

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

ANA CLÁUDIA RABELO E SILVA

**Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia
pré-natal em gestantes RhD negativo**

RIBEIRÃO PRETO

2020

ANA CLÁUDIA RABELO E SILVA

**Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia
pré-natal em gestantes RhD negativo**

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Ana Cláudia Rabelo e

Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia pré-natal em gestantes RhD negativo. Ribeirão Preto, 2020.

90 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Orientador: Duarte, Geraldo

1. Imunoglobulina Rho(D). 2. Titulação de anticorpos.
3. Eritroblastose Fetal.

Nome: Silva, Ana Cláudia Rabelo e

Título: Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia pré-natal em gestantes RhD negativo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Data da Aprovação: _____

Banca Examinadora

Prof.(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

*Dedico minha dissertação às queridas gestantes,
que depositaram sua confiança e paciência
na Ciência e em mim, para juntos possibilitarmos
ainda mais conhecimento e saúde a esse momento tão lindo!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, e ousou dizer amigo, Prof. Dr. Geraldo Duarte, por sua acolhida, confiança, paciência, disponibilidade, incentivo e carinho. Obrigada por possibilitar que eu aprendesse tanto ao seu lado! O senhor é um modelo de dedicação e paixão pelo ensino e pela atenção à saúde!

À Dra. Flávia Leite, que apesar de não poder constar oficialmente como minha coorientadora, é incrivelmente merecedora desse título, por todo ensinamento e contribuição para meu crescimento.

À minha professora, Gabriela Campos, por ter sido um anjinho ao cruzar meu caminho, acreditando em mim antes que eu pensasse ser possível chegar onde estou.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo amor que demonstram ao apoiar, em todos os sentidos possíveis, as minhas escolhas e meus sonhos, desde sempre!

Ao meu namorado, por todo carinho, e por compreender, incentivar e permanecer sempre ao meu lado em cada uma de minhas realizações.

Aos meus amigos, que já faziam parte da minha vida e os que a pós-graduação me presenteou, por terem oferecido um momento de apoio, de conselho, de carinho, de torcida e de calma.

Aos professores e funcionários de todos os cantinhos da USP de Ribeirão Preto em que me aventurei na busca de aprendizado, com destaque ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, o qual nunca tinha imaginado antes poder ser parte, e fico muito grata por tê-lo escolhido.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial a toda equipe dos Laboratórios de Imunohematologia de Receptores e Doadores, e de Citometria de Fluxo, por permitirem a execução dos experimentos, testes e análises deste estudo.

À Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto, juntamente com as Unidades de Saúde e seus respectivos profissionais, que assentiram, auxiliaram e viabilizaram o contato com as participantes desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA), que possibilitaram financeiramente a execução deste estudo.

E a Deus, por me permitir sentir Sua proteção e cuidado a cada passo!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Princípios básicos do teste indireto de antiglobulina humana	29
Figura 2 – Esquema de diluição para titulação de anticorpos, com as respectivas proporções dos reagentes nos métodos em tubo e em gel	31
Figura 3 – Graus de aglutinação observados no método em tubo, sua descrição e o escore correspondente	32
Figura 4 – Cartão gel ID-Card LISS/Coombs, com modelo de preenchimento	33
Figura 5 – Graus de aglutinação observados nos cartões de gel teste, sua descrição e o escore correspondente	34
Figura 6 – Diagrama de fluxo das pacientes ao longo do estudo.....	38
Figura 7 – Título das análises em tubo (A) e em gel (B) das amostras coletadas em diferentes tempos após a administração da Ig anti-RhD	40
Figura 8 – Escore das análises em tubo (A) e em gel (B) das amostras coletadas em diferentes tempos após a administração da Ig anti-RhD	41
Figura 9 – Título máximo obtido ao longo dos pontos de coleta por meio da análise em tubo (A) e em gel (B).....	42
Figura 10 – Comparação entre a data da última coleta, data do parto e data em que os escores da Ig anti-RhD apresentaram-se zerados, por paciente, descritas em dias após a aplicação da Ig anti-RhD	43
Figura 11 – Correlação entre os valores máximos de escore (gel) ao longo dos pontos de coleta e o IMC	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações antropométricas e gestacionais das pacientes do estudo...	38
Tabela 2 – Critérios para obesidade segundo o índice de massa corporal por semana gestacional	39
Tabela 3 – Resultados do teste de comparação múltipla com a estimativa de diferença entre as médias para os escores de pontos de coleta subsequentes	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGAR	Ambulatório de Gravidez de Alto Risco
AGH	Antiglobulina humana
ANOVA	Análise de variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DGO	Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
FAEPA	Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FEBRASGO	Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HC-FMRPUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HFM	Hemorragia feto-materna
Ig	Imunoglobulina
Ig anti-RhD	Imunoglobulina anti-RhD
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMC	Índice de massa corporal
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea
LISS	Solução de baixa força iônica
NICE	Instituto Nacional para Saúde e Excelência Clínica – Reino Unido
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares
PEG	Reagente de polietilenoglicol
REDCap	Research Electronic Data Capture
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UBS	Unidade básica de saúde

