66 – 0,90). Círculo vazio representa o melhor ponto de corte (título: 128) – HCFMUSP – 2006 a 2014 71

TABELAS

Tabela 1 - Relação entre o antecedente de doença hemolítica perinatal e a concentração de hemoglobina fetal em 272 gestações aloimunizadas submetidas a cordocentese ou fetoscopia..... 16

Tabela 2 - Revisão de estudos sobre a determinação de valor crítico de anticorpo anti-D para predição de anemia fetal em gestantes aloimunizadas 31

Tabela 3 - Distribuição dos tipos de associações de anticorpos de acordo com a sua frequência na população de gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014 59

Tabela 4 - Distribuição de 28 gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com o número de transfusões intrauterinas realizadas – HCFMUSP – 2006 a 2014..... 61

Tabela 5 - Descrição dos casos de gestações com antecedente obstétrico moderado ou grave de doença hemolítica perinatal que evoluíram com a ocorrência de óbito fetal - HCFMUSP - 2006 a 2014 63

Tabela 6 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o título materno inicial de anticorpo anti-D, em 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014 69

Tabela 7 - Predição de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o título de anticorpo anti-D materno inicial, em 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014 70

Tabela 8 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o comportamento dos títulos maternos de anticorpo anti-D ao longo da gestação, em 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014 73

Tabela 9 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o aumento dos títulos maternos de anticorpo anti-D ao longo da gestação, em 14 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014 74

Tabela 10 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o comportamento dos títulos maternos de anticorpo anti-D ao longo da gestação, em 32 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal com títulos iniciais anti-D < 128 – HCFMUSP – 2006 a 2014 75

Tabela 11 - Correlação entre associação de anti-D com outros anticorpos irregulares e a ocorrência de desfechos gestacionais adversos nas 58 gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal - HCFMUSP - 2006 a 2014 76

RESUMO

Campos MVX. *Correlação entre títulos de anticorpos anti-D e desfecho gestacional adverso em gestantes com antecedente de doença hemolítica perinatal* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

OBJETIVOS: Avaliar a correlação entre títulos de anticorpos anti-D em gestantes com antecedente de doença hemolítica perinatal (DHPN) e desfecho gestacional adverso. MÉTODOS: Coorte retrospectiva (2006-14) envolvendo gestantes Rh negativo, com antecedente de DHPN moderada ou grave, acompanhadas na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Critérios de inclusão: gestação única com idade gestacional inferior a 32 semanas e ausência de derrames cavitários ou hidropisia fetal durante a 1ª avaliação ultrassonográfica; e desfecho perinatal conhecido. Necessidade de transfusão intrauterina (TIU), ou ocorrência de óbito fetal (OF) foram considerados os desfechos de interesse. Análise por curva ROC foi utilizada para examinar a correlação entre os títulos de anticorpos e os desfechos; valores de sensibilidade, especificidade, preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), acurácia e razões de verossimilhança positiva (RVP) e negativa (RPN) foram calculados para diferentes níveis de corte. RESULTADOS: O estudo envolveu 58 gestações com antecedente moderado (n=18, 31%) ou grave (n=40, 69%) de DHPN. Um total de 29 (50,0%) gestações apresentaram desfecho adverso, sendo que TIU foi realizada em 28 (48,3%, 28/58) casos e OF ocorreu em 7 (12,1%, 7/58). A frequência de desfechos adversos foi diferente entre gestantes com título inicial baixo (<16: 1/10, 10,0%), moderado (entre 16 e 64: 8/22, 26,9%) e alto (≥ 128: 20/26, 76,9%, p<0,001). O comportamento dos títulos (declínio, estabilidade ou aumento) não se correlacionou com a necessidade de TIU ou OF (p=0,48). A curva ROC dos títulos iniciais de anticorpos apresentou área sob a curva de 0,78 (intervalo de confiança 95%, IC 95%: 0,66 – 0,90) para predição de desfechos gestacionais adversos, sendo 128 o melhor nível de corte, com sensibilidade de 69,0%, especificidade de 79,3%, VPP de 76,9%, VPN de 71,9%, acurácia de 74,0%, RVP de 3,33 (IC95%: 1,68-7,23) e RVN de 0,39 (IC95%: 0,21 - 0,66). CONCLUSÃO: Gestações com antecedente moderado ou grave de DHPN com títulos de anticorpos anti-D iniciais ≥ 128 apresentam aumento da chance de ocorrência de desfechos gestacionais adversos (TIU ou OF) de 3,33 vezes em relação àquelas com títulos iniciais baixos. Portanto, a titulação inicial de anti-D auxilia na triagem das gestações com maior chance de anemia fetal moderada ou grave, exigindo vigilância com avaliações mais frequentes do pico de velocidade sistólica da artéria cerebral média.

Descritores: eritroblastose fetal; isoimunização Rh; anticorpo anti-D; anticorpos; transfusão de sangue intrauterina; natimorto; morte fetal; resultado da gravidez; gestantes.

SUMMARY

Campos MVX. *Correlation between anti-D antibody titers and adverse pregnancy outcome in pregnant women with history of hemolytic disease of the fetus and newborn* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

OBJECTIVE: To evaluate the correlation between anti-D antibody titers in pregnant women with a previous history of hemolytic disease and adverse pregnancy outcome. METHODS: Retrospective cohort (2006-14) involving Rh negative pregnant women with a previous history of moderate or severe hemolytic disease, seen at the Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital das Clinicas, São Paulo University Medical School. Inclusion criteria: singleton pregnancies, without fetal effusions or hydrops, first evaluated before 32 weeks of gestation, and known perinatal outcome. Primary outcomes were: need for intrauterine transfusion (IUT) and/or stillbirth (SB). ROC curve analysis was used to examine the correlation between antibody titers and adverse pregnancy outcome. Sensitivity, specificity, positive predictive (PPV) and negative (NPV) values, accuracy and positive (PLR) and negative (NLR) likelihood ratios were calculated for different cut-offs. RESULTS: The study included 58 singleton pregnancies with a history of moderate (n=18, 31.0%) or severe (n=40, 69.0%) hemolytic disease in a previous pregnancy. Adverse outcome occurred in 29 (50.0%) pregnancies: IUT was performed in 28 (48.3%, 28/58) cases and SB occurred in 7 (12.1%, 7 / 58). The frequency of adverse outcomes was significantly different ($p < 0.001$) according to initial antibody titers: low (<16), 1/10 (10.0%); moderate (between 16 and 64), 8/22 (26.9%); and high (≥ 128), 20/26 (76.9%). ROC curve analysis showed an area under the curve of 0.78 (95% confidence interval, 95% CI: 0.66 to 0.90) for the prediction of adverse pregnancy outcomes. Initial anti-D $\geq$128 was considered the best cut-off level, with sensitivity of 69.0%, specificity of 79.3%, PPV of 76.9%, NPV of 71.9%, accuracy of 74.0%, PLR of 3.33 (95% CI: 1.68 to 7.23) and NLR 0.39 (95% CI: 0.21 to 0.66). Antibody levels trend throughout pregnancy (decrease, stability or increase) was not correlated with adverse outcome ($p = 0.48$). CONCLUSION: Pregnancies with a previous history of moderate to severe hemolytic disease, and initial anti-D antibody titers ≥128, present increased chance (3.33 times) of need for intrauterine transfusion and/or stillbirth compared to those with low initial titers. Therefore, initial anti-D titers improve the screening of pregnancies at higher risk of moderate/severe fetal anemia and will require more frequent monitoring of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity.

Descriptors: erythroblastosis, fetal; Rh isoimmunization; RHO(D) antibody; antibodies; blood transfusion, intrauterine; stillbirth; fetal death; pregnancy outcome; pregnant women.

1 INTRODUÇÃO

A aloimunização consiste na produção de anticorpos secundária à exposição a antígenos não próprios [1]. Durante a gestação e parto, células sanguíneas fetais, que contêm antígenos de superfície eritrocitária sensibilizantes de origem paterna não compatíveis com a mãe, podem atingir a circulação materna através de hemorragias feto-maternas [2] e ocasionar a produção de anticorpos pelo sistema imune materno. Em uma primeira exposição a estes antígenos, há produção de imunoglobulinas do tipo IgM, que não são capazes de atravessar a barreira placentária em razão de seu alto peso molecular. Após uma segunda exposição, há o início da produção de imunoglobulinas do tipo IgG, com o transporte ativo destes anticorpos por receptores Fc presentes na placenta, em um sentido único, da mãe para o feto [3]. Os anticorpos IgG maternos dirigidos contra os antígenos eritrocitários fetais atingem a circulação sanguínea do feto e desencadeiam um processo de hemólise imunomediada que resulta, por fim, no quadro de anemia [1]. Este processo patológico, que se inicia intraútero, pode se estender ao período neonatal, o que justifica a atual nomenclatura de doença hemolítica perinatal (DHPN) para esta patologia.

Existem mais de 50 antígenos eritrocitários associados à etiopatogenia da DHPN, sendo que os principais são pertencentes ao sistema ABO, Rh e Kell. Apesar da incompatibilidade feto-materna para o sistema ABO ser mais frequente, a doença decorrente da produção de anticorpos relacionados ao sistema Rh (em especial os antígenos D e c) e

ao sistema Kell (K1) apresentam maior relevância clínica devido à associação a quadros de maior gravidade [4, 5].

A DHPN foi considerada um dos maiores problemas obstétricos durante a primeira metade do século XX, sendo responsável por elevadas taxas de morbimortalidade perinatal. No início da década de 1940, a taxa de mortalidade perinatal pela doença era de aproximadamente 50% [6]. Com a introdução da técnica de exsanguíneo transfusão (EXT) por Wallerstein em 1946 [7], esta taxa foi reduzida à metade.

Com o avanço na terapêutica intrauterina da doença, após o sucesso das primeiras transfusões sanguíneas fetais pela técnica intraperitoneal descrita por Liley [8], em 1963, e pela técnica intravascular por Rodeck et al. [9], em 1981, a taxa de mortalidade perinatal caiu para 10% [10].

Além dos progressos na terapêutica, a introdução da profilaxia com a imunoglobulina anti-D em 1968 contribuiu de maneira significativa para o notável declínio na incidência da doença [11]. A administração sistemática da profilaxia no período pós-natal e a extensão de sua utilização para o período antenatal promove redução do risco de aloimunização durante a gestação para até 0,2% [12]. Contudo, apesar de todos os avanços, a DHPN ainda é uma realidade em todo o mundo.

Estima-se que 1 em cada 1.000 nascidos vivos nos Estados Unidos da América apresentem sinais de acometimento pela DHPN, segundo o *Centers for Disease Control* (CDC) [13]. Na Inglaterra e País de Gales, ao redor de 500 fetos desenvolvem a doença a cada ano, desconsiderando os

óbitos fetais com idade gestacional inferior a 24 semanas, que são avaliados como abortamento espontâneo e não são incluídos nesta estatística [14].

Acredita-se que essa incidência seja consideravelmente maior em países com baixa adesão a programas de profilaxia com a imunoglobulina anti-D. Zipursky e Paul [15] estimaram a incidência da DHPN em três países (Índia, Paquistão e Nigéria) onde esta política de saúde não é implementada universalmente, sob a justificativa da baixa prevalência de gestantes Rhesus (Rh) negativo nestas populações. Considerando uma taxa de 14% de desenvolvimento de anticorpos anti-D em mulheres Rh negativo que não são submetidas à imunoprofilaxia e uma taxa de morbimortalidade de 50% de fetos e neonatos pela doença aloimune, os autores concluem que aproximadamente 90.000 recém-nascidos (RNs) por ano sejam acometidos pela doença, o que representa um grave problema de saúde pública em termos mundiais.

No Brasil, a prevalência da DHPN é de 0,08% das gestações [16], de acordo com dados do Ministério da Saúde. Entretanto, estima-se que este percentual seja subestimado devido a subnotificação dos casos, principalmente quando os recém-nascidos acometidos por anemia leve não necessitam de propedêutica mais complexa no período neonatal ou quando outros diagnósticos são mais valorizados no preenchimento da autorização de internação hospitalar (AIH), como, por exemplo, a prematuridade [17].

Nardozza et al. [18] avaliam a mortalidade perinatal pela DHPN, no período de 1995 a 2004, em um hospital brasileiro de referência para a doença, com a realização de estudo retrospectivo compreendendo 291

gestantes Rh negativo, sendo 99 pacientes aloimunizadas e 192 pacientes no grupo controle. Os autores encontram uma taxa de mortalidade significativamente maior no grupo acometido pela DHPN em relação ao grupo não acometido (12,1% *versus* 1,0%, p<0,0001). Essa taxa é superior às encontradas em estudos europeus e norte-americanos [19-21]. Portanto, apesar da diminuição da incidência e da prevalência da doença aloimune no país, a queda da mortalidade pela doença ainda é considerada lenta quando comparada à de outros países.

O atual seguimento pré-natal de gestantes Rh negativo, além de garantir a adequada profilaxia em gestações susceptíveis, tem como foco a utilização de métodos não invasivos, tanto para rastreamento das gestações sob o risco de sensibilização ao antígeno D quanto para predição de anemia nos casos das gestantes já sensibilizadas.

A gestante Rh negativo cujo parceiro é heterozigoto para o fator Rh ou não tem tipagem sanguínea conhecida é paciente de eleição à utilização de teste não invasivo para a detecção do Rh fetal no soro materno. Este teste utiliza o conceito da presença de DNA fetal livre no soro de gestantes oriundo do citotrofoblasto placentário [22], com o objetivo de detectar a presença de exons do gene RHD na circulação de uma gestante Rh negativo, na qual normalmente não se observa a presença desses produtos. Os exons presentes na circulação materna são então amplificados pelo método de *polymerase chain reaction* (PCR) em tempo real e quantificados. Com a determinação do Rh fetal pode-se realizar a triagem entre as gestantes Rh negativo suscetíveis e aquelas que não correm o risco de

aloimunização pelo antígeno D, por portarem feto sabidamente Rh negativo. Estudo compreendendo 893 gestantes Rh negativo apresenta acurácia de 99,5% para a genotipagem do RHD fetal no soro materno, comprovando a segurança deste método [23].

Outro método diagnóstico não invasivo é a quantificação de anticorpos antieritrocitários no sangue materno, amplamente utilizado para o acompanhamento de gestantes sensibilizadas. A importância desta quantificação e o debate a respeito de um nível crítico a partir do qual o risco de anemia fetal moderada ou grave é consideravelmente maior são temas frequentes desde o estabelecimento da etiopatogenia da doença, na primeira metade do século XX.

O nível crítico de anticorpos anti-D varia de acordo com diferentes estudos [24-31], a depender do método de quantificação de anticorpos e da população estudada. Para pacientes sensibilizadas sem antecedente de acometimento pela DHPN em gestações anteriores, a maioria dos laboratórios adota títulos críticos de anti-D entre 8 e 32 [21, 32], com a titulação realizada por técnicas manuais de aglutinação, e entre 6 a 15UI/ml, com a quantificação realizada por técnicas de análise automática contínua [31, 33].

O rastreamento de anemia fetal em todas gestantes sensibilizadas por antígenos eritrocitários baseia-se na avaliação dopplervelocimétrica do pico sistólico de velocidade da artéria cerebral média (ACM) [34], método de escolha para a predição da anemia moderada ou grave em fetos não hidrópicos. Em decorrência disto, o acompanhamento pré-natal destas gestantes vem sendo gradualmente transferido aos especialistas em

medicina fetal. Com objetivo de aprimorar a seleção dos casos que devem ser encaminhados a serviços de referência pelo risco aumentado de anemia fetal, a discussão a respeito de um nível crítico de anticorpos anti-D está sendo retomada.

A quantificação dos anticorpos anti-D no manejo de condutas das gestações com história obstétrica de DHPN e a determinação da correlação entre um nível crítico de anticorpos e determinado desfecho perinatal de gravidade nesta população não são bem estabelecidos na literatura e ainda suscitam questionamentos.

O antecedente obstétrico de aloimunização é fator isolado que confere gravidade à gestação índice. Dado o seu amplo espectro de apresentações, faz-se necessária a classificação da gravidade da DHPN para uma adequada estratificação de risco. Iskaros et al. [35] propõem a seguinte classificação:

- Doença leve: recém-nascido a termo necessitando apenas de fototerapia;
- Doença moderada: recém-nascido a termo submetido à exsanguíneo transfusão neonatal;
- Doença grave: óbito fetal (OF), transfusão intrauterina (TIU) ou recém-nascido pré-termo submetido à exsanguíneo transfusão neonatal.

O histórico de TIU, óbito fetal ou neonatal, hidropisia ou necessidade de exsanguíneo transfusão aumenta progressivamente as chances de

acometimento fetal e de sua ocorrência em idades gestacionais mais precoces a cada gestação subsequente [36].

Neste sentido, Moise e Argoti [37], em revisão sistemática sobre a doença, preconizam que na presença de antecedente de DHPN a quantificação do anticorpo anti-D não é bom preditor de anemia fetal, devendo o seguimento destas gestações ser realizado com a dopplervelocimetria da artéria cerebral média a partir de 18 semanas de gestação.

Em contrapartida, outros autores [20, 35, 38, 39] apresentam ponderações que sustentam a utilização da quantificação de anticorpos como método adjuvante ao Doppler da ACM no acompanhamento pré-natal destas gestações. Contudo, há poucos estudos sistemáticos que aprofundem a busca de uma correlação entre os diferentes níveis de anticorpos e os desfechos de gravidade nesta população específica de gestantes.

Diante deste cenário, a discussão a respeito da relevância dos títulos de anticorpos no acompanhamento de gestantes aloimunizadas com antecedente obstétrico de DHPN resgata importantes pontos de indefinição na literatura. Sendo assim, o presente estudo objetiva examinar essa questão na população de gestantes aloimunizadas com antecedente moderado ou grave atendidas na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), centro de referência para acompanhamento e tratamento desta condição.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a correlação entre os títulos de anticorpos anti-D de gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal e os desfechos gestacionais adversos, definidos como a necessidade de transfusão intrauterina ou a ocorrência de óbito fetal.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

A primeira descrição referente à DHPN foi realizada por uma obstetriz francesa em 1609 [19]. O relato descreve o nascimento de gêmeos, em que um encontrava-se natimorto e hidrópico, e o outro, aparentemente saudável, evoluiu no período neonatal com icterícia intensa, indo a óbito dias após por Kernicterus.

Séculos após esta descrição, em 1932, Diamond [40] descreve pela primeira vez a correlação entre hidropisia fetal, icterícia e anemia neonatais, sugerindo que uma mesma entidade patológica, com provável etiologia familiar, interligaria estas três condições. Esta entidade seria caracterizada pela hemólise, presença de eritroblastos na circulação periférica e recrutamento de sítios hematopoiéticos extramedulares.

Em 1939, Levine e Stetson *apud* Wirthner [41] descrevem um caso de icterícia neonatal em que se detectou a presença de determinados anticorpos aglutinantes nos eritrócitos do recém-nascido e de seu pai, porém não no sangue materno. Tal constatação levou os autores a levantarem a hipótese de que antígenos fetais herdados do pai poderiam desencadear o processo de aloimunização após contato com a circulação materna, estimulando a formação de anticorpos antieritrocitários pela mãe.

No ano seguinte, Landsteiner e Wiener [42] demonstraram o paralelo entre a produção de anticorpos contra o antígeno de superfície das

hemácias de macacos Rhesus e os eritrócitos humanos, caracterizando as tipagens sanguíneas Rh positivo e negativo. Graças a esta descoberta, Levine et al. [43] demonstraram uma relação causal entre a produção materna de anticorpos relacionados ao sistema Rh e a DHPN, após a observação da presença de uma mesma aglutinina atípica no sangue de 12 gestantes Rh negativo com mau passado obstétrico e cujos maridos eram Rh positivo: o anticorpo denominado anti-D.

Entretanto, o mecanismo pelo qual as hemácias fetais Rh positivo sensibilizariam as gestantes Rh negativo ainda não estava bem estabelecido. Em 1954, Chown [2] demonstrou a ocorrência da passagem de hemácias fetais apresentando o componente paterno Rh positivo para a circulação materna por meio de sangramentos placentários e constatou que a presença dos eritrócitos fetais no sangue materno estimulam o sistema imune a produzir anticorpos anti-D capazes de atravessar a barreira placentária e promover a hemólise no feto. Desta maneira, concluiu-se a descoberta do ciclo de etiopatogenia da DHPN.

3.2 ANTECEDENTE OBSTÉTRICO

A história obstétrica de aloimunização em gestações anteriores mostrou-se relevante desde os primeiros estudos a respeito do assunto, inclusive para a definição da etiopatogenia da doença.

Dado o amplo espectro de apresentações da DHPN, variando desde uma anemia leve, manifesta no neonato por icterícia leve, até uma anemia

grave, levando a hidropisia e óbito intrauterino, faz-se necessária uma classificação do grau de acometimento pela doença. Considerando isto, gestações acometidas pela doença aloimune podem ser classificadas de acordo com o antecedente obstétrico da gestante conforme a sua gravidade em [35]:

- Doença leve: recém-nascido a termo necessitando apenas de fototerapia;
- Doença moderada: recém-nascido a termo submetido à exsanguíneo transfusão neonatal;
- Doença grave: óbito intrauterino, transfusão intrauterina ou recém-nascido pré-termo submetido à exsanguíneo transfusão neonatal.

Esta classificação traz benefícios principalmente ao auxiliar na determinação da frequência das avaliações ultrassonográficas e dopplervelocimétricas no início destas gestações.

Um dos primeiros estudos a demonstrar a importância do antecedente obstétrico de aloimunização foi realizado por Jacobs, em 1959 [44]. Um total de 135 gestações acometidas pela DHPN foi dividido em 4 grupos, de acordo com o antecedente obstétrico materno:

- Grupo 1: gestantes não sensibilizadas ou com filhos em gestações anteriores não afetados clinicamente, apenas com a presença de teste de Coombs direto fracamente positivo;
- Grupo 2: gestantes com antecedente de aloimunização leve a moderado ou gestantes primigestas com história de transfusão de sangue Rh positivo;

- Grupo 3: gestantes com antecedente obstétrico de óbito neonatal secundário à aloimunização;
- Grupo 4: gestantes que apresentavam antecedente obstétrico de um ou mais óbitos intrauterinos com fetos hidrópicos.

O prognóstico das gestações do grupo 1 foi considerado excelente, com a maioria dos fetos não acometidos e uma sobrevida de 95% dos acometidos pela DHPN. No grupo 2, todos os fetos Rh positivos foram acometidos, com uma sobrevida de 68,7%. As gestações classificadas nos grupos 3 e 4 apresentaram prognóstico reservado, com a ocorrência de óbito fetal ou neonatal de todos os casos em ambos grupos. O autor conclui, portanto, que a história obstétrica de aloimunização é relevante para a predição da gravidade de acometimento fetal e/ou neonatal da gestação em questão.

No momento histórico do estudo previamente descrito, o antecedente obstétrico e os títulos de anticorpos anti-D formavam isoladamente a base para o seguimento pré-natal e indicação de resolução das gestações aloimunizadas. Com o advento da espectrofotometria do líquido amniótico a 450 nm como forma de acesso indireto ao status da hemoglobina fetal [45], a avaliação da história obstétrica de aloimunização passou a ter um papel auxiliar na determinação de condutas intervencionistas ou resolutivas nestas gestações.

Nicolaides [36], em 1994, compara o antecedente obstétrico de aloimunização, a concentração de hemoglobina fetal obtida por cordocentese ou fetoscospia (avaliada de acordo com o déficit de DPs em

relação ao valor médio de hemoglobina fetal para a IG) e a idade gestacional em que foi realizado o procedimento em uma população de 272 gestações aloimunizadas, entre 17 e 36 semanas de gestação (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação entre o antecedente de doença hemolítica perinatal e a concentração de hemoglobina fetal em 272 gestações aloimunizadas submetidas a cordocentese ou fetoscopia

Antecedente obstétrico	Grupo (n)	IG procedimento (semanas)	dHb fetal (DP)
Ausente ou história leve	95	27	- 3,4
EXT ou OF IG > 32 semanas	77	24	- 3,8
EXT ou OF IG 28 – 32 semanas	44	23	- 4,2
EXT ou OF IG < 28 semanas	56	21	- 4,9

Adaptado de Nicolaides [36]

NOTA: dHb, déficit de hemoglobina fetal em relação à média para a idade gestacional; DP, desvio padrão; EXT, exsanguíneo transfusão; IG, idade gestacional; OF, óbito fetal.

A partir destes dados, o autor conclui que os fetos de gestações aloimunizadas sem antecedente obstétrico de DHPN ou com história leve apresentam menor déficit de hemoglobina em relação à média para a idade gestacional do que aqueles cujas mães apresentam história prévia de aloimunização moderada ou grave. Além disso, a pesquisa direta de anemia fetal por métodos diagnósticos invasivos é considerada mais tardiamente nestes fetos.

Mesmo com o subsequente progresso no desenvolvimento de técnicas não invasivas ainda mais sensíveis e específicas para o acompanhamento das gestações aloimunizadas, como o estudo dopplervelocimétrico da ACM [34], a análise do histórico de acometimento pela doença manteve seu papel bem estabelecido na predição de gravidade da doença. Deste modo, a gravidade da doença e a idade gestacional em que ela se manifestou em gestações anteriores têm importância para a orientação da investigação de anemia na gestação atual.

Gestantes com histórico de TIU, óbito fetal ou neonatal, hidropisia ou necessidade de exsanguíneo transfusão neonatal apresentam chances progressivamente maiores de acometimento fetal e de sua ocorrência em idades gestacionais mais precoces a cada gestação subsequente afetada [37]. A sensibilização pela ocorrência de natimorto ou feto hidrópico em gestação anterior atribui ao feto da gestação atual 90% de chance de desenvolver hidropisia e evoluir para óbito na ausência de intervenções terapêuticas [36]. Já a ausência de antecedente obstétrico de DHPN confere baixo risco de acometimento fetal, com a chance de OF de 6% caso não receba tratamento [46].

O acompanhamento ultrassonográfico com avaliação do pico sistólico de velocidade da ACM deve ser iniciado dez semanas antes da idade gestacional de ocorrência do óbito intrauterino, do parto de recém-nascido gravemente acometido ou da primeira TIU na gestação previamente acometida [36]. Não há necessidade de iniciar esta vigilância antes de 17-18 semanas de gestação, dado que o desenvolvimento de hidropisia fetal ou o

OF não ocorrem antes desta idade gestacional, presumivelmente porque o sistema retículo endotelial ainda é muito imaturo para desencadear o processo de hemólise imunomediada nesta fase [47].

O antecedente obstétrico de aloimunização, portanto, continua apresentando papel relevante no acompanhamento de gestações aloimunizadas, tendo um caráter resolutivo no passado e assumindo caráter preditor de gravidade nos dias atuais.

3.3 TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI-D

A titulação de anticorpos anti-D é utilizada na avaliação das gestações aloimunizadas desde a descoberta da etiopatogenia da DHPN. Na era que antecedia o diagnóstico invasivo para a anemia fetal, este dado era utilizado, em conjunto com o antecedente obstétrico, como um guia para determinação do momento mais adequado para a realização do parto, a fim de evitar principalmente o óbito intrauterino e reduzir as complicações neonatais.

3.3.1 Métodos de quantificação de anticorpos

A quantificação de anticorpos anti-D e a sua correlação com a gravidade da DHPN podem ser avaliadas por diferentes métodos laboratoriais. Dentre eles, os mais frequentemente empregados na prática

clínica são a titulação de anticorpo por técnicas manuais de aglutinação, a quantificação por técnicas automatizadas e o gel teste.

3.3.1.1 Titulação de anticorpo por técnicas manuais de aglutinação

A titulação de anticorpos por técnicas manuais é o método mais simples e mais comumente utilizado na rotina laboratorial para determinar a concentração relativa dos anticorpos capazes de atravessar a placenta e causar a DHPN. Método da reação de aglutinação por diluição em tubo ou titulação manual pelo teste indireto de antiglobulina humana (ou Coombs indireto) são diferentes denominações para o mesmo método de quantificação de anticorpos anti-D. Nesta técnica, o soro da gestante é diluído seriadamente e testado contra eritrócitos apropriados para que seja determinada a mais alta diluição na qual ocorre a reação. O método deve incluir a fase de antiglobulina direta usando reagente Anti-IgG. O resultado é expresso como o inverso do ponto final da titulação. A titulação deve ser realizada exatamente da mesma forma, cada vez que o soro da gestante for testado. Os eritrócitos utilizados para cada titulação devem ser do mesmo genótipo (de preferência do mesmo doador), com aproximadamente o mesmo tempo de estocagem e na mesma concentração. A primeira amostra de soro da gestante deve ser congelada e testada paralelamente com amostras subsequentes. Apenas uma diferença superior a duas diluições deverá ser considerada como mudança significativa no título [48]. Este método é amplamente utilizado no seguimento das gestações aloimunizadas por

instituições de saúde do nosso país devido a simplicidade de sua técnica e pela sua correlação clínica com o risco de anemia fetal demonstrado na literatura [25, 29, 32, 37].

Contudo, o método apresenta críticas que se fundamentam principalmente na apreensão quanto à inexatidão, à subjetividade inerente ao título obtido e ao valor clínico limitado de resultados, quando correlacionados com a gravidade da DHPN, segundo alguns autores [49].

3.3.1.2 Quantificação por técnicas automatizadas

A quantificação de níveis de anti-D por técnica de análise automática contínua é prática corrente na Europa e Reino Unido para a monitorização de gestações aloimunizadas, e a quantidade de anticorpo circulante é relatada em Unidade Internacional por mililitro (UI/ml), segundo o Padrão Internacional. A técnica, que utiliza hemácias tratadas enzimaticamente pelo método metilcelulose-bromelina, mudou muito pouco desde a sua primeira descrição [50], com suas sucessivas gerações continuando a ser utilizadas devido à capacidade de processamento de um grande número de amostras e de determinação dos níveis de anticorpos com maior precisão do que a titulação manual [51]. Entretanto, relata-se como desvantagens do método a complexidade do equipamento, a necessidade de equipe especializada para o preparo dos reagentes utilizados e o alto custo.

3.3.1.3 Gel teste

O gel teste, também conhecido por teste de microcoluna em gel, é um método de titulação de anti-D amplamente utilizado por bancos de sangue na Europa e América Latina desde 1991 para a tipagem ABO/Rh, teste de Coombs direto, pesquisa de anticorpos irregulares e fenotipagem de eritrócitos [52]. A sua popularidade cresceu devido à facilidade técnica, à baixa variabilidade no resultado do título obtido, à versatilidade da metodologia e, principalmente, à alta sensibilidade na detecção de anticorpos antieritrocitários quando comparado à técnica convencional de titulação em tubo [53]. No entanto, a sua utilização para monitoramento dos títulos de anti-D nas gestantes aloimunizadas ainda não se mostrou viável devido aos insucessos na definição de um título crítico por essa técnica e na demonstração de sua correlação clínica com a DHPN [53, 54].

Sendo assim, a atual aplicabilidade clínica do gel teste na DHPN limita-se à identificação dos anticorpos antieritrocitários, dado sua alta sensibilidade, com a titulação de anticorpos anti-D ainda sendo realizada pelo método da reação de aglutinação por diluição em tubo convencional.

3.3.2 Títulos críticos de anticorpos anti-D

O conceito de “título crítico” de anticorpo surgiu na década de 1960, com o advento da espectrofotometria do líquido amniótico a 450 nm [45], momento em que a titulação de anticorpos passou a ser utilizada também com o objetivo de selecionar as pacientes que deveriam ser submetidas a

este procedimento invasivo, dados os riscos inerentes ao procedimento. O "título crítico" de anticorpos foi definido então como o valor de titulação a partir do qual se justifica o encaminhamento para monitoramento da gestação em centro de medicina fetal de referência devido ao aumento do risco de anemia fetal moderada ou grave [31, 33].

Em um primeiro momento, a busca por um valor de título crítico baseava-se na correlação entre os títulos de anticorpos e a presença dos desfechos que conferem gravidade às gestações acometidas pela doença aloimune.

Em 1965, Freda [24], em avaliação de população de 771 gestantes aloimunizadas, constata que não houve perda gestacional ou óbito neonatal na primeira semana de vida nos casos de pacientes cujos títulos de anti-D eram ≤ 16, configurando um valor limite a partir do qual estes desfechos provavelmente ocorreriam. Este levantamento não discriminou as gestantes quanto à presença ou ausência de antecedente obstétrico de aloimunização.

Neste mesmo ano, Bowman e Pollock [25] avaliaram a correlação entre os títulos de anticorpos anti-D e a gravidade dos casos de gestações aloimunizadas. Dentre 220 gestantes em que a sensibilização ocorreu na gestação estudada, um grupo com 186 pacientes apresentou títulos de anti-D menores ou iguais a 8 e em um segundo grupo com 34 pacientes os títulos foram maiores que 8. No primeiro grupo, nenhuma gestação foi classificada como acometida por doença grave, tendo sido tratadas facilmente ou não necessitando qualquer tratamento. No grupo em que os títulos de anti-D foram superiores a 8, 22 gestações foram classificadas

como doença moderada ou que não necessitaram tratamento enquanto que 12 gestações apresentaram doença grave, com a sobrevivência do feto devido a indução prematura do parto ou com a ocorrência do óbito fetal.

Ainda neste mesmo estudo, foram avaliadas 115 gestantes que já haviam sido sensibilizadas em gestação anterior, porém sem necessidade de tratamento fetal ou neonatal. Estas gestações foram divididas em 3 subgrupos, de acordo com os títulos de anti-D: menores ou iguais a 8; entre 16 e 32; e maiores ou iguais a 64. Do total de 81 gestações do primeiro grupo (anti-D ≤ 8), 73 (90%) RNs não necessitaram de tratamento, 8 (10%) foram tratados facilmente e não ocorreu nenhum óbito. Dos 25 casos do segundo grupo (anti-D entre 16 e 32), em 5 (20%) os RNs não necessitaram de tratamento, em 17 (68%) os RNs foram tratados facilmente e em 3 (12%) ocorreu óbito fetal ou neonatal. Dentre as 9 gestações do terceiro grupo (anti-D ≥ 64), em 5 (55%) os recém-nascidos foram tratados facilmente e em 4 (45%) houve óbito fetal ou neonatal. Desta forma, os autores concluem que também nas gestações previamente sensibilizadas, porém sem antecedente obstétrico de DHPN, o risco de doença grave ocorre com títulos de anti-D maiores ou iguais a 8.

Em 1971, Jorgensen e Rebbe [26] correlacionam os títulos de anticorpos anti-D no sangue materno e no líquido amniótico com a necessidade de transfusão intrauterina ou parto prematuro terapêutico. Foram coletadas amostras de sangue e líquido amniótico de 50 pacientes num período de até 15 dias precedendo o parto e a titulação de anticorpos nestas amostras foi comparada com o nível de hemoglobina no sangue do

cordão umbilical. Estes autores concluem que pacientes com titulação de anti-D acima de 256 apresentam indicação de amniocentese para quantificação dos níveis de anti-D e bilirrubina no líquido amniótico e, a depender da faixa de risco para anemia em que o feto se encontrar, de TIU ou indução do parto.

Bowell et al. [27], em 1982, apresentam estudo envolvendo 260 gestantes aloimunizadas com objetivo de correlacionar a concentração máxima de anticorpos anti-D no soro materno (expressa em UI/ml, segundo o Padrão Internacional) e os desfechos de gravidade da DHPN, definidos como valor de hemoglobina de cordão menor que 10 g/dl e 14 g/dl, valores de bilirrubina de cordão acima de 4,7 mg/100ml e necessidade de exsanguíneo transfusão neonatal. Os autores concluem que a chance de o feto ou neonato ser gravemente acometido pela DHPN tem relação com a concentração de anti-D sérico e que há um aumento significativo desta chance quando a concentração máxima de anticorpos for superior a 4 UI/ml. O estudo afirma ainda que concentrações ascendentes de anti-D estão associadas a um aumento do risco da gravidade de acometimento da gestação, além do que um aumento superior a 50% na concentração de anticorpos indica que provavelmente o feto em questão é Rh positivo.

Em 1992, Nicolaides e Rodeck [28] investigam a associação entre a concentração de anticorpos anti-D maternos e o grau de anemia fetal. Foram avaliadas 273 gestações aloimunizadas entre a 17ª e a 38ª semanas de gestação. O grau de anemia foi definido pelo déficit de hemoglobina fetal em relação à curva de referência [55], com as amostras de sangue obtidas por

cordocentese ou fetoscopia. Em 42 gestações, a concentração materna de anticorpos era menor ou igual a 15 UI/ml e os fetos apresentavam no máximo anemia de grau moderado (déficit de hemoglobina < 3,0g/l). Em 19 gestações deste grupo houve aumento da concentração de anticorpos em coletas subsequentes. Destas, 8 gestações mantiveram-se com anti-D menor ou igual a 15 UI/ml e continuaram apresentando fetos normais ou no máximo com anemia moderada. Já das 11 gestações com aumento de anti-D acima de 15UI/ml, 6 fetos previamente hígidos tornaram-se anêmicos, demonstrando que a ascensão da concentração de anti-D é tão importante quanto o seu valor absoluto.