RESUMO

SILVA, Ana Cláudia Rabelo e. **Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia pré-natal em gestantes RhD negativo.** 2020. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Contexto: Considera-se aloimunização materna contra o antígeno eritrocitário RhD como a principal causa da doença hemolítica do feto e do recém-nascido. Para seu controle, a imunoprofilaxia com Imunoglobulina anti-RhD (Ig anti-RhD) pré e pós-natal foi assumida amplamente nos cenários assistenciais como medida efetiva de prevenção desta forma de sensibilização. **Objetivo:** Avaliar a variação da concentração da Ig anti-RhD por meio dos títulos e escores do anticorpo na circulação materna após a imunoprofilaxia pré-natal até o parto. **Métodos:** Estudo observacional, analítico, longitudinal e prospectivo, no qual foram avaliadas 27 gestantes RhD negativo. Após receberem a dose de 300 µg de Ig anti-RhD pré-natal, aproximadamente na 28ª semana de gestação, foram feitas coletas de sangue seriadas 3, 7, 21, 42, 63 e 84 dias após a administração da Ig anti-RhD, ou até que o parto ocorresse. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C no Hemocentro de Ribeirão Preto até as avaliações dos títulos e escores da Ig anti-RhD em gel e em tubo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* IBM SPSS Statistics com o uso dos métodos: de imputação de dados de maximização esperada (para predição de valores ausentes); de ANOVA de medidas repetidas e teste de comparação múltipla (para verificar a diferença entre as médias dos escores); dos coeficientes de correlação de postos de Spearman (para as variáveis independentes qualitativas) e de Pearson (para variáveis quantitativas), sendo considerado o nível de significância de 5% em todos os casos. **Resultados:** Observou-se que a Ig anti-RhD apresentou curvas de concentração com valores máximos obtidos em cerca de 7 dias após sua administração. Os escores e títulos obtidos foram mais elevados em gel que em tubo para todas as pacientes. A Ig anti-RhD foi detectada no momento do parto em 59% das participantes, por meio da titulação em gel. Na comparação com o índice de massa corporal das gestantes com sobrepeso/obesidade podem apresentar menores concentrações da Ig anti-RhD. Não foram constatadas relações entre os escores máximos ao compará-los com o tipo sanguíneo RhD do neonato e a incompatibilidade ABO materno-neonatal. **Conclusão:** A estratégia utilizada de administrar 300 µg de Ig anti-RhD na 28ª semana de gestação deverá ser confrontada em estudos analisando os desfechos perinatais, visto que a Ig anti-RhD não foi detectável em 41% das parturientes, sugerindo período significativo sem cobertura profilática.

Palavras-chave: Imunoglobulina Rho(D). Titulação de anticorpos. Eritroblastose Fetal.

ABSTRACT

SILVA, Ana Cláudia Rabelo e. **Rho(D) Immune Globulin (anti-D) concentration-time curve after antenatal immunoprophylaxis in RhD-negative pregnant women.** 2020. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Obstetrics and Gynecologic Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Background: Maternal alloimmunization against fetal red blood cell antigens, primarily RhD antigen, is the main cause of hemolytic disease of fetus and newborn (HDFN). Antenatal and postnatal prophylaxis with Rho(D) Immune Globulin, also known as anti-D, Rhlg or anti-RhD, was widely confirmed as an effective strategy to prevent this maternal sensitization. **Aim:** To assess variation of anti-D concentration by titers and scores after RhD-negative pregnant women receive antenatal anti-D, until deliver. **Methods:** Observational, analytical, longitudinal, prospective study. Twenty-seven RhD-negative pregnant women were evaluated after receiving a prenatal anti-D dose around 28th week of pregnancy. Serial blood samples were collected at 3, 7, 21, 42, 63 and 84 days after anti-D administration, or until delivery. The samples were frozen at -20°C in the Blood Center Foundation of Ribeirão Preto, where we analyzed anti-D scores and titers by gel microcolumn assay (GMA) and conventional tube test (CTT). Statistical analyzes were performed by IBM SPSS Statistics software, using: expected maximum data imputation (for prediction of missing values); repeated measures ANOVA and multiple comparison test (to verify differences between mean scores); Spearman's and Pearson's correlation coefficients (for qualitative and quantitative independent variables, respectively), with a significance level of 5% in all cases. **Results:** Anti-D had concentration curves with maximum values around 7 days after its administration, and scores and titers were higher in GMA than CTT for all patients. Anti-D was detected at delivery in 59% of the participants performed in GMA. Overweight and obese pregnant women may have lower concentrations of anti-D. No correlation was found between maximum scores when comparing them with newborn RhD blood type and maternal-neonatal ABO incompatibility. **Conclusion:** Administering 300 µg of Rhlg in the 28th week of pregnancy should be compared in studies analyzing perinatal outcomes, since anti-D was not detectable in 41% of patients, suggesting a significant period without prophylaxis.