Dentre os 231 casos de gestantes cujas concentrações de anticorpos foram maiores que 15 UI/ml, todos apresentaram fetos com anemia moderada ou grave, sendo que em 56 casos estes se encontravam hidrópicos e/ou com anemia grave. O estudo determina, portanto, um nível crítico de anticorpos anti-D de 15 UI/ml para a população estudada, abaixo do qual as intervenções invasivas antenatais não estão indicadas.

Em 1994, Nicolaides et al. [36] apresentam novo estudo envolvendo 208 gestantes aloimunizadas, entre 17 e 36 semanas de gestação. Amostras de sangue fetal obtidas por fetoscopia ou cordocentese foram comparadas às respectivas concentrações maternas de anticorpos anti-D. A hemoglobina fetal foi avaliada de acordo com o déficit de hemoglobina em relação à curva de referência para a idade gestacional, em desvios padrão. Com base nos dados obtidos, os autores concluem que gestantes com concentrações de anti-D ≤ 5UI/ml apresentam 97% de chance de apresentar feto hígido,

enquanto que aquelas com anti-D ≥ 30UI/ml apresentam ao menos 59% de chance de apresentar feto com anemia e que ao menos 36% destes fetos manifestam a forma mais grave da doença.

Moise et al. [29], em 1995, apresentam estudo que compara três diferentes métodos sorológicos maternos de quantificação de anticorpos anti-D e a capacidade de predição de anemia fetal para cada uma dessas técnicas. Neste ensaio clínico, 47 amostras de sangue de gestantes aloimunizadas foram comparadas com amostras de sangue fetal obtidas no momento da cordocentese ou da transfusão intrauterina. A titulação de anticorpos anti-D no sangue materno das gestantes com fetos anêmicos foi significativamente maior do que a titulação das gestantes com fetos não anêmicos ou que não apresentavam em suas hemácias o antígeno para o qual a mãe era sensibilizada ($p<0,001$). A curva *ROC* deste estudo determinou que para títulos ≥ 16 a sensibilidade seria de 100% e especificidade de 18%, enquanto que para títulos ≥ 128 a sensibilidade manteria-se em 100% com um aumento da especificidade para 64%. O estudo propõe, portanto, que o título crítico de 128 apresenta maior capacidade de predição dos casos de anemia fetal grave com necessidade de tratamento intrauterino.

Em 1997, Gottvall e Hildén [30], em estudo retrospectivo, comparam a espectrofotometria do líquido amniótico a 450 nm, a titulação e a concentração de anticorpos anti-D maternos como métodos de predição de anemia e/ou hiperbilirrubinemia neonatal em uma população de 93 gestantes aloimunizadas, com exclusão daquelas submetidas a TIU. Os autores

concluem que casos com títulos maternos de anti-D ≤ 32 durante a gestação não apresentarão anemia ou hiperbilirrubinemia no período neonatal, enquanto que aqueles que apresentam títulos ≥ 1000 certamente manifestarão estes quadros. A espectrofotometria do líquido amniótico a 450 nm não acrescentaria dados relevantes para estas faixas de títulos, podendo ser dispensada nestes casos, sem perda de informações adicionais.

Entretanto, para gestações com títulos de anticorpos entre 64 e 512, a titulação de anticorpos isolada não se mostrou suficiente para a determinação da ocorrência dos desfechos analisados, sendo necessário método propedêutico adicional para seleção dos casos sob risco. Esperava-se que, de acordo com resultados de estudos anteriores, a espectrofotometria do líquido amniótico a 450 nm fosse relevante nestes casos. Contudo, o método não se mostrou eficaz para a predição da anemia e/ou hiperbilirrubinemia neonatal mesmo para esta população. A técnica que melhor auxiliou na distinção dos grupos de risco foi a determinação da concentração de anticorpos anti-D por métodos automatizados, que aumentaram a sensibilidade dessa avaliação. O estudo, portanto, determina título de anti-D ≤ 32 como valor crítico de segurança para ausência de anemia e/ou hiperbilirrubinemia neonatal e anti-D ≥ 1000 como título crítico para aumento do risco de ocorrência destes desfechos.

Dada a divergência entre os níveis críticos de anticorpos e as metodologias utilizadas nos diferentes estudos, o conhecimento da técnica de quantificação de anticorpos padronizada em determinada instituição e seu respectivo nível crítico é fundamental [21, 56]. Variação nos resultados

entre diferentes laboratórios não é de ocorrência incomum em razão das diversas técnicas utilizadas no mercado. Os níveis críticos de anticorpos também variam entre as instituições de acordo com a correlação clínica entre os títulos de anticorpos e os desfechos de gravidade da DHPN.

Para pacientes sensibilizadas sem antecedente obstétrico de DHPN, a maioria dos laboratórios adota títulos críticos de anti-D entre 8 e 32, com a titulação realizada por técnicas manuais de aglutinação (21, 32, 53), e entre 6 a 15UI/ml [31, 33], com a quantificação realizada por técnicas de análise automática contínua. A titulação não deve variar em mais de uma diluição para quantificação realizada em um mesmo laboratório, ou seja, se em diferentes coletas de uma mesma paciente os títulos forem de 8 e 16, isso não deve representar um verdadeiro aumento de anti-D na circulação materna [21].

A introdução da avaliação da dopplervelocimetria da ACM na predição de anemia fetal moderada ou grave mudou os paradigmas do monitoramento não invasivo das gestações aloimunizadas. Consequentemente, houve uma mudança em relação ao papel da avaliação dos títulos de anti-D no manejo pré-natal destas pacientes. Atualmente, a titulação de anticorpos é utilizada como um indicador da necessidade de seguimento mais criterioso de gestações cujos títulos apresentam-se acima dos valores críticos estabelecidos pelo serviço que assistirá à paciente.

Entretanto, o valor de título crítico de anti-D ainda é tema de discussão na literatura. Gooch et al. [33] sugerem uma estratificação de risco

para anemia fetal de acordo com a concentração de anticorpos no sangue materno e, para cada nível, a conduta mais adequada a ser aplicada:

- Níveis menores que 4 UI/ml: DHPN pouco provável; deve-se continuar monitoramento com quantificação a cada 4 semanas até a 28ª semana ou a cada 2 semanas após esta idade gestacional;
- Níveis entre 4 e 15 UI/ml: risco moderado para DHPN; deve-se encaminhar a gestante para centro de referência;
- Níveis acima de 15 UI/ml: risco de DHPN grave; deve-se encaminhar a gestante para centro de referência.

Os autores sugerem, portanto, que o monitoramento em centros de referência em medicina fetal seja realizado com níveis mais baixos do que os propostos por Nicolaides [28]. Essa conduta baseia-se na descrição da presença de casos de anemia fetal grave em gestações com níveis de anti-D abaixo de 15 UI/ml [27], e tem como objetivo aumentar a sensibilidade da triagem de gestações cujos fetos apresentam risco maior de anemia.

Recentemente, Walsh et al. [31] avaliam, em estudo retrospectivo envolvendo 66 gestantes aloimunizadas submetidas a TIUs em um período de 16 anos, o nível crítico de anticorpos anti-D para esta população baseado no valor de hemoglobina fetal no momento da primeira TIU. Com o nível crítico de anticorpos tradicionalmente utilizado (15 UI/ml), 20% dos casos de anemia moderada a grave não seriam diagnosticados, enquanto que adotando um nível crítico de 4 UI/ml, a sensibilidade seria de 100%, porém com taxa de falso positivo de 45%. O estudo encontrou como melhor nível crítico de anti-D para esta população um valor intermediário, de 6 UI/ml, em

que há maior otimização da triagem para centros de referência, com manutenção da sensibilidade em 100% e aumento da especificidade para 61%.

Não há, portanto, um consenso na literatura sobre o valor crítico de anticorpo capaz de predizer os casos de anemia fetal. A Tabela 2 resume os estudos descritos anteriormente, demonstrando de maneira objetiva tal diversidade.

Tabela 2 - Revisão de estudos sobre a determinação de valor crítico de anticorpo anti-D para predição de anemia fetal em gestantes aloimunizadas

Autor e Ano	Número de gestações estudadas (n)	Método de quantificação de anticorpos	Valor crítico Anti-D	Relação
Freda [24] 1965	771	Titulação em tubo	≤ 16	Ausência de óbito fetal ou neonatal na primeira semana de vida
Bowman e Pollock [25] 1965	335 (220 não sensibilizadas e 115 sensibilizadas)	Titulação em tubo	≥ 8	Aumento do risco de doença grave ou óbito neonatal
Jorgensen e Rebbe [26] 1971	50	Titulação em tubo	≥ 256	Indicação de amniocentese para espectrofotometria do líquido amniótico a 450 nm
Bowell et al. [27] 1982	260	Análise automatizada	< 4 UI/ml	Baixo risco para desenvolvimento de anemia fetal
Nicolaides e Rodeck [28] 1992	237	Análise automatizada	≥ 15 UI/ml	Alto risco de anemia fetal grave com necessidade de TIU
Nicolaides et al. [36] 1994	208	Análise automatizada	≤ 5 UI/ml	Baixo risco para desenvolvimento de anemia fetal
Moise et al. [29] 1995	47	Titulação em tubo	≥ 128	Alto risco de anemia grave com necessidade de TIU
Gottvall e Hildén [30] 1997	93	Titulação em tubo	≤ 32 e ≥ 1000	≤ 32 e ≥ 1000 – alto risco de ausência e presença de anemia ou hiperbilirrubinemia neonatal, respectivamente
Walsh et al. [31] 2014	66	Análise automatizada	≥ 6 UI/ml	Alto risco de anemia moderada ou grave

TIU, transfusão intrauterina.

3.4 TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI-D EM GESTANTES COM ANTECEDENTE OBSTÉTRICO DE ALOIMUNIZAÇÃO

A temática da correlação entre os títulos de anticorpos anti-D e a história obstétrica de gestação acometida pela aloimunização Rh é assunto recorrente desde os primórdios dos estudos da DHPN.

Em 1962, Jacobs [38] estudou esta correlação em uma coorte de 220 gestações aloimunizadas, cujos cursos não foram influenciados por procedimentos invasivos ou partos prematuros terapêuticos. As gestantes foram divididas em 3 grupos, de acordo com o antecedente de aloimunização. No grupo 1, encontrava-se 103 gestantes sem antecedente de acometimento fetal ou neonatal pela doença aloimune. A taxa de sobrevida deste grupo foi de 91%, sendo que os sobreviventes apresentaram títulos de anti-D menores ou iguais a 64 e eram acometidos no máximo pela DHPN em grau leve. No grupo 2, encontrava-se 51 gestantes com história obstétrica de uma ou mais crianças afetadas pela doença em gestações anteriores e que sobreviveram. As gestações foram subdivididas de acordo com a ascensão dos títulos de anti-D. A sobrevida neste grupo apresentou uma relação inversamente proporcional com a ascensão dos títulos de anticorpos, sendo que a taxa média de sobrevida foi de 70,6%. No grupo 3, foram avaliadas 66 gestantes com antecedente obstétrico de um ou mais óbitos fetal ou neonatal em decorrência da aloimunização. Neste grupo, a taxa de sobrevida foi de 13,5%. Devido à baixa taxa de sobrevida deste grupo, o autor não considerou necessária a

realização da correlação com os títulos, dado o prognóstico reservado destas gestações.

Baseando-se nestes dados, o autor conclui que o melhor método de predição de gravidade em gestações aloimunizadas seria a correlação entre a história obstétrica de DHPN e os títulos de anticorpos anti-D, sendo que o comportamento dos títulos durante a gestação apresenta uma importância maior que o seu valor absoluto, independente do antecedente obstétrico de doença aloimune. Além disso, o autor não encontrou nenhum óbito quando os títulos de anti-D permaneceram menores ou iguais a 8, tanto nas gestantes em que a sensibilização ocorreu pela primeira vez na gestação estudada quanto naquelas que apresentavam fetos acometidos em gestações anteriores, determinando um valor de título crítico para a população estudada.

Bowman e Pollock [25], em estudo compreendendo 426 gestações aloimunizadas no período de 1954 a 1961, comparam a ocorrência de desfechos de gravidade da DHPN com as duas ferramentas propedêuticas de seguimento destas gestações existentes na época: a história obstétrica de aloimunização e os títulos de anticorpos anti-D. Desta população estudada, 67 gestações evoluíram com óbito fetal ou neonatal e 54 sobreviveram devido à indução do parto prematuro terapêutico. A análise retrospectiva dos dados revela uma predição correta do grau da doença, de acordo com a titulação de anticorpos e o antecedente obstétrico, em 62% dessas 121 gestações com desfechos graves, porcentagem considerada relativamente baixa pelos próprios autores.

Bowell et al. [27], em 1982, além de determinarem um valor crítico de anti-D (4 UI/ml) acima do qual há aumento no risco de anemia fetal, conforme previamente descrito, comparam as concentrações de anticorpos anti-D no soro materno com os valores de hemoglobina no cordão umbilical de fetos Rh positivo de dois grupos: o de gestantes que apresentavam acometimento pela DHPN em gestação anterior e o daquelas sem história obstétrica prévia. Para uma mesma faixa de títulos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de hemoglobina entre os dois grupos no momento da cordocentese. Contudo, os desfechos de gravidade para uma mesma faixa de títulos apresentou-se bastante variável e o estudo não se mostrou capaz de afirmar se esta variação seria causada pela presença ou ausência deste antecedente obstétrico de aloimunização, conforme enfatizado pelos autores. Esta diversidade de desfechos, de acordo com o estudo, deve-se provavelmente a fatores como a taxa de transferência de anticorpos pela placenta, o período de contato das hemácias fetais com os anticorpos, o genótipo fetal e a resposta do metabolismo fetal à hemólise.

Ainda em um momento prévio à consagração da dopplervelocimetria da ACM como um dos principais métodos para a predição de anemia fetal, Iskaros et al. [35] desenvolvem um estudo prospectivo envolvendo 19 gestantes com o objetivo de avaliar técnicas não invasivas de predição de anemia fetal. Os métodos avaliados foram: a concentração de títulos de anticorpos anti-D; o antecedente obstétrico de DHPN (caracterizado como nenhum, leve, moderado ou grave); os achados ultrassonográficos

sugestivos de anemia fetal (tais como presença de hidropisia, hepatomegalia e/ou esplenomegalia); e a velocidade máxima (Vmáx) da veia umbilical. Os autores concluem que a utilização dos métodos ultrassonográfico e dopplervelocimétrico da veia umbilical não podem ser utilizados isoladamente na predição de anemia fetal, dada a ocorrência de um caso de anemia grave com desenvolvimento de hidropisia fetal em que estes parâmetros não mostraram quaisquer indícios que sugerissem a evolução do quadro, enquanto que a avaliação da história obstétrica de aloimunização e os títulos de anticorpos ascendentes indicavam um aumento na gravidade do caso. O estudo, portanto, não apresenta inovações na propedêutica da DHPN; contudo, reafirma a importância da avaliação do comportamento dos títulos de anti-D em gestações com antecedente obstétrico de gravidade.

Com o advento da avaliação do pico de velocidade sistólica da ACM para a predição de anemia fetal moderada ou grave, diversos estudos procuraram comparar esta nova técnica não invasiva com os métodos propedêuticos estabelecidos até então. Um destes estudos, realizado por Haugen et al. [20], analisa gestantes sob risco de anemia fetal leve ou moderada de acordo com o antecedente obstétrico de gravidade, com exclusão daquelas com história obstétrica grave de aloimunização. Em relação à titulação de anticorpos, 32 gestações foram avaliadas, sendo que 22 fetos não evoluíram com anemia fetal e 10 fetos tornaram-se anêmicos. No grupo dos anêmicos, destaca-se a presença de gestantes com antecedentes obstétrico leve ou moderado de aloimunização, caracterizados pela necessidade de fototerapia (leve) ou de exsanguíneo transfusão a

termo (moderado). Observou-se que a titulação máxima de anti-D atingida não apresenta valor clínico para o seguimento destas gestações, mas a ascensão de quatro ou mais títulos apresenta sensibilidade de 70% e especificidade de 86% para predição de anemia fetal, muito semelhante aos valores encontrados pelos autores com a avaliação do pico sistólico da ACM nesta população. Sendo assim, os autores concluem que os métodos não invasivos em conjunto melhoram a predição de anemia fetal, contudo, não encontram dados suficientes para que haja o abandono dos testes invasivos na determinação deste quadro patológico fetal.

Lobato e Soncini [39] avaliam, em 2008, a relação entre a história obstétrica de aloimunização e a gravidade da DHPN em 82 gestações de fetos com anemia moderada ou grave sem sinais de hidropisia. A idade gestacional de realização da primeira TIU foi definida como indicador de gravidade da doença. A população estudada foi dividida em dois grupos: o de gestantes sem antecedente obstétrico de doença aloimune (23,2% das gestantes) e o de gestantes com história obstétrica de óbito fetal ou neonatal, hidropisia, TIU ou exsanguíneo transfusão secundários à aloimunização (76,8% das gestantes). A idade gestacional da primeira TIU apresentou diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,0001$), com mediana do primeiro grupo de 32,5 semanas e do segundo grupo de 27 semanas. Os autores demonstram ainda que, nas gestações com história obstétrica de DHPN, a correlação entre os títulos de anticorpos iniciais e a idade gestacional da primeira TIU é muito próxima de apresentar significância estatística ($p = 0,068$), com a mediana da titulação de chegada

de 256. Esse dado se opõe à visão estabelecida por grande parte da literatura de que diante da presença de antecedente obstétrico de aloimunização os títulos de anti-D não são bons preditores de anemia fetal [21, 32, 37], conforme discutem os autores no estudo.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo do tipo coorte retrospectivo.

4.2 ÉTICA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em 06/02/2013 (número do parecer: 193.991, Anexo 1).

A CAPPesq dispensou a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de estudo retrospectivo.

4.3 CASUÍSTICA

Foram selecionadas todas as gestantes com antecedente obstétrico moderado ou grave de doença hemolítica perinatal pelo anticorpo anti-D acompanhadas no Setor de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2014.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão:

I. Gestante Rh negativo com história de doença aloimune secundária ao anticorpo anti-D em gestação anterior classificada em:
   - Moderada: recém-nascido a termo submetido a exsanguíneo transfusão neonatal;
   - Grave: hidropisia fetal, óbito intrauterino, necessidade de transfusão sanguínea intrauterina, parto prematuro terapêutico ou recém-nascido pré-termo submetido a exsanguíneo transfusão;

II. Gestação única e sem malformação fetal associada;

III. Idade gestacional menor que 32 semanas no primeiro atendimento;

IV. Ausência de ascite, derrames cavitários (pericárdico ou pleural) ou hidropisia fetal na primeira avaliação ultrassonográfica;

V. Conhecimento do resultado pós-natal da gestação;

VI. Titulação de anticorpos realizada no Laboratório de Imunohematologia do HCFMUSP pelo método de diluição em tubo.

4.4 PROTOCOLO ASSISTENCIAL (HCFMUSP)

Na Clínica Obstétrica do HCFMUSP, a tipagem sanguínea materna e o teste de Coombs indireto ou a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) são solicitados na primeira consulta de pré-natal para todas as gestantes.

O acompanhamento pré-natal das gestantes Rh negativo depende do estado de sensibilização aos antígenos eritrocitários de superfície, da titulação de anticorpos e da tipagem sanguínea do parceiro em relação ao sistema Rh. Sendo o parceiro Rh negativo, não haverá risco de aloimunização materna pelo antígeno D, já que o feto seguramente será Rh negativo. Se o parceiro for Rh positivo, investigação adicional pode ser realizada pela pesquisa de Rh fetal no sangue materno; contudo, esta prática ainda não é oferecida de rotina pelo serviço.

Para todas gestantes Rh negativo não sensibilizadas realiza-se a pesquisa de anticorpos irregulares mensalmente e a profilaxia com imunoglobulina anti-D na dose de 300 µg na 28ª semana de gestação e em situações de risco para ocorrência de hemorragia feto-materna. Não havendo sensibilização durante a gestação, a profilaxia deve ser administrada com a mesma dose em até 72 horas do parto no caso de o recém-nascido ser Rh positivo.

No caso de gestante Rh negativo sensibilizada, classifica-se a história obstétrica de aloimunização em ausente, leve, moderada ou grave, de acordo com a ocorrência de eventos em gestações anteriores [35], e solicita-se a pesquisa de anticorpos irregulares mensalmente para a titulação dos anticorpos.

Na ausência de antecedente obstétrico de gravidade com títulos de anti-D ≥ 16 ou na presença de história leve de DHPN, é indicado acompanhamento ultrassonográfico e dopplervelocimétrico da ACM a cada

3-4 semanas até a 34ª semana de gestação e semanalmente após este período, se não houver alterações durante o seguimento.

Em gestações com antecedente obstétrico moderado ou grave de aloimunização, o acompanhamento deve ser realizado em intervalos menores, a cada 1-2 semanas, na ausência de sinais ultrassonográficos ou dopplervelocimétricos sugestivos de anemia fetal.

Na presença de derrame cavitário, hidropisia e/ou valores do pico de velocidade sistólica da ACM maiores do que 1,5 múltiplos da mediana (MoM), realiza-se cordocentese para determinação do valor de hemoglobina fetal com sangue preparado para transfusão intrauterina. Ressalta-se, contudo, a possibilidade de reavaliação dopplervelocimétrica em 2-3 dias nos casos de gestantes sem antecedente de DHPN ou com história leve que apresentem pico sistólico da ACM entre 1,5 e 2,0 MoM isoladamente (na ausência de sinais ultrassonográficos sugestivos de anemia fetal), com o objetivo de confirmar essa elevação da velocidade máxima e reduzir a taxa de falso positivo. As Figuras 1 e 2 mostram os fluxogramas do protocolo atual de assistência à gestante aloimunizada no HCFMUSP, de acordo com o seu antecedente obstétrico.

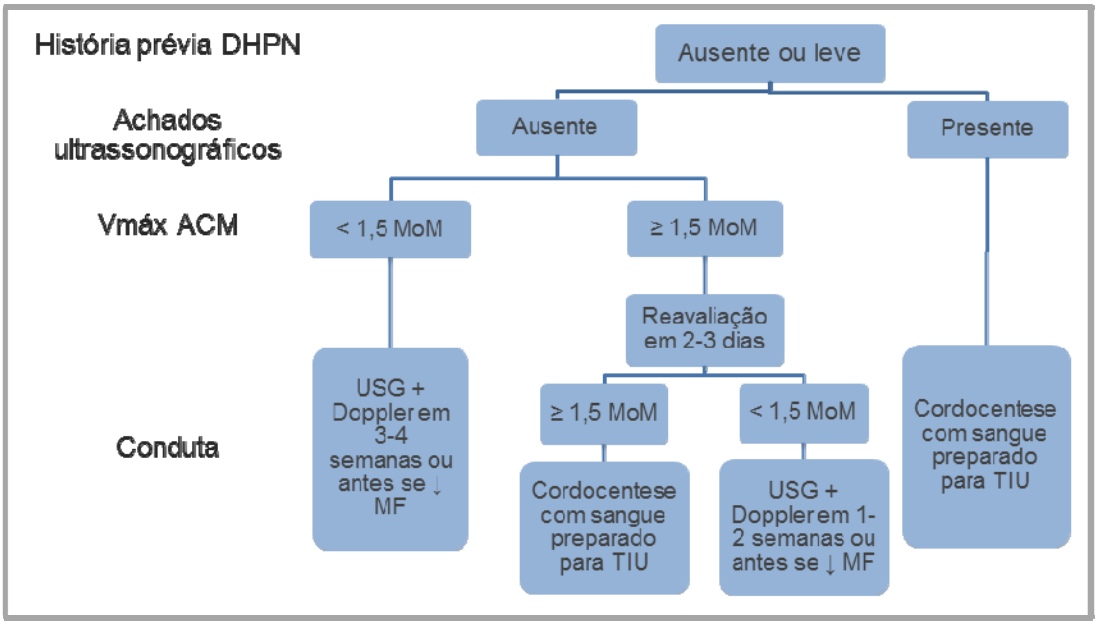

Figura 1 - Fluxograma de seguimento de gestações com antecedente obstétrico leve de aloimunização ou sem história prévia de doença hemolítica perinatal e títulos de anti-D ≥ 16 – HCFMUSP. DHPN, doença hemolítica perinatal; MF, movimentação fetal; MoM, múltiplos da mediana; TIU, transfusão intrauterina; USG, ultrassonografia; Vmáx ACM, velocidade máxima da artéria cerebral média

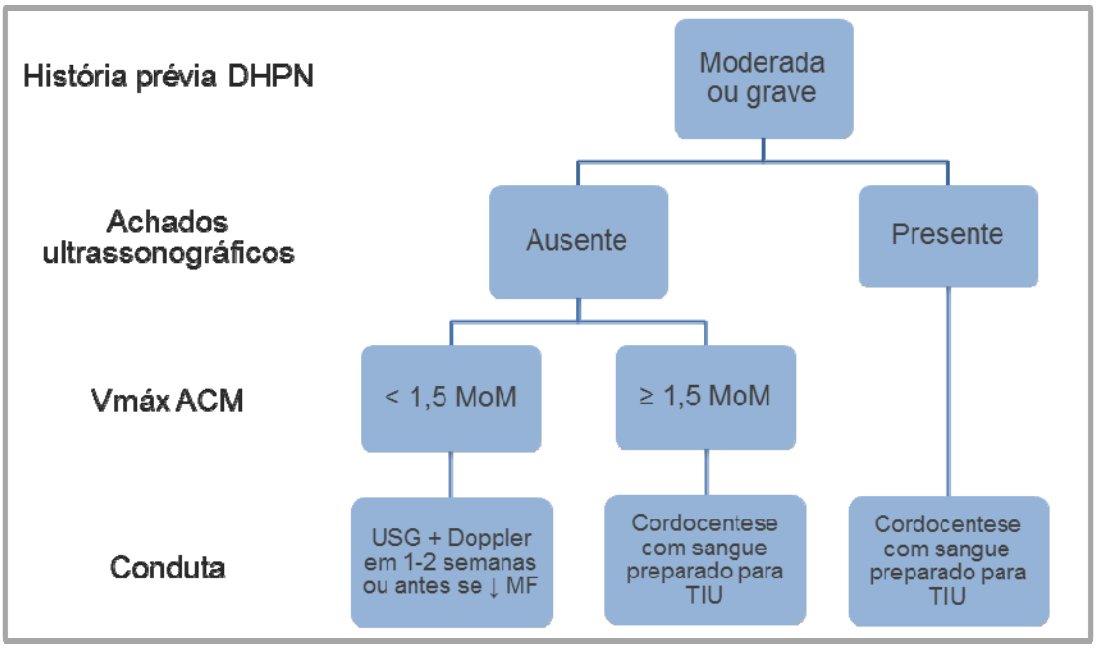

Figura 2 - Fluxograma de seguimento de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP. DHPN, doença hemolítica perinatal; MF, movimentação fetal; MoM, múltiplos da mediana; TIU, transfusão intrauterina; USG, ultrassonografia; Vmáx ACM, velocidade máxima da artéria cerebral média

4.5 COLETA DE DADOS

A identificação dos casos e a coleta dos dados referentes à gestação foram realizadas utilizando-se do banco de dados do sistema informatizado de laudos do Setor de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do HCFMUSP.

As informações do parto e do recém-nascido (RN) foram obtidas do sistema informatizado de Enfermaria da Clínica Obstétrica e de prontuário eletrônico do RN (Sigma) do HCFMUSP. Contato telefônico foi utilizado para obtenção destes dados quando o parto ocorreu em outra instituição.

Os resultados de exames laboratoriais de identificação e titulação de anticorpos foram coletados do banco de dados da Fundação Pró-Sangue e do sistema informatizado HCMED do HCFMUSP.

Todos os dados foram armazenados e, posteriormente, analisados em planilha eletrônica (Microsoft® Excel ®).

4.6 VARIÁVEIS

4.6.1 Demográficas maternas

- Idade (em anos);
- Cor: branca ou não branca (neste grupo inclui-se pacientes classificadas como negras, pardas ou amarelas);
- Paridade.

4.6.2 Antecedente obstétrico

As gestantes foram classificadas quanto ao antecedente obstétrico de DHPN [35] em:

- Doença moderada: recém-nascido a termo submetido a exsanguíneo transfusão neonatal;
- Doença grave: hidropisia fetal, óbito intrauterino, transfusão sanguínea intrauterina, parto prematuro terapêutico ou recém-nascido pré-termo submetido a exsanguíneo transfusão.

4.6.3 Desfecho de interesse

Foram considerados como de interesse ao estudo os seguintes desfechos gestacionais adversos secundários à doença hemolítica perinatal:

- Necessidade de transfusão sanguínea intrauterina;
- Ocorrência de óbito fetal.

4.6.4 Pesquisa de anticorpos irregulares

O tipo e a titulação de anticorpos irregulares foram pesquisados no momento do primeiro atendimento no serviço e mensalmente no decorrer da gestação, de acordo com o algoritmo da instituição. Para a quantificação dos anticorpos em títulos foi utilizado o método de diluição em tubo (em meio salino), realizado pelo Laboratório de Imunohematologia, conforme a técnica descrita por Coombs et al. [57].

Os títulos de anticorpos anti-D foram estratificados de acordo com níveis em:

- Títulos baixos: anti-D < 16;
- Títulos moderados: anti-D entre 16 e 64;
- Títulos altos: anti-D ≥ 128.

Para cada gestação estudada, foram avaliados os seguintes aspectos em relação aos títulos de anticorpos anti-D:

- Título inicial;

- Comportamento dos títulos de anti-D quantificados durante toda gestação ou até a ocorrência de um dos desfechos gestacionais adversos (TIU ou OF), de acordo com as tendências de estabilização, ascensão ou declínio em relação à primeira titulação. São considerados:
    - Estáveis: titulações com variação de 1 título para mais ou para menos;
    - Ascendentes: aumento da titulação em 2 ou mais títulos;
    - Descendentes: declínio da titulação em 2 ou mais títulos.

Não foi possível a realização desta classificação nas gestações com apenas uma titulação mensurada.

- Ascensão máxima da titulação de anti-D das gestações em que os títulos foram classificados como “ascendentes”;
- Associação ou não com outros tipos de anticorpos antieritrocitários.

4.6.5 Achados ultrassonográficos de anemia fetal

Foi avaliada a presença de achados ultrassonográficos correspondentes a anemia fetal no momento da admissão na instituição e ao longo da gestação. Considerou-se como sinais ultrassonográficos sugestivos de anemia fetal:

- Ascite: evidenciada como líquido livre na cavidade abdominal fetal, podendo variar desde um grau discreto, caracterizado pela presença de líquido livre entre as alças do intestino delgado na região pélvica

próxima à bexiga, a graus moderado e grave, facilmente identificáveis pela presença de líquido ascítico circundando todos os órgãos abdominais;

- Derrame pericárdico: caracterizado por região anecoica na cavidade pericárdica com espessura maior ou igual a 2 mm, medida durante a diástole ventricular;
- Derrame pleural: caracterizado pela presença de líquido no espaço pleural do feto;
- Edema de subcutâneo: definido como espessura de subcutâneo torácico acima de 5 mm ou da prega nucal acima de 6 mm;
- Hidropisia: definida pela presença de derrames em 2 ou mais cavidades.

4.6.6 Transfusão intrauterina

Foram avaliados a necessidade de transfusão intrauterina e o número de procedimentos realizados.

Referente à primeira TIU, foram coletados:

- Idade gestacional (em semanas);
- Pico de velocidade sistólica da ACM (em cm/s) e o correspondente MoM segundo a curva de Mari et al. [34];
- Nível de hemoglobina fetal obtido por cordocentese imediatamente antes da TIU (em g/dL) e a respectiva conversão para múltiplo de

desvio padrão de acordo com a idade gestacional, cujo cálculo é realizado pela seguinte fórmula:

Hb DP = (Hb medida – Hb média para a idade gestacional) / DP

DP = 0,93907
Hb média = [8,15544 + (0,15578 x IG)]
IG= idade gestacional

4.6.7 Óbito fetal

Foram coletados os seguintes dados referentes às gestações que evoluíram com a ocorrência do óbito intrauterino:

- Idade gestacional na admissão, na primeira e na última transfusão intrauterina e do diagnóstico do óbito (em semanas);
- Títulos iniciais de anticorpos anti-D;
- Comportamento dos títulos coletados até a ocorrência do óbito;
- Associação ou não com outros anticorpos antieritrocitários;
- Número de transfusões intrauterinas realizadas e valor de hemoglobina de amostra de sangue fetal obtida no primeiro procedimento (em g/dL).

4.6.8 Parto e recém-nascido

Os dados de parto e do recém-nascido coletados foram:

- Idade gestacional em que ocorreu o parto (em semanas);

- Via de parto: cesárea ou vaginal;
- Condição de nascimento: óbito intrauterino/natimorto; nativivo;
- Peso ao nascimento (em gramas);
- Sexo: feminino ou masculino;
- Tipagem sanguínea (em relação ao sistema Rh): positivo, negativo ou ignorado. As tipagens sanguíneas dos recém-nascidos de gestações que não foram submetidas a TIUs foram obtidas de seus respectivos prontuários eletrônicos. Nos casos em que ocorreu a realização deste procedimento, este dado foi obtido da amostra de sangue fetal coletada imediatamente antes da primeira transfusão ou por contato telefônico, sendo solicitado o resultado da tipagem sanguínea proveniente de exame realizado após o período neonatal, a fim de não haver erro de interpretação com a tipagem sanguínea da bolsa transfundida (O negativo). Contato telefônico também foi utilizado para obtenção destes dados quando o parto ocorreu em outra instituição.

4.6.9 Evolução do recém-nascido no berçário

Foi avaliado na evolução do recém-nascido no berçário:

- Necessidade de fototerapia e sua duração (em dias);
- Necessidade de exsanguíneo transfusão e o número de procedimentos;
- Condição de alta hospitalar (vivo ou óbito neonatal);
- Tempo de internação hospitalar (em dias).

4.6.10 Análise estatística

A análise descritiva das variáveis quantitativas foi feita pela observação de valores mínimos e máximos, bem como dos cálculos de média e desvio-padrão. Para as variáveis categóricas, foram descritas as frequências absoluta e relativa.

As comparações entre grupos foram realizadas pelos testes Chi-quadrado e/ou exato de Fisher, conforme apropriado.

A predição da necessidade de transfusão intrauterina ou de ocorrência de óbito fetal de acordo com os títulos de anticorpos maternos iniciais foi examinada pela curva *ROC* e foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), acurácia e razões de verossimilhança positiva (RVP) e negativa (RVN) para diferentes níveis críticos de anticorpos. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

O programa estatístico utilizado para os cálculos foi o StatsDirect® (versão 2.5.3, Reino Unido).

4.6.11 Tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi baseado nas seguintes premissas:

- Gestações aloimunizadas, com histórico de doença moderada ou grave, necessitam de transfusão intrauterina em 60% das ocasiões [35];
- Poder do teste de 80%;

- Nível de significância de 5%.

Para demonstrar que determinado nível crítico de anticorpos maternos implique em aumento significativo da frequência de transfusões intrauterinas para 90%, o tamanho amostral necessário é de 25 casos em cada grupo.

Por outro lado, para demonstrar que determinado nível crítico de anticorpos maternos implique em redução significativa da frequência de transfusões intrauterinas para 20%, o tamanho amostral necessário é de 17 casos em cada grupo.

5 RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2006 a dezembro de 2014, foram admitidas no setor de Medicina Fetal do HCFMUSP 89 gestantes com antecedente obstétrico de aloimunização pelo anticorpo anti-D classificado como moderado ou grave. Deste total, 31 (34,8%) casos não foram incluídos na casuística por:

- Presença de ascite, derrame pericárdico, edema de subcutâneo ou hidropisia fetal na primeira avaliação ultrassonográfica – 7 (7,9%) casos;
- Idade gestacional na admissão maior que 32 semanas– 5 (5,6%) casos;
- Não obtenção dos dados de parto e do recém-nascido, por falta de informações no prontuário ou insucesso do contato telefônico – 7 (7,9%) casos;
- Produto conceptual apresentando tipagem sanguínea conhecida Rh negativo – 12 (13,4%) casos.

Dessa forma, a população do estudo foi constituída por 58 (65,2%) gestações que preencheram os critérios de inclusão do estudo.

5.1 DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS MATERNAS

- **Idade**

Na população estudada, a média da idade materna foi de 33,0 ± 5,1 anos, com variação entre 24 e 43 anos (Figura 3).