Keywords: Rho(D) Immune Globulin. Antibody titration. Erythroblastosis Fetalis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Tipo de estudo.....	24
4.2 Aspectos éticos	24
4.3 Amostragem	24
4.4 Desenvolvimento do projeto	25
4.5 Realização dos exames laboratoriais	27
4.5.1 Tipagem sanguínea ABO e RhD	27
4.5.2 Titulação de anticorpos	28
4.5.2.1 Titulação de anticorpos pelo método em tubo	30
4.5.2.2 Titulação de anticorpos pelo método em gel	33
4.6 Banco de dados	35
4.7 Análise estatística	35
4.8 Financiamento.....	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Características das gestantes	38
5.2 Titulação das amostras	39
5.3 Características dos neonatos	44
6 DISCUSSÃO	46
7 ASPECTOS RELEVANTES E LIMITANTES DO ESTUDO	55
7.1 Aspectos relevantes	55
7.2 Aspectos limitantes	55
8 CONCLUSÕES	58
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXOS	68
APÊNDICES	74

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Quando um indivíduo gera anticorpos como resposta imunológica induzida por aloantígenos (antígenos de indivíduos da mesma espécie, porém com diferentes constituições gênicas) institui-se a aloimunização ou isoimunização.¹ Atualmente, a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) reconhece 360 antígenos eritrocitários, divididos em 38 sistemas de grupos sanguíneos e outros não agrupados.²

Nesse vasto conjunto de aloantígenos, diversos são capazes de causarem aloimunização, o antígeno RhD (um dos 56 antígenos conhecidos pertencentes ao sistema sanguíneo Rh) sabidamente é o mais imunogênico, sendo o principal aloantígeno analisado.^{3,4} Ainda assim é importante ressaltar que o raciocínio considerando apenas o antígeno RhD para avaliar todas as aloimunizações é incompleto, devendo-se considerar os outros antígenos do sistema Rh, bem como as variantes RhD parciais e RhD fracos,⁴ e também outros sistemas sanguíneos, como Kell, Kidd, Duffy e MNS.⁵ O antígeno RhD, ao contrário de outros antígenos de grupos sanguíneos, está presente exclusivamente em eritrócitos.⁶

Sabe-se que a aloimunização materno-fetal é a ocorrência, principalmente, de sensibilização de gestantes RhD negativo expostas ao antígeno RhD expresso na superfície dos eritrócitos de feto RhD positivo. Esses eritrócitos podem atravessar a barreira placentária e atingir a circulação materna durante a gravidez ou parto, promovendo a sensibilização e consequente formação de anticorpos anti-RhD.^{7,8}

A hemorragia feto-materna (HFM) acontece de forma natural, sem correlação clínica identificada, em grande parte das gestações, mas, felizmente, esse evento nem sempre ocasiona a sensibilização.⁹ Embora o antígeno RhD comumente esteja presente nos eritrócitos fetais a partir da 7ª semana de gravidez, a HFM geralmente não ocorre de modo significativo até o início do terceiro trimestre de gravidez.¹⁰ Além disso, o volume sanguíneo fetal que atravessa a placenta e o potencial antigênico dos antígenos fetais são alguns dos fatores determinantes para que se desencadeie ou não a aloimunização. Considerando a resposta imunológica dentro deste complexo contexto, também deve ser lembrado do potencial de resposta imune materna.^{11,12}

Outro aspecto significativo é a incompatibilidade do feto também para o sistema ABO, pois nesses casos há uma proteção parcial contra a aloimunização materno-fetal primária pelo antígeno RhD, reduzindo sua probabilidade de ocorrência de 16%

para 1,5 a 2%.¹³ Esse fato não está completamente elucidado, mas um dos principais fatores deve-se ao resultado da rápida hemólise dos eritrócitos fetais que permeiam a placenta, pela ação de anticorpos anti-A e/ou anti-B, os quais estão presentes naturalmente na corrente sanguínea materna, sem que ocorra uma sensibilização prévia. Logo, o acesso desses eritrócitos fetais ao sistema imune materno é bloqueado, limitando a sensibilização ao antígeno RhD.^{14–16} No entanto, a incompatibilidade ABO não oferece proteção para o feto numa resposta imune secundária, uma vez que a sensibilização já ocorreu.¹⁷ Além disso, acredita-se que a incompatibilidade ABO também atue na redução de imunização contra antígenos não-RhD.¹⁸

Além da ocorrência natural, a HFM pode resultar de procedimentos diagnósticos invasivos durante a gravidez, tais como amniocentese, biópsia de vilos coriais e cordocentese; também por traumatismos abdominais; intervenções terapêuticas intrauterinas; perda gestacional anterior por aborto, gravidez ectópica e gravidez molar; ou ainda durante parto anterior sem profilaxia da aloimunização RhD.¹⁹

Outro meio de sensibilização materna ao antígeno RhD decorre de hemoterapia incompatível, cujo doador é RhD positivo e a receptora RhD negativo ou com algum tipo de variante do antígeno.²⁰ Nesse caso, o volume sanguíneo contendo aloantígenos que entrará em contato