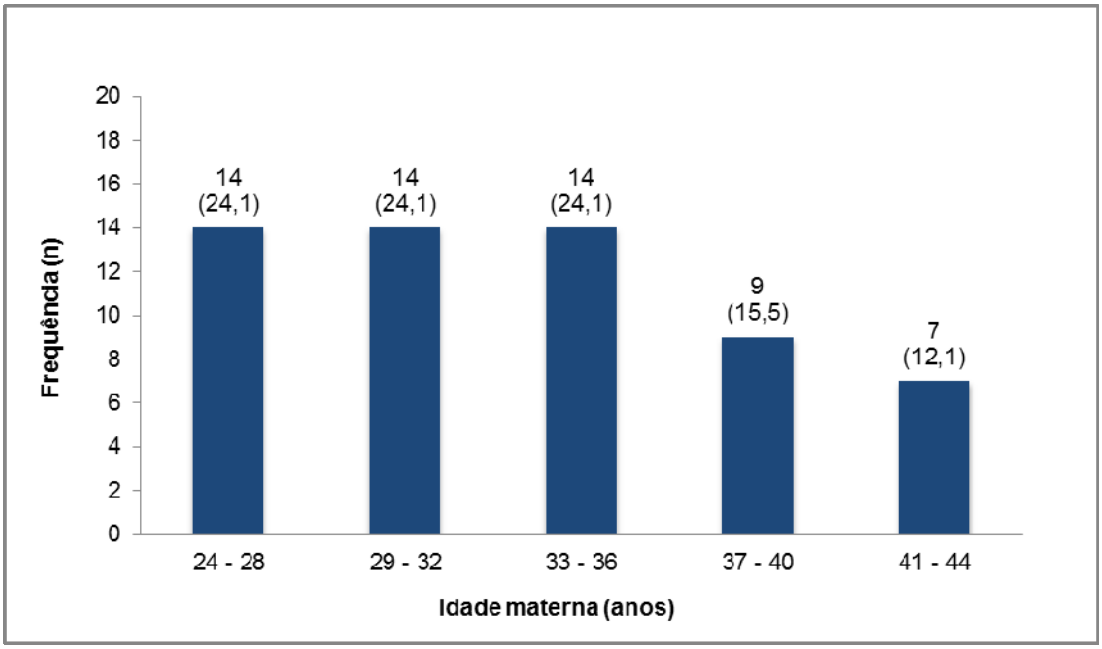

Figura 3 - Histograma de distribuição da idade materna, por faixa etária, de 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal - HCFMUSP - 2006 a 2014. Valores entre parênteses expressos em percentual

- **Cor**

Com relação à cor, 38 (65,5%) gestantes foram classificadas como brancas e 20 (34,5%) como não brancas.

- **Antecedente obstétrico**

Em relação ao número de gestações, a média foi 4,8 ± 2,1 gestações, com o mínimo de 2 e máximo de 16 gestações, sendo: 2 (3,4%) secundigestas, 12 (20,7%) tercigestas, 15 (25,9%) quartigestas e 29 (50%) apresentavam 5 ou mais gestações.

Quanto ao antecedente obstétrico de aloimunização, 18 casos (31%) apresentavam história moderada e 40 (69%) apresentavam história grave.

5.2 PRIMEIRO ATENDIMENTO

- **Idade gestacional**

A idade gestacional média no primeiro atendimento foi de 17,9 ± 7,6 semanas (mediana de 15,3 semanas), com o mínimo de 5,7 e máximo de 31,6 semanas (Figura 4). Do total de casos, 22 (37,9%) foram admitidos até 14 semanas, 35 (60,3%) até 20 semanas e 46 (79,3%) até 26 semanas.

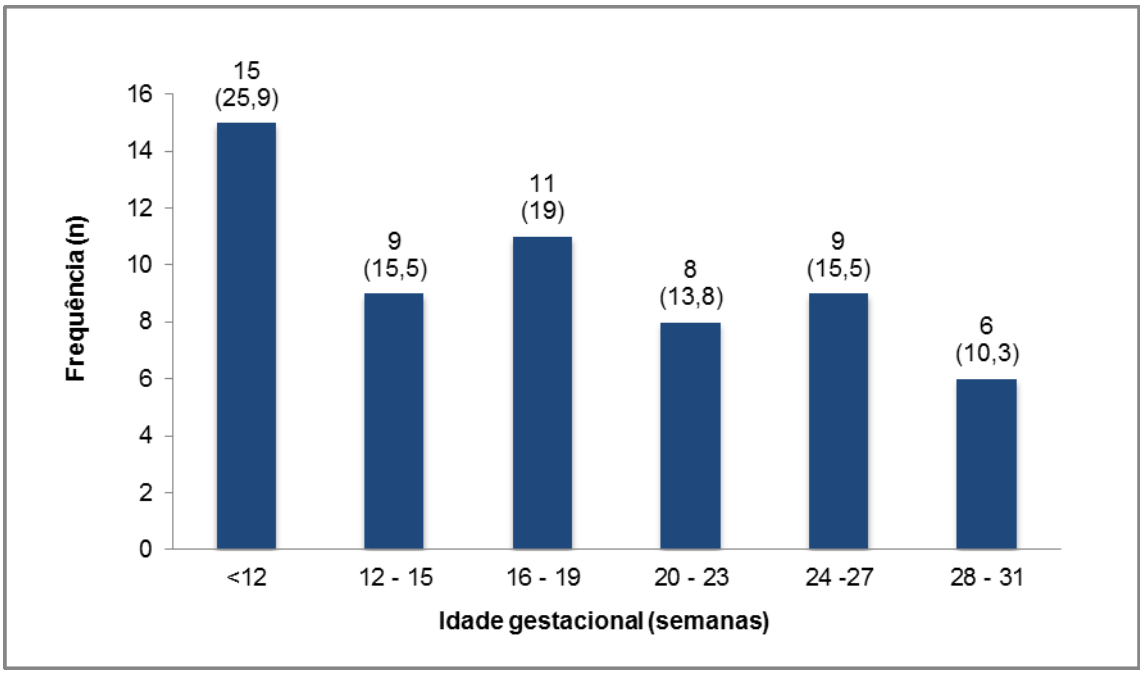

Figura 4 - Histograma de distribuição das gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com a idade gestacional na primeira avaliação no serviço - HCFMUSP - 2006 a 2014. Valores entre parênteses expressos em percentual

- **Anticorpos antieritrocitários**

Os títulos de anti-D iniciais foram classificados em: baixos em 10 (17,2%) casos, moderados em 22 (38,0%) casos e altos em 26 (44,8%) casos. A mediana dos títulos iniciais foi de 64. A Figura 5 apresenta a distribuição das gestações conforme os títulos de anticorpos anti-D na primeira avaliação no serviço.

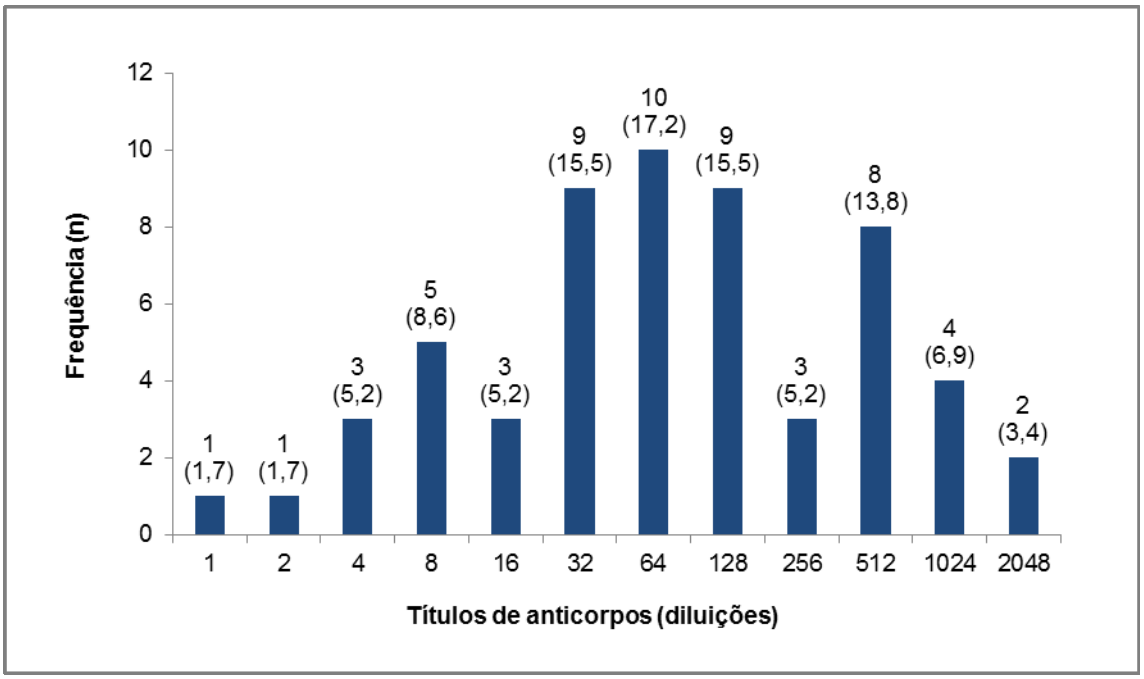

Figura 5 - Histograma de distribuição das gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com os títulos de anticorpos anti-D iniciais - HCFMUSP - 2006 a 2014. Valores entre parênteses expressos em percentual

O anti-D esteve presente como anticorpo isolado em 23 (39,7%) casos e em combinação com outros anticorpos antieritrocitários em 35 (60,3%) casos. Dentre os anticorpos associados, o anti-C foi o mais frequente, em 54,3% (19/35) das associações (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos tipos de associações de anticorpos de acordo com a sua frequência na população de gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014

TIPO DE ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS	FREQUÊNCIA (n)	PROPORÇÃO (%)
D + C	19	54,3
D + E	2	5,8
D + K	1	2,8
D + M	1	2,8
D + Autocrio Indeterminada	1	2,8
D + C + E	1	2,8
D + C + Dia	2	5,8
D + C + Lea	2	5,8
D + C + Jka	3	8,6
D + C + G	1	2,8
D + C + Alo IgG Indeterminada	1	2,8
D + C + Dia + Auto IgG Indeterminada	1	2,8

5.3 SEGUIMENTO PRÉ-NATAL

5.3.1 Achados ultrassonográficos

Do total da população estudada, 7 (12,1%, 7/58) gestações evoluíram com a presença de um ou mais achados ultrassonográficos sugestivos de anemia fetal no decorrer da gestação (derrame pericárdico, edema de subcutâneo, ascite ou hidropisia). Em 1 (14,3%, 1/7) caso não houve necessidade de transfusão intrauterina; contudo, esta gestação evoluiu para parto prematuro terapêutico com 35 semanas de idade gestacional.

Dentre estas gestações, em 3 (42,9%, 3/7) casos a primeira titulação de anticorpo avaliada foi classificada como moderada e em 4 (57,1%, 4/7) casos, alta. Nenhuma gestação que evoluiu com a presença de sinais ultrassonográficos sugestivos de anemia fetal apresentou títulos de anticorpos anti-D iniciais baixos.

5.3.2 Transfusões intrauterinas

Um total de 97 transfusões intrauterinas foram realizadas em 28 (48,3%, 28/58) gestações no período do estudo. O número de procedimentos realizados por gestação foi, em média, de 3,5 ± 2,1 transfusões, com o máximo de 8 transfusões realizadas durante uma mesma gestação. A Tabela 4 apresenta a distribuição da frequência de gestantes aloimunizadas submetidas a TIU de acordo com o número de procedimentos realizados.

Tabela 4 - Distribuição de 28 gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com o número de transfusões intrauterinas realizadas – HCFMUSP – 2006 a 2014

TRANSFUSÕES INTRAUTERINAS	GESTANTES (n)	FREQUÊNCIA (%)
1	6	21,4
2	6	21,4
3	4	14,3
4	3	10,7
≥ 5	9	32,2

A média da idade gestacional de realização da primeira TIU foi de 25,1 ± 5,3 semanas, com mínimo de 15,8 semanas e máximo de 34,0 semanas.

No momento da primeira TIU, o múltiplo da mediana do pico de velocidade sistólica da ACM apresentou média de 1,68 ± 0,17 MoM. O nível médio de hemoglobina fetal obtido por cordocentese imediatamente antes do primeiro procedimento foi de 6,3 ± 2,9 g/dL (mínimo de 2,5 g/dL e máximo de 12,7 g/dL), sendo que a respectiva conversão para múltiplo de desvio padrão de acordo com a idade gestacional apresentou média de -6,18 ± 2,8 DP.

O título de anticorpo anti-D obtido previamente à primeira TIU foi classificado como moderado em 8 (28,6%, 8/28) casos e alto em 20 (71,4%, 20/28) casos. Nenhuma gestação apresentou titulação classificada como baixa nesta ocasião.

5.3.3 Óbito fetal

Óbito fetal ocorreu em 7 (12,1%, 7/58) casos, com idade gestacional média do diagnóstico do óbito de 24,9 ± 4,3 semanas (mínimo de 21 semanas e máximo de 33,7 semanas). A Tabela 5 apresenta a descrição dos casos que evoluíram com a ocorrência de OF na população estudada.

Tabela 5 - Descrição dos casos de gestações com antecedente obstétrico moderado ou grave de doença hemolítica perinatal que evoluíram com a ocorrência de óbito fetal - HCFMUSP - 2006 a 2014

	PRIMEIRO ATENDIMENTO			SEGUIMENTO					DESFECHO
CASO	IG admissão (semanas)	Títulos anti-D iniciais	Associação com outros anticorpos	Comportamento de títulos anti-D	IG 1ª TIU (semanas)	Hb fetal 1ª TIU (g/dL)	Número de TIUs	IG última TIU (semanas)	IG óbito fetal (semanas)
1	8,8	2048	Sim	Declínio	19,2	3,2	7	24,4	24,4
2	27,1	512	Sim	Título único	27,2	9,4	3	33,4	33,7
3	14,8	1024	Sim	Estável	21,0	2,5	1	21,0	21,0
4	12,2	128	Não	Estável	25,4	2,8	1	25,4	26,2
5	12,2	64	Sim	Estável	NR	NR	NR	NR	21,0
6	12,2	128	Sim	Ascensão	23,4	3,3	1	23,4	23,8
7	7,0	1024	Sim	Estável	23,5	4,7	1	22,5	24,2

Hb fetal, hemoglobina fetal; IG, idade gestacional; NR, não realizou transfusão intrauterina; TIU, transfusão intrauterina.

5.3.4 Tipagem sanguínea do produto conceptual desconhecida

Não foi possível confirmar a tipagem sanguínea do produto conceptual em 7 (12,1%, 7/58) casos. Em 6 (85,7%, 6/7) casos foram realizadas transfusões intrauterinas durante a gestação e em 1 (14,3%, 1/7) caso este procedimento não foi executado, impossibilitando a obtenção deste dado, uma vez que esta gestação evoluiu com a ocorrência do óbito fetal (diagnosticado com a idade gestacional de 21 semanas).

Dentre as 6 gestações que foram submetidas a TIUs e das quais não foi colhida a tipagem sanguínea do feto, o nível médio de hemoglobina fetal obtido por cordocentese imediatamente antes do primeiro procedimento foi de 4,7 ± 2,8 g/dL e a respectiva conversão para múltiplo de desvio padrão de acordo com a idade gestacional apresentou média de -7,47 ± 2,6 DP. Em 4 (66,6%, 4/6) casos ocorreu o óbito intrauterino; em 1 (16,7%, 1/6) caso a determinação da tipagem sanguínea foi prejudicada devido à realização de TIU próximo ao parto, sem coleta de novo exame após a alta hospitalar; e em 1 (16,7%, 1/6) caso, cujo parto ocorreu em outro serviço, a mãe não soube informar tal dado.

5.4 O PARTO E O RECÉM-NASCIDO

A idade gestacional média do parto dos 51 nascidos vivos foi de 35,9 ± 2,2 semanas, com mediana de 36,0 semanas, sendo que 19 (37,2%, 19/51) fetos nasceram a termo e 32 (62,8%, 32/51) foram prematuros. A média da idade gestacional dos 22 nascidos vivos submetidos a TIU durante a gestação foi de 34,3 ± 2,1 semanas enquanto que a média dos 29 não submetidos a este procedimento foi de 37,1 ± 1,4 semanas (p<0,001). A Figura 6 apresenta a distribuição da idade gestacional de parto dos nascidos vivos da população estudada de acordo com a realização de TIU durante a gestação.

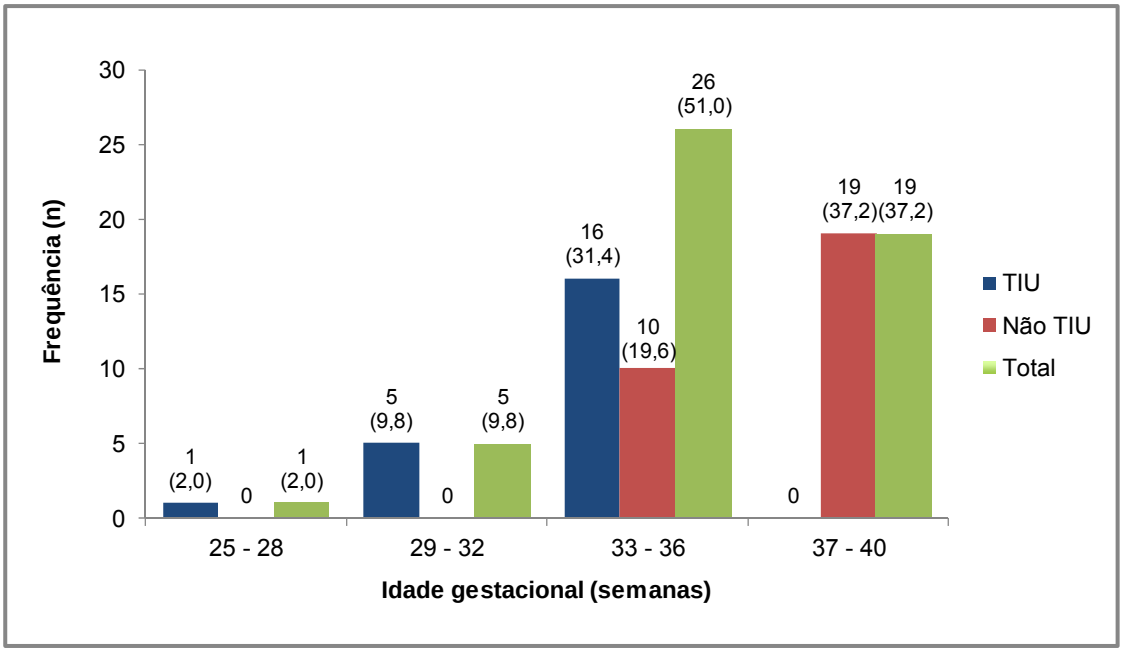

Figura 6 - Histograma de distribuição da idade gestacional de parto dos 51 nascidos vivos de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com a necessidade de transfusão intrauterina (TIU) - HCFMUSP - 2006 a 2014. Valores entre parênteses expressos em percentual

A via de parto mais frequente foi a cesárea em 44 (86,3%, 44/51) casos, enquanto que o parto vaginal ocorreu em 7 (13,7%, 7/51) casos.

O peso médio ao nascimento dos 51 nascidos vivos foi de 2660,3 ± 508,0g, variando entre 1000g e 3460g. Dentre os 22 nascidos vivos que foram submetidos a TIU, a média de peso foi de 2457,5 ± 524,0g enquanto que entre os 29 recém-nascidos que não foram submetidos a este procedimento a média de peso foi de 2814,2 ± 444,9g (p=0,014).

A distribuição por faixas de peso dos 51 nascidos vivos de acordo com a realização de TIU durante a gestação está representada na Figura 7.

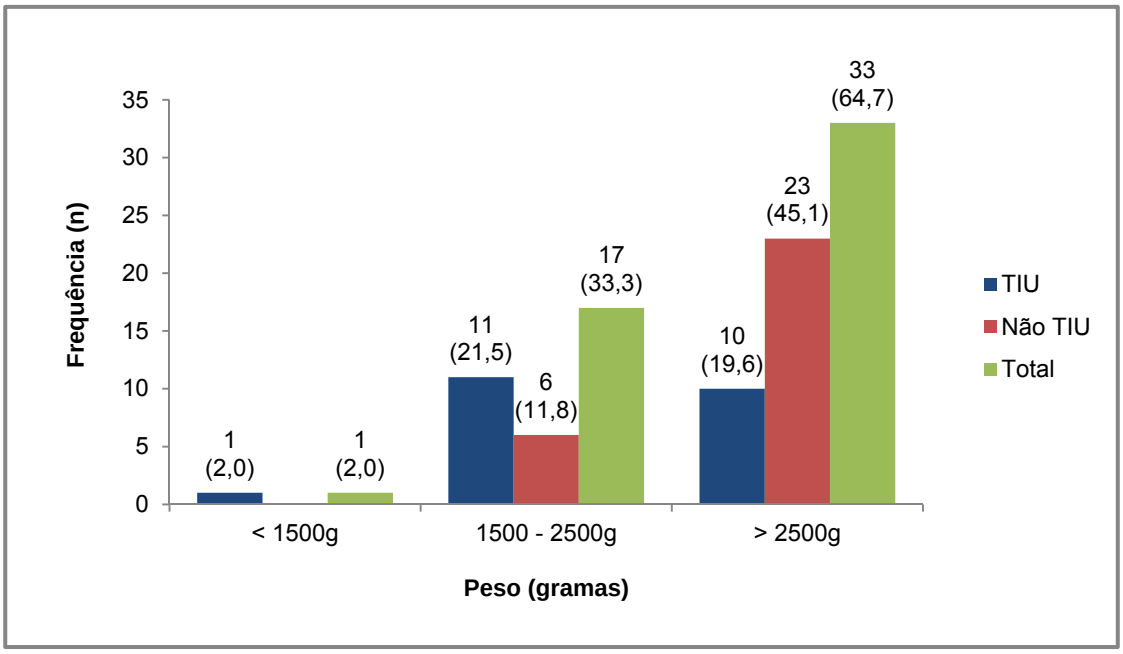

Figura 7 - Histograma de distribuição de peso ao nascimento dos 51 nascidos vivos de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo com a necessidade de transfusão intrauterina (TIU) - HCFMUSP - 2006 a 2014. Valores entre parênteses expressos em percentual

Quanto ao gênero, 24 (47,1%, 24/51) nascidos vivos eram do sexo feminino e 27 (52,9%, 27/51) do sexo masculino.

5.5 EVOLUÇÃO DO RECÉM-NASCIDO NO BERÇÁRIO

Durante o período de internação no berçário, 48 (94,1%, 48/51) recém-nascidos foram submetidos à fototerapia, com uma média de 7,4 ± 4,8 dias de duração. Trinta e quatro (66,7%, 34/51) RNs foram submetidos à exsanguíneo transfusão, com uma média de 1,5 ± 0,76 procedimentos realizados. Não houve diferença significativa entre as gestações que realizaram TIU e aquelas que não foram submetidas a este procedimento em relação à necessidade de exsanguíneo transfusão neonatal (p=0,23). A Figura 8 apresenta a frequência de exsanguíneo transfusão por recém-nascido de acordo com a necessidade de TIU durante a gestação.

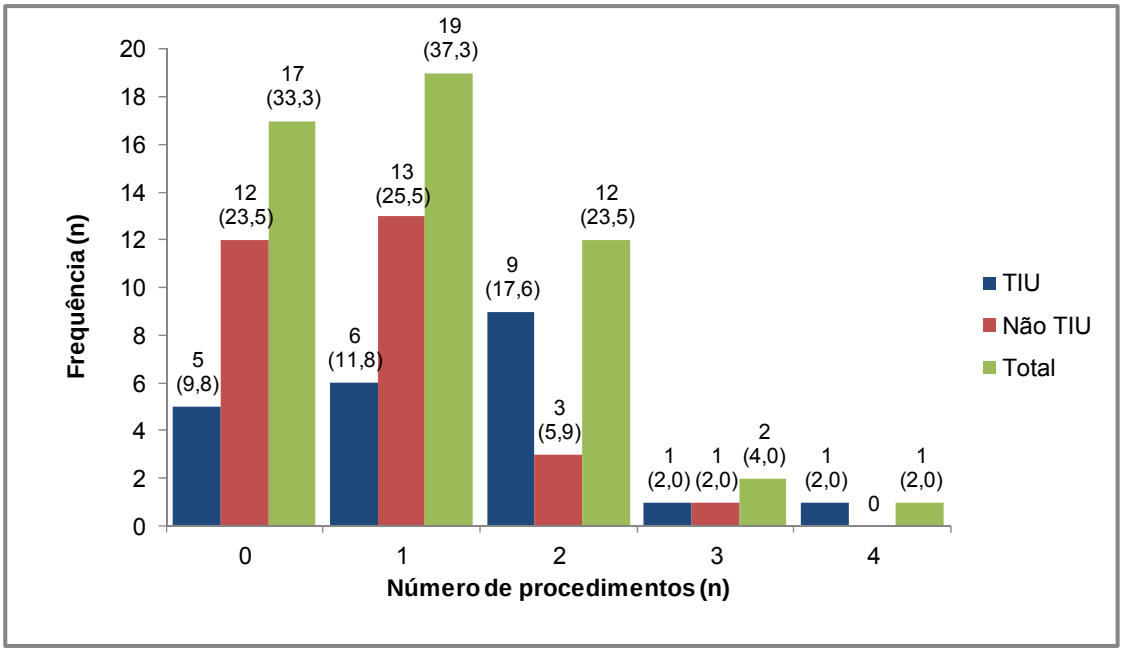

Figura 8 - Histograma de distribuição da frequência de exsanguíneo transfusões em 51 nascidos vivos de gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal de acordo a necessidade de transfusão intrauterina (TIU) - HCFMUSP - 2006 a 2014. Valores entre parênteses expressos em percentual

Não houve óbitos no período neonatal. O período de internação no berçário variou de 2 a 74 dias, com a média de 15,7 ± 16,3 dias.

5.6 RELAÇÃO ENTRE TÍTULOS DE ANTICORPOS MATERNOS E DESFECHOS GESTACIONAIS ADVERSOS

5.6.1 Títulos de anticorpos iniciais

As gestações estudadas foram estratificadas de acordo com o nível de titulação de anticorpo anti-D inicial em título baixo (<16), moderado (entre 16 e 64) ou alto (≥128), e foi avaliada a ocorrência ou não de desfechos gestacionais adversos (TIU ou OF) nos diferentes níveis, conforme a Tabela 6.

Houve diferença estatisticamente significativa para ocorrência dos desfechos gestacionais adversos comparando os 3 níveis de títulos de anticorpos maternos iniciais (p<0,001). Gestantes com títulos iniciais de anti-D>128 apresentam aumento na chance da necessidade de TIU ou da ocorrência de OF em 3,33 vezes (RVP: 3,33; IC 95%: 1,68 - 7,23) em comparação àquelas que apresentam títulos iniciais baixos. Não houve aumento ou redução na chance de ocorrência destes desfechos para casos que apresentavam títulos iniciais moderados (RVP: 0,57, IC95%: 0,28 - 1,12).

Tabela 6 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o título materno inicial de anticorpo anti-D, em 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014

ANTICORPO ANTI-D (Título)	n (%)	DESFECHO ADVERSO n (%)		RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA POSITIVA (IC95%)
		Presente	Ausente	
Baixo (< 16)	10 (17,2)	1 (10)	9 (90)	0,11 (0,02 - 0,61)
Moderado (16 – 64)	22 (38,0)	8 (36,4)	14 (63,6)	0,57 (0,28 - 1,12)
Alto (≥ 128)	26 (44,8)	20 (76,9)	6 (23,1)	3,33 (1,68 - 7,23)

P<0,001

A Tabela 7 apresenta os valores de sensibilidade, especificidade, preditivos positivo e negativo, acurácia, bem como razões de verossimilhança positiva e negativa em diferentes níveis de títulos de anticorpos anti-D iniciais para a predição dos desfechos gestacionais adversos estudados.

Tabela 7 - Predição de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o título de anticorpo anti-D materno inicial, em 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014

Anti-D (Título)	Sensibilidade % (n)	Especificidade % (n)	Valor Preditivo % (n)		Acurácia % (n)	Razão de Verossimilhança (IC95%)	
			Positivo	Negativo		Positiva	Negativa
≥ 16	96,6 (28/29)	31,0 (9/29)	58,3 (28/48)	90,0 (9/10)	64,0 (37/58)	1,40 (1,12 - 1,91)	0,11 (0,02 - 0,61)
≥ 32	96,6 (28/29)	41,4 (12/29)	62,2 (28/45)	92,3 (12/13)	69,0 (40/58)	1,65 (1,26 - 2,38)	0,08 (0,01 - 0,44)
≥ 64	79,3 (23/29)	55,2 (16/29)	63,9 (23/36)	72,7 (16/22)	67,0 (39/58)	1,77 (1,17 - 2,87)	0,38 (0,17 - 0,78)
≥ 128	69,0 (20/29)	79,3 (23/29)	76,9 (20/26)	71,9 (23/32)	74,0 (43/58)	3,33 (1,68 - 7,23)	0,39 (0,21 - 0,66)
≥ 256	41,4 (12/29)	82,8 (24/29)	70,6 (12/17)	58,5 (24/41)	62,0 (36/58)	2,41 (1,02 - 5,94)	0,71 (0,48 - 0,99)

IC, intervalo de confiança.

A curva *ROC* que demonstra a relação entre os títulos maternos de anticorpos anti-D iniciais e a ocorrência de desfechos gestacionais adversos (TIU ou OF) apresentou área sob a curva de 0,78 (IC95%: 0,66 – 0,90), e revelou melhor ponto de corte em títulos anti-D ≥ 128, com sensibilidade de 69% (IC95%: 0,49 – 0,85) e especificidade de 79% (IC95%: 0,60 – 0,92, figura 9).

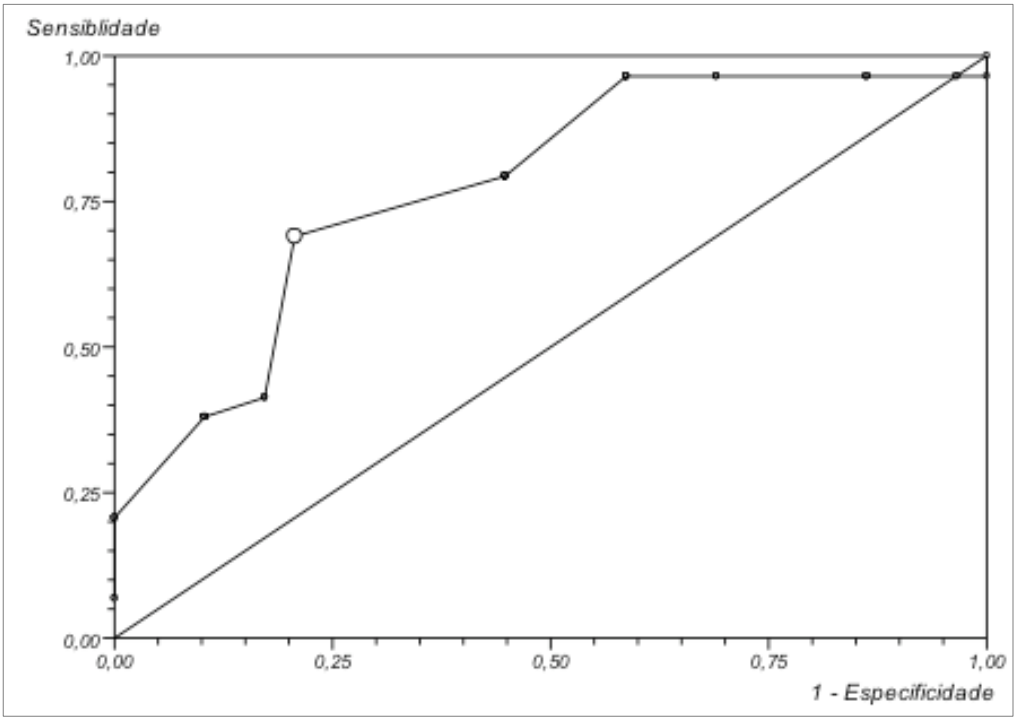

Figura 9 - Curva *ROC* para predição de necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal de acordo com os títulos maternos iniciais de anticorpos anti-D em gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal. Área sob a curva: 0,78 (IC95%: 0,66 – 0,90). Círculo vazio representa o melhor ponto de corte (título: 128) – HCFMUSP – 2006 a 2014

5.6.2 Comportamento dos títulos de anticorpos

Os títulos de anti-D quantificados foram classificados de acordo com a tendência de comportamento. Esta classificação considerou as titulações mensuradas durante toda gestação nos 29 (50,0%, 29/58) casos em que não ocorreu nenhum dos desfechos gestacionais adversos estudados. Nos 29 (50%, 29/58) casos em que tais desfechos ocorreram, esta classificação foi realizada com base nos títulos obtidos até o momento da primeira TIU (96,6%, 28/29) ou da ocorrência de óbito fetal (3,4%, 1/29).

Todos os casos (15,5%, 9/58) em que somente uma titulação foi mensurada foram submetidos a TIU. Dentre estes, o título inicial foi considerado moderado em 4 (44,4%, 4/9) casos e alto em 5 (55,6%, 5/9) casos.

Nos 49 (85,5%, 49/58) casos em que foram coletadas duas ou mais amostras para titulação de anticorpos, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de comportamento dos títulos de anticorpos anti-D (estabilização, ascensão ou declínio) quanto à ocorrência de OF ou necessidade de TIU (p=0,48, tabela 8).

Tabela 8 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o comportamento dos títulos maternos de anticorpo anti-D ao longo da gestação, em 58 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014

COMPORTAMENTO DOS TÍTULOS	TOTAL n (%)	DESFECHO ADVERSO n (%)		p
		Presente	Ausente	
Título único	9 (15,5)	9 (100)	0	
≥ 2 títulos				
Ascensão	14 (24,1)	5 (35,7)	9 (64,3)	0,48
Estabilização	30 (51,8)	14 (46,7)	16 (53,3)	
Declínio	5 (8,6)	1 (20)	4 (80)	

Os 14 casos que apresentaram comportamento ascendente foram subclassificados de acordo com o número de diluições (Tabela 9). Não houve diferença significativa para a ocorrência de desfechos gestacionais adversos entre os diferentes níveis de aumento dos títulos (p=0,23).

Tabela 9 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o aumento dos títulos maternos de anticorpo anti-D ao longo da gestação, em 14 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal – HCFMUSP – 2006 a 2014

AUMENTO DOS TÍTULOS	TOTAL n (%)	DESFECHO ADVERSO n (%)	
		Presente	Ausente
2 títulos	7 (50,0)	4 (57,1)	3 (42,9)
3 títulos	2 (14,3)	0	2 (100)
4 títulos	3 (21,4)	0	3 (100)
≥ 5 títulos	2 (14,3)	1 (50,0)	1 (50,0)

P=0,23

Foi avaliado o comportamento dos títulos de anticorpos no grupo de 32 gestantes com títulos iniciais baixo ou moderado (anti-D<128) em relação à ocorrência ou não de desfechos gestacionais adversos. Em 4 (12,5%, 4/32) casos apenas uma titulação foi mensurada. Não houve diferença significativa entre os diferentes comportamentos neste grupo (p=0,57, tabela 10).

Tabela 10 - Ocorrência de desfecho gestacional adverso (necessidade de transfusão intrauterina ou óbito fetal) de acordo com o comportamento dos títulos maternos de anticorpo anti-D ao longo da gestação, em 32 gestantes com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal com títulos iniciais anti-D < 128 – HCFMUSP – 2006 a 2014

COMPORTAMENTO DOS TÍTULOS	TOTAL n (%)	DESFECHO ADVERSO n (%)		p
		Presente	Ausente	
Título único	4 (12,5)	4 (100)	0	
≥ 2 títulos				
Ascensão	12 (37,5)	3 (25,0)	9 (75,0)	0,57
Estabilização	13 (40,6)	2 (15,4)	11 (84,6)	
Declínio	3 (9,4)	0 (0)	3 (100)	

5.6.3 Associação com anticorpos atípicos

A correlação entre a presença de associação do anticorpo anti-D com outros anticorpos antieritrocitários e a ocorrência de desfechos gestacionais adversos é avaliada na Tabela 11. Não houve diferença significativa entre as gestações que apresentaram ou não associação de anticorpos em relação à necessidade de TIU ou ocorrência de OF (p=0,18).

Tabela 11 - Correlação entre associação de anti-D com outros anticorpos irregulares e a ocorrência de desfechos gestacionais adversos nas 58 gestações com antecedente moderado ou grave de doença hemolítica perinatal - HCFMUSP - 2006 a 2014

ASSOCIAÇÃO COM ANTICORPOS ATÍPICOS	TOTAL n (%)	DESFECHO ADVERSO n (%)	
		Presente	Ausente
Sim	35 (60,4)	20 (34,5)	15 (25,9)
Não	23 (39,6)	9 (15,5)	14 (24,1)

P=0,18

6 DISCUSSÃO

A doença hemolítica perinatal pelo anticorpo anti-D vem se tornando condição de apresentação cada vez mais rara em nosso meio, dada a ampla aderência ao programa de profilaxia com a imunoglobulina anti-D. Contudo, atenção especial deve ser dada a essa patologia que, uma vez presente, requer vigilância rigorosa por especialistas da área de medicina fetal e cujo tratamento durante a gestação é invasivo, com relevantes riscos associados ao procedimento, porém com alto índice de sucesso mesmo nas formas graves da doença.

A consagração da avaliação do pico de velocidade sistólica da ACM para a predição de anemia fetal moderada ou grave, desenvolvida por Mari et al. [34] em 2000, transformou o manejo da doença ao introduzir um método não invasivo eficaz para o seguimento das gestantes aloimunizadas, com sensibilidade de 100%, taxa de falso positivo de 12% e valores preditivos positivo e negativo de 65% e 100%, respectivamente.

No caso de gestantes sem antecedente obstétrico de aloimunização, é bem estabelecida a correlação entre a titulação de anticorpos e o grau de anemia fetal. Neste sentido, o resgate da discussão sobre o nível crítico de anti-D a partir do qual a gestante deve ser encaminhada a um centro de referência tem como objetivo apurar a triagem das gestações com alto risco de anemia e não negligenciar casos potencialmente graves [31].

Contudo, poucos estudos aprofundaram esta discussão na população de pacientes com acometimento pela DHPN em gestações anteriores.

Acerca desta lacuna na literatura, suscitou-se questionamentos quanto a validade da quantificação dos anticorpos anti-D maternos no manejo pré-natal destas gestantes. Considerando este aspecto, o presente estudo teve como objetivo colaborar no aprimoramento da predição de anemia fetal nas gestações consideradas de alto risco pelo histórico de DHPN e, como consequência, contribuir com novos elementos para o preenchimento deste hiato nos estudos sobre a doença.

A classificação de gravidade da DHPN de acordo com o grau de acometimento do concepto em gestações anteriores tem papel fundamental na estratificação do risco de anemia e na determinação de condutas na gestação atual. Em vista desta classificação, a seleção de gestações com antecedente moderado ou grave de aloimunização como a população do estudo, com exclusão daquelas com histórico leve, baseou-se na confiabilidade de que o acometimento prévio fosse produto da DHPN. A fototerapia em recém-nascido a termo, que caracteriza a doença leve, é também forma de tratamento para diversas outras condições que acarretam em hiperbilirrubinemia neonatal, tais como a sepse, aleitamento materno, incompatibilidade ABO, entre outros [58]. Sendo assim, com o propósito de distinguir os casos de fato acometidos pela doença aloimune previamente, optou-se pela avaliação da correlação proposta pelo estudo exclusivamente na população com história moderada ou grave.

Dado o fato de que a DHPN é caracterizada pelo acometimento progressivo a cada gestação subsequente afetada [37] e que a população estudada já apresentou ao menos uma gestação acometida pela doença em

sua forma moderada ou grave, a alta média da idade materna (33,0 ± 5,0 anos), assim como a da paridade (4,8 ± 2,0 gestações), são previstas nesta amostra de pacientes.

Considerando ainda aspectos relativos ao primeiro atendimento no serviço, a média da idade gestacional na admissão de 17,9 ± 7,6 semanas (mediana de 15,3 semanas) reflete bom resultado do esforço da rede de assistência primária para o encaminhamento precoce destas gestantes de alto risco a centros de referência para a doença. Além disso, muitos casos com admissão em idade gestacional bastante precoce são de pacientes acompanhadas pela equipe de nossa Instituição em gestações anteriores, que são orientadas a procurar diretamente o serviço no caso de diagnóstico de nova gestação.

É visto também de maneira otimista o fato de 60,3% (35/58) dos casos serem admitidos até a 20ª semana de gestação, uma vez que a vigilância do pico de velocidade sistólica da ACM inicia-se em torno de 16-18 semanas. Nesta fase da gestação, o sistema retículo-endotelial fetal completa seu amadurecimento, tornando-se capaz de dar início ao processo de hemólise imunomediada característico da DHPN [47].

A fim de avaliarmos as variáveis relacionadas às TIUs, utilizamos o estudo LOTUS [59] como base comparativa de dados. O estudo LOTUS (*LOng-Term follow-up after intra-Uterine transfusionS*) avalia 451 fetos submetidos a 1284 TIUs, em um período de 10 anos, em centro de referência para DHPN na Holanda. O objetivo deste estudo é determinar a incidência e os fatores de risco associados ao comprometimento do

desenvolvimento neurológico a longo prazo em crianças acometidas pela doença que necessitaram de TIUs.

No período do nosso estudo, 28 fetos de gestantes com história moderada ou grave de DHPN foram submetidos a 97 TIUs. Não houve diferença significativa entre dados da nossa casuística e do estudo LOTUS referentes a idade gestacional, em semanas, da realização do primeiro procedimento (25,1 ± 5,3 *vs* 26,0 ± 4,2, p=0,291) e do valor absoluto de hemoglobina, em g/dL, obtido nesta ocasião (6,3 ± 2,0 *vs* 5,5 ± 2,4, p=0,099).

Houve, contudo, diferença estatisticamente significativa entre o número de TIUs por feto, sendo este de 3,5 ± 2,1 em nossa casuística e de 3,0 ± 1,1 no LOTUS (p=0,039). Dado que o estudo holandês demonstra haver relação entre o número de procedimentos por feto e o comprometimento do desenvolvimento neurológico a longo prazo, faz-se necessário ponderar a razão desta diferença. A principal hipótese é de que o intervalo entre as TIUs em nosso estudo tenha sido menor em comparação ao LOTUS, uma vez que a média da idade gestacional do parto em nosso estudo é cerca de 2 semanas menor que a do estudo LOTUS (34,1 *vs* 36 semanas, respectivamente).

Nishie et al. [60], em 2012, abordam esta questão ao avaliar os fatores envolvidos na predição da taxa de queda de hemoglobina fetal entre a primeira e a segunda TIUs, na Clínica Obstétrica do HCFMUSP, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010. Os autores concluem que esta taxa depende da concentração de hemoglobina ao final da primeira TIU, do

intervalo entre os dois procedimentos e do pico de velocidade sistólica da ACM obtido previamente à segunda TIU. A partir destes achados foi desenvolvido um modelo matemático para predição do declínio de hemoglobina nestes fetos, que vem sendo utilizado pelo serviço desde então. Como o período de avaliação do presente estudo (2006 a 2014) contemplou considerável número de anos em que esta fórmula ainda não era utilizada, existe a possibilidade de que a média de procedimentos por feto seja, de fato, menor após 2012.

Nos dois anos que se seguiram ao estudo de Nishie et al. [60] analisados em nossa casuística, apenas 2 gestantes com antecedente moderado ou grave de aloimunização foram submetidas a TIUs, sendo necessária a realização de 1 e 2 procedimentos em cada gestação, respectivamente. Este pequeno número de casos reflete o fato de a doença aloimune estar se tornando cada vez mais rara, o que dificulta a estruturação de estudos prospectivos e com poder amostral, que não sejam colaborativos, nesta população de pacientes. Sendo assim, nova auditoria contemplando um intervalo de tempo maior seria importante para a avaliação do impacto da utilização deste modelo matemático em nosso serviço.

O óbito fetal ocorreu em 7 (12,1%, 7/58) casos, com média da idade gestacional do diagnóstico de 24,9 ± 4,3 semanas. Seis casos (85,7%, 6/7) foram submetidos a TIUs durante a gestação, sendo que em 2 (28,6%, 2/7) deles o óbito ocorreu imediatamente após o procedimento. Dentre estas 6 gestações submetidas a TIUs, todas apresentaram titulação de anti-D inicial

alta (128 - 2048) e estavam em associação com 1 ou mais anticorpos hemolíticos (Anti-C, anti-Dia, anti-E, anti-Jka). A avaliação seriada dos títulos ao longo destas gestações não mostrou um padrão de comportamento único, o que não permitiu associar a ocorrência deste desfecho à uma determinada tendência.

Todos os casos de OF submetidos a TIU apresentaram níveis de hemoglobina imediatamente antes do primeiro procedimento consistentes com diagnóstico de anemia moderada ou grave (-3,2 a -9,9 DP), demonstrando que nenhum caso foi submetido ao procedimento invasivo desnecessariamente.

É válido ainda pormenorizar os dados referentes ao único caso (14,3%, 1/7) de óbito fetal que não foi submetido a TIU. Trata-se da 16ª gestação de uma paciente com histórico grave de DHPN e antecedente obstétrico de 10 abortamentos. A admissão no serviço ocorreu em idade gestacional precoce (12,2 semanas), com titulação de anticorpos anti-D inicial moderada (anti-D: 64), que se manteve estável na segunda (e última) aferição de títulos. Havia associação com outros anticorpos hemolíticos, em títulos baixos (Anti-C <01 e Alo IgG indeterminada 1+). O óbito ocorreu com 21 semanas de gestação, sem a presença de quaisquer sinais ultrassonográfico ou dopplervelocimétrico sugestivos de anemia fetal nas avaliações que antecederam o desfecho. Sendo assim, é possível considerar que a etiologia do óbito pode estar associada a outras patologias que levem ao óbito fetal precoce, dados os achados prévios ao evento e o antecedente obstétrico materno de abortamento de repetição. Contudo,

mesmo sem um nexo de associação evidente entre a perda fetal e a doença aloimune materna, optou-se pela inclusão desta gestação no grupo de desfechos gestacionais desfavoráveis, no desenho do presente estudo.

A análise dos resultados referentes à titulação de anticorpos demonstrou haver diferença estatística significativa entre as diferentes faixas de títulos de anticorpos iniciais (baixo, moderado e alto) em relação à ocorrência dos desfechos gestacionais avaliados ($p<0,001$). Evidenciou-se que gestantes com antecedente obstétrico de DHPN com altos títulos de anticorpos anti-D (≥ 128) em sua primeira avaliação apresentaram chance 3,33 vezes maior de serem submetidas a TIU ou de evoluir com a ocorrência do óbito fetal em relação àquelas com títulos iniciais baixos. Não houve aumento ou redução na chance de ocorrência destes desfechos adversos para as gestantes que apresentaram títulos de anticorpos anti-D iniciais classificados como moderados.

Observou-se ainda que, dentro da faixa de titulação alta, o melhor título crítico de anticorpo inicial para a predição da necessidade de TIU ou de OF, ou seja, de anemia fetal moderada ou grave, é a titulação de 128, conforme demonstrado pela curva *ROC* (Figura 9), com área sob a curva de 0,78 (IC 95%: 0,66 – 0,90). Este título crítico de anti-D apresenta sensibilidade de 69,0% (20/29) e especificidade de 79,3% (23/29), com VPP de 76,9% (20/26) e VPN de 71,9% (23/32). Os bons resultados de especificidade e VPP para predição dos desfechos avaliados apresentam relevância para o seguimento pré-natal nesta população de alto risco, uma vez que conferem a este nível crítico de anticorpos uma melhor capacidade

de triagem dos casos com verdadeiro potencial de desenvolvimento da doença na gestação atual.

A acurácia obtida para este nível crítico de anticorpos anti-D (74,0%; 43/58) é semelhante à encontrada por Bowman e Pollock [25], em estudo analisando a predição de anemia fetal de acordo com o conjunto de história obstétrica de aloimunização e títulos de anticorpos anti-D, em que os autores encontram uma acurácia de 62%.

Esta questão também é discutida por Lobato e Soncini [39], em estudo que avalia a relação entre o antecedente obstétrico de DHPN e o grau de acometimento pela doença na gestação índice. Neste estudo, 82 gestações submetidas a TIUs foram divididas em dois grupos, de acordo com a ocorrência ou não de eventos associados à DHPN em gestações anteriores. A idade gestacional na primeira TIU foi utilizada como marcador de gravidade da doença. Em análise multivariada da associação entre os títulos maternos de anticorpos anti-D iniciais e a idade gestacional da primeira TIU na população com antecedente de DHPN, foi obtido valor muito próximo de apresentar significância estatística (p=0,068). Os autores discutem a relevância deste resultado, concluindo que os títulos maternos de anticorpos devem ser considerados no manejo destas gestações até a realização da primeira TIU.

Quanto ao comportamento dos títulos de anticorpos anti-D ao longo da gestação, o presente estudo avaliou que, tanto para o total da população analisada (n=58) quanto para o grupo de gestantes com títulos anti-D < 128 (n=32), não houve diferença significativa entre as diferentes tendências de

comportamento quanto à presença destes desfechos (p=0,48 e p=0,57, respectivamente). Além disso, a análise do subgrupo de gestações com títulos ascendentes (n=14) também não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o número de titulações ascendentes em relação à necessidade de TIU ou ao OF (p=0,23).

Pode-se creditar esses achados ao tamanho reduzido da amostra em cada estrato de comportamento (ascensão, n=14; estabilização, n=30; declínio, n=5), o que não permite concluir de maneira definitiva quanto à ausência de diferença estatística destas correlações. Contudo, esses resultados corroboram a opinião de especialistas na doença [37, 56] e recomendação de diretrizes de importantes Instituições, como a *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) [32] e o *British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force* [33], de que a utilização de avaliação seriada de títulos de anticorpos é inadequada para vigilância da anemia fetal na população de gestantes acometidas pela DHPN em gestações anteriores.

Paralelamente, faz-se necessário interpretar a ocorrência dos desfechos estudados em todas as gestantes com titulação única coletada (n=9). Esse achado se deve ao fato de que estes casos foram referenciados ao serviço em estado mais avançado da doença e, no momento do primeiro atendimento, o pico de velocidade sistólica da ACM foi indicativo de TIU. Deste grupo, o título inicial de anti-D foi considerado moderado em 4 (44,4%, 4/9) casos e alto em 5 (55,6%, 5/9) casos. Devido ao alto risco de hemorragia materno-fetal durante o procedimento e ao potencial estímulo à

produção de anticorpos maternos em decorrência disto [61, 62], a titulação de anticorpos é dispensada após a realização da primeira TIU. Sendo assim, apenas uma amostra de títulos foi coletada neste grupo de pacientes.

Outro aspecto relevante a ser discutido é a associação de anti-D com outros anticorpos de superfície antieritrocitário. No presente estudo, essa associação ocorreu em 35 (60,3%, 35/58) casos sendo que, dentre estes, a combinação mais frequente foi com o anti-C, em 54,3% (19/35). Markham et al. [58], em estudo retrospectivo envolvendo 1014 gestações aloimunizadas, em um período de 13 anos, comparam a propensão de desenvolvimento de DHPN significativa em gestantes com e sem associação de anticorpos. Doença significativa é definida pelo estudo como gestação em que ocorreu óbito intrauterino, hidropsia fetal, necessidade de TIU, hemoglobina de cordão ≤ 10g/dL ao nascimento ou necessidade de transfusão sanguínea no período neonatal.

Os autores constatam a presença de um ou mais anticorpos em 132 (13,0%, 132/1014) casos sendo que, dentre estes, o anti-D está presente em 54 casos. O anticorpo mais comumente encontrado em combinação com o anti-D é o anti-C (33/54), assim como na presente casuística. Além disso, o estudo evidencia que 21,7% (30/138) das gestações com anti-D isolado desenvolveram DHPN significativa enquanto que esta ocorreu em 50,0% (27/54) das gestantes que o apresentavam em combinação com outros anticorpos (OR, 3,65; IC95%, 1,84 - 7,33; p=0,0002).

Este achado diverge dos resultados encontrados no presente estudo. Para a população estudada, não houve diferença significativa para

ocorrência de desfechos gestacionais adversos entre as gestações que apresentavam o anti-D como anticorpo único e aquelas que o apresentavam em combinação com outros anticorpos (p=0,18). Essa discrepância provavelmente ocorreu devido, primeiramente, ao tamanho relativamente pequeno da amostra avaliada em nosso estudo quando comparada à de 1014 casos do estudo de Markham et al. [58]. Além disso, a população de gestantes do presente estudo apresenta história de DHPN pelo anti-D em gestações anteriores, questão não abordada pelo outro estudo. Finalmente, a utilização de técnicas para descartar o anti-G como anticorpo que mimetiza a combinação de anti-D com anti-C é sistemática no estudo norte-americano, enquanto que esta prática não foi realizada rotineiramente em nosso serviço. Isto pode ter superestimado o número real de gestações que apresentavam esta associação, quando verdadeiramente se tratava de anti-G, cujo risco para o desenvolvimento de anemia fetal é consideravelmente menor [3].

Considerando estas análises dos resultados, conclui-se que a avaliação isolada da titulação inicial de anticorpos anti-D não apresenta capacidade de predição de anemia fetal tão eficaz quanto a análise do pico de velocidade sistólica da ACM, devendo ser utilizada como ferramenta adjuvante na triagem inicial de gestações com história moderada ou grave de DHPN. Sendo assim, casos com antecedente de gravidade e títulos anti-D de chegada ≥ 128 podem ser monitorados com intervalo de tempo menor, dado o aumento nas chances de desenvolvimento de anemia moderada ou grave nestes fetos.

O presente estudo apresenta certas limitações. Uma delas se baseia na dificuldade da coleta de dados inerentes a um estudo retrospectivo em que, por vezes, os elementos objetos da pesquisa não constam nas informações registradas, especialmente nos casos seguidos há mais tempo. Atrelado a isto está a dificuldade na obtenção de dados de parto e do período pós-natal daquelas gestantes que não tiveram o parto realizado em nosso serviço. Em 7 (7,9%, 7/89) casos essas informações não foram coletadas devido ao insucesso do contato telefônico e, portanto, não puderam ser incluídos na análise.

Considerando ainda os aspectos técnicos, é válido pontuar particularidades relacionadas ao método de quantificação de anticorpos utilizado pelo estudo. A titulação de anticorpos por técnicas manuais de aglutinação é procedimento operador-dependente e sua reprodutibilidade pode assim apresentar variações, a depender da experiência e interpretação do operador [63]. Apesar de a titulação de anticorpos não ter sido realizada por um único operador em nossa casuística, com objetivo de reduzir o impacto de possíveis variações de leitura, o diagnóstico de mudança de título foi considerado quando havia aumento ou declínio de 2 ou mais diluições. A quantificação de anti-D por técnica de análise automática contínua, por sua vez, superaria esta questão, conferindo maior reprodutibilidade aos resultados. Contudo, este método ainda não é disponível em nossa Instituição.

Outro aspecto a ser considerado refere-se ao protocolo de seguimento das gestantes aloimunizadas em nosso serviço. Até o presente

momento, a pesquisa de Rh fetal no sangue materno não é disponibilizada de rotina. As gestantes são esclarecidas quanto à existência do exame e aos locais de realização, caso haja interesse e disponibilidade financeira. Em vista disso, o rigoroso acompanhamento necessário para casos de alto risco de anemia fetal é realizado em gestantes sensibilizadas cujos fetos são Rh negativo, o que seria dispensável caso tal exame fosse oferecido de rotina. Contudo, esse impeditivo vem sendo rediscutido frente ao cenário atual do manejo da doença. Estudo realizado por equipe multidisciplinar da Fundação Pró-sangue/Hemocentro de São Paulo e da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, envolvendo 220 gestantes Rh negativo, visando padronizar e validar metodologia de genotipagem fetal em soro materno, apresentou alta acurácia em seus resultados e boa reprodutibilidade [64]. Com isto, a implementação da técnica em nosso serviço torna-se possibilidade concreta, fato que irá preencher esta lacuna do atual protocolo de atendimento.

Do total de 89 gestações com antecedente moderado ou grave de DHPN avaliadas no período do estudo, 12 (13,4%) não foram incluídas na análise pelo fato de os recém-nascidos terem sido diagnosticados como sendo Rh negativo. Em nenhum destes casos foi realizado TIU, refletindo o manejo adequado destas gestações.

Paralelamente, o comportamento dos títulos de anticorpos anti-D nestas gestações intrigou os autores do estudo. Dentre estas 12 gestações, os títulos de anticorpos foram considerados baixos em 3 (25%, 3/12) casos, moderados em 5 (41,7%, 5/12) e altos em 4 (33,3%, 4/12) casos. Em relação à tendência de comportamento durante a gestação, em 7 (58,3%,

7/12) casos houve ascensão dos títulos, enquanto que 5 (41,7%, 5/12) casos permaneceram estáveis e em nenhuma gestação ocorreu declínio dos anticorpos.

Considerando a heterogeneidade constatada na quantificação e no comportamento dos títulos de anti-D nas gestações supracitadas, interessa ao estudo uma breve discussão sobre os mecanismos de persistência dos anticorpos, assunto ainda pouco abordado pela literatura. Verduin et al. [65] avaliam os fatores associados à persistência de anticorpos antieritrocitários em mulheres após gestações em que foram realizadas TIUs. O grupo realizou acompanhamento a longo prazo de 260 gestantes submetidas ao procedimento, no período entre 1988 a 2008. Foi avaliada a presença de anticorpos, associados ou não à DHPN, durante a gestação e em um período médio de 8,7 anos após o parto.

Constatou-se que a especificidade e a força de um anticorpo, determinada pela titulação, apresentam uma forte correlação com a persistência deste ao longo dos anos. Os autores exemplificam estes aspectos com a observação de que os antígenos eritrocitários dos sistemas Rh e Kell, considerados imunógenos fortes, mantiveram-se detectáveis em todos os casos no período de seguimento do estudo, assim como aqueles que apresentavam títulos altos durante a gestação.

Além destes aspectos, a estimulação antigênica necessária para a manutenção da memória imunológica, com a produção de imunoglobulinas IgG de longa vida, também deve ser considerada. Neste sentido, com o avançar da paridade da mulher Rh negativo sensibilizada, ocorrem impulsos

de produção materna de anticorpos pela presença de hemácias fetais Rh positivo em sua circulação sanguínea. Os recorrentes estímulos antigênicos sustentam a persistência dos anticorpos a eles dirigidos ao longo do tempo, levando a respostas imunes cada vez mais rápidas e, consequentemente, afetando o feto mais precocemente a cada gestação subsequente.

Os autores sugerem ainda que uma longa persistência de anticorpos maternos pode estar ligada à produção de células quiméricas, capazes de se diferenciar e expressar antígenos cognatos àqueles expressos pelas hemácias do feto, proporcionando uma manutenção do estímulo antigênico mesmo na ausência das células fetais. Isto poderia explicar, por exemplo, o fato de algumas gestantes, mesmo portando fetos Rh negativo, terem apresentado ascensão dos títulos de anticorpos na presente casuística.

Considerando os aspectos imuno-hematológicos discutidos, os achados do presente estudo e a escassez de literatura focada para esta temática, conclui-se que a avaliação dos títulos de anticorpos anti-D no seguimento das gestações com antecedente moderado ou grave de DHPN é assunto complexo e rico em possibilidades para novas abordagens. Apesar desta população de gestantes vir se tornando cada vez menor, mesmo em centros terciários como o de nossa Instituição, estes casos exigem manejo assistencial altamente especializado e com experiência acumulada para otimização dos resultados destas gestações.

A experiência clínica diária no manejo pré-natal desta população tão específica de gestantes e a alta complexidade envolvida neste processo nos impulsionaram a aprofundar neste tema, objetivando o aperfeiçoamento

deste acompanhamento. Nosso estudo contribuiu de maneira contundente ao apresentar dados consistentes e com casuística relevante. A expectativa é que se desperte maior interesse e atenção para esta condição e que novos estudos sejam motivados a partir do nosso para a elucidação das questões que esse assunto ainda suscita.

7 CONCLUSÃO

Gestantes com antecedente de doença hemolítica perinatal moderada ou grave, e títulos de anticorpos anti-D iniciais maiores ou iguais a 128, apresentam chance aumentada de 3,3 vezes de necessidade de realização de transfusão intrauterina ou ocorrência de óbito fetal, durante o acompanhamento pré-natal. A associação de anticorpos anti-D com outros anticorpos antieritrocitários não apresentou correlação com os desfechos estudados.

8 ANEXOS

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

CIAPP nº 343/12

PROJETO DE PESQUISA

Título: PREDIÇÃO DO DESFECHO PERINATAL DE ACORDO COM OS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI-D EM GESTANTES ALOIMUNIZADAS.
Pesquisador Responsável: Adolfo Wenjaw Liao **Versão: 2**
Pesquisador Executante: Marcela Vieira Xavier **CAAE:** 06986512.2.0000.0068
Co-autores: Karen Nogueira Chinoca, Maria de Lourdes Brizot, Rossana Pulcineli Vieira Francisco, Marcelo Zugaib
Finalidade Acadêmica Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9309

Número do Parecer: 193.991

Data da Relatoria: 06/02/2013

Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo retrospectivo que objetiva avaliar os desfechos perinatais de acordo com os títulos de anticorpos anti-D em gestantes com história de aloimunização em gestações anteriores. A aloimunização materna pelo fator Rh é patologia obstétrica de gravidade, pois a produção de anticorpos anti-D pelo organismo materno pode ultrapassar a barreira placentária e provocar anemia no feto Rh D positivo, causando a doença hemolítica perinatal. A hipótese a ser testada é que existe correlação entre os títulos maternos de anticorpos anti-D e a presença de desfechos perinatais adversos em gestações com história obstétrica prévia de doença hemolítica perinatal. Os pesquisadores propõem estudo retrospectivo com base em levantamento de prontuários de gestantes atendidas na instituição no período de 2006 a 2012 (270 casos), os critérios de inclusão são apresentados, os casos serão estratificados de acordo com a titulação observada de anti-D, e os desfechos a serem analisados são bem definidos.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a correlação entre o perfil imunohematológico e os desfechos perinatais em gestantes com história prévia de doença hemolítica perinatal.

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos referem-se apenas ao acesso a dados de prontuários. Os benefícios referem-se à possibilidade de avaliar e propor melhorias no seguimento e assistência pré-natal de gestantes com aloimunização Rh.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Em atendimento ao parecer inicial, os pesquisadores esclareceram o período a ser estudado, foi apresentado o orçamento da pesquisa e a confidencialidade dos dados foi garantida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os pesquisadores solicitam dispensa do TCLE por se tratar de estudo retrospectivo com consulta de prontuários. A dispensa do termo de consentimento está justificada.

Recomendações: Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Projeto aprovado.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o ítem IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)**apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 06 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

9 REFERÊNCIAS

1. Baiochi E, Nardozza LM. [Alloimmunization]. Rev Bras Ginecol Obstet. 2009;31(6):311-9.

2. Chown B. Anaemia from bleeding of the fetus into the mother's circulation. Lancet. 1954;266(6824):1213-5.

3. Klein HG, Mollison PL, Anstee DJ, Mollison PLBticm. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. 11th ed. Oxford: Blackwell; 2005.

4. Cianciarullo MA, Ceccon ME, Vaz F. [Prevalence of immunohematologic tests at birth and the incidence of hemolytic disease in the newborn]. Rev Assoc Med Bras. 2003;49(1):45-53.

5. Walsh CA, Russell N, McAuliffe FM, Higgins S, Mahony R, Carroll S, et al. Relationship between maternal antibody type and antenatal course following intrauterine transfusion for red cell alloimmunisation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;171(2):235-9.

6. Bowman JM. The management of Rh-Isoimmunization. Obstet Gynecol. 1978;52(1):1-16.

7. Wallerstein H. Treatment of Severe erythroblastosis by simultaneous removal and replacement of the blood of the newborn infant. Science. 1946;103(2680):583-4.

8. Liley AW. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. Br Med J. 1963;2(5365):1107-9.

9. Rodeck CH, Kemp JR, Holman CA, Whitmore DN, Karnicki J, Austin MA. Direct intravascular fetal blood transfusion by fetoscopy in severe Rhesus isoimmunisation. Lancet. 1981;1(8221):625-7.

10. Van Kamp IL, Klumper FJ, Oepkes D, Meerman RH, Scherjon SA, Vandenbussche FP, et al. Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Am J Obstet Gynecol. 2005;192(1):171-7.

11. Freda VJ, Gorman JG, Pollack W, Bowe E. Prevention of Rh hemolytic disease--ten years' clinical experience with Rh immune globulin. N Engl J Med. 1975;292(19):1014-6.

12. Crowther CA, Middleton P, McBain RD. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. Cochrane Database Syst Rev. 2013;2:CD000020.

13. Chávez GF, Mulinare J, Edmonds LD. Epidemiology of Rh hemolytic disease of the newborn in the United States. JAMA. 1991;265(24):3270-4.

14. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. Vox Sang. 2004;87(4):225-32.

15. Zipursky A, Paul VK. The global burden of Rh disease. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2011;96(2):F84-5.

16. Osanan GC, Silveira Reis ZN, Apocalypse IG, Lopes AP, Pereira AK, da Silva Ribeiro OM, et al. Predictive factors of perinatal mortality in transfused fetuses due to maternal alloimmunization: what really matters? J Matern Fetal Neonatal Med. 2012;25(8):1333-7.

17. Lobato G, Reichenheim ME, Coeli CM. [The Hospital Information System of the Brazilian National Unified Health System: a preliminary evaluation of performance in monitoring RhD hemolytic disease of the newborn]. Cad Saude Publica. 2008;24(3):606-14.

18. Nardozza LM, Camano L, Moron AF, Chinen PA, Torloni MR, Cordioli E, et al. Perinatal mortality in Rh alloimmunized patients. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007;132(2):159-62.

19. Bowman J. The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. Semin Perinatol. 1997;21(1):39-44.

20. Haugen G, Husby H, Helbig AE, Schmidt-Melbye AC. Ultrasonographic monitoring of pregnancies complicated by red blood cell alloimmunization in a cohort with mild to moderate risk according to previous obstetric outcome. Acta Obstet Gynecol Scand. 2002;81(3):227-33.

21. Moise KJ. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. Obstet Gynecol. 2002;100(3):600-11.

22. Faas BH, de Ligt J, Janssen I, Eggink AJ, Wijnberger LD, van Vugt JM, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. Expert Opin Biol Ther. 2012;12 Suppl 1:S19-26.

23. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Métral S, Le Van Kim C, et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. Mol Diagn. 2004;8(1):23-31.

24. Freda VJ. The Rh problem in obstetrics and a new concept of its management using amniocentesis and spectrophotometric scanning of amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol. 1965;92:341-74.

25. Bowman JM, Pollock JM. Amniotic fluid spectrophotometry and early delivery in the management of erythroblastosis fetalis. Pediatrics. 1965;35: 815-35.

26. Jorgensen J, Rebbe H. Prognostic value of quantitative determination of rhesus antibody (anti-D) in maternal serum and amniotic fluid. Acta Obstet Gynecol Scand. 1971;50(1):73-7.

27. Bowell P, Wainscoat JS, Peto TE, Gunson HH. Maternal anti-D concentrations and outcome in rhesus haemolytic disease of the newborn. Br Med J (Clin Res Ed). 1982;285(6338):327-9.

28. Nicolaides KH, Rodeck CH. Maternal serum anti-D antibody concentration and assessment of rhesus isoimmunisation. BMJ. 1992;304 (6835):1155-6.

29. Moise KJ, Perkins JT, Sosler SD, Brown SJ, Saade G, Carpenter RJ, et al. The predictive value of maternal serum testing for detection of fetal anemia in red blood cell alloimmunization. Am J Obstet Gynecol. 1995; 172(3):1003-9.

30. Gottvall T, Hildén JO. Concentration of anti-D antibodies in Rh(D) alloimmunized pregnant women, as a predictor of anemia and/or hyperbilirubinemia in their newborn infants. Acta Obstet Gynecol Scand. 1997;76(8):733-8.

31. Walsh CA, Doyle B, Quigley J, McAuliffe FM, Fitzgerald J, Mahony R, et al. Reassessing the critical maternal antibody threshold in Rh(D) alloimmunisation: a 16-year retrospective cohort study. Ultrasound Obstet Gynecol. 2014;44(6):669-73.

32. Gynecologists ACoOa. ACOG Practice Bulletin No. 75: Management of alloimmunization during pregnancy. Obstet Gynecol. 2006;108(2):457-64.

33. Gooch A, Parker J, Wray J, Qureshi H, Force BCfSiHBTT. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. Transfus Med. 2007;17(4):252-62.

34. Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ, et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. N Engl J Med. 2000; 342(1):9-14.

35. Iskaros J, Kingdom J, Morrison JJ, Rodeck C. Prospective non-invasive monitoring of pregnancies complicated by red cell alloimmunization. Ultrasound Obstet Gynecol. 1998;11(6):432-7.

36. Nicolaides KH. Management of red blood cell isoimmunized pregnancies. In: Kurjak A, Chervenak FA. Texbook of Perinatal Medicine. London: Informa UK; 1998. p.1135-1142.

37. Moise KJ, Argoti PS. Management and prevention of red cell alloimmunization in pregnancy: a systematic review. Obstet Gynecol. 2012; 120(5):1132-9.

38. Jacobs WM. Fetal survival rates in Rh-immunized gravidas: correlation of antibody titers and past obstetric history. Obstet Gynecol. 1962;19:806-7.

39. Lobato G, Soncini CS. Relationship between obstetric history and Rh(D) alloimmunization severity. Arch Gynecol Obstet. 2008;277(3):245-8.

40. Diamond L, Blackfan D, Baty J. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. J Pediatr. 1932;1(3):269-309.

41. Wirthner D, Hohlfeld P, Tissot JD. [Perinatal hemolytic disease. Part 1: physiopathology]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 1998;27(2):135-43.

42. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol Med. 1940;43:223

43. Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: Its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis. JAMA. 1941;116(9):825-7.

44. Jacobs WM. The future outlook for Rh-negative mothers based on past history. Obstet Gynecol. 1959;14(1):96-8.

45. Liley AW. Liquor amnil analysis in the management of the pregnancy complicated by resus sensitization. Am J Obstet Gynecol. 1961;82:1359-70.

46. Walker W, Murray S, Russell JK. Stillbirth due to haemolytic disease of the newborn. J Obstet Gynaecol Br Emp. 1957;64(4):573-81.

47. Scheier M, Hernandez-Andrade E, Carmo A, Dezerega V, Nicolaides KH. Prediction of fetal anemia in rhesus disease by measurement of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity. Ultrasound Obstet Gynecol. 2004;23(5):432-6.

48. Harmening DM. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 4ª ed. Rio de Janeiro; Revinter; 2006. p. 436

49. Laboratory procedures for the prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. Vox Sang. 1995;69(1):61-9.

50. Marsh WL, Nichols M, Jenkins WJ. Automated detection of blood group antibodies. J Med Lab Technol. 1968;25(4):335-42.

51. Bruce DG, Tinegate HN, Williams M, Babb R, Wells AW. Antenatal monitoring of anti-D and anti-C: could titre scores determined by column agglutination technology replace continuous flow analyser quantification? Transfus Med. 2013;23(1):36-41.

52. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion. 1990;30(2):109-13.

53. Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, Bonifácio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti-D titration. Clin Lab Haematol. 2003;25(5):311-5.

54. Duez A, Flourié F, Garraud O. Antibodies titration for immunized pregnant women: conventional tube test or gel microcolumn assay. Transfusion. 2014;54(4):1200.

55. Nicolaides KH, Soothill PW, Clewell WH, Rodeck CH, Mibashan RS, Campbell S. Fetal haemoglobin measurement in the assessment of red cell isoimmunisation. Lancet. 1988;1(8594):1073-5.

56. Harrington K, Fayyad A. Prediction of fetal anaemia. Curr Opin Obstet Gynecol. 2002;14(2):177-85.

57. Coombs RR, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Br J Exp Pathol. 1945;26:255-66.

58. Markham KB, Rossi KQ, Nagaraja HN, O'Shaughnessy RW. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to multiple maternal antibodies. Am J Obstet Gynecol. 2015;213(1):68.E1-5..

59. Lindenburg IT, Smits-Wintjens VE, van Klink JM, Verduin E, van Kamp IL, Walther FJ, et al. Long-term neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for hemolytic disease of the fetus/newborn: the LOTUS study. Am J Obstet Gynecol. 2012;206(2):141.e1-8.

60. Nishie EN, Liao AW, Brizot MeL, Assunção RA, Zugaib M. Prediction of the rate of decline in fetal hemoglobin levels between first and second transfusions in red cell alloimmune disease. Prenat Diagn. 2012;32(12):1123-6.

61. Bowman JM, Pollock JM, Peterson LE, Harman CR, Manning FA, Menticoglou SM. Fetomaternal hemorrhage following funipuncture: increase in severity of maternal red-cell alloimmunization. Obstet Gynecol. 1994; 84(5):839-43.

62. Bowell PJ, Selinger M, Ferguson J, Giles J, MacKenzie IZ. Antenatal fetal blood sampling for the management of alloimmunized pregnancies: effect upon maternal anti-D potency levels. Br J Obstet Gynaecol. 1988; 95(8):759-64.

63. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ, Collaborative BEfST, Pathologists TMRCotCoA. Reducing the variation in performance of antibody titrations. Arch Pathol Lab Med. 2008;132(7):1194-201.

64. Levi J, Chinoca K, Liao A, Dezan M, Dinardo C, Jens E, et al. Determination of fetal RHD genotyping from maternal plasma in a population with a high frequency of the RHD pseudogene. 25th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion in conjunction with the 33rd Annual Conference of the British Blood Transfusion Society; London, UK: 2015. p. 1-379.

65. Verduin EP, Brand A, van de Watering LM, Claas FH, Oepkes D, Lopriore E, et al. Factors associated with persistence of red blood cell antibodies in woman after pregnancies complicated by fetal alloimmune haemolytic disease treated with intrauterine transfusions. Br J Haematol. 2015;168(3):443-51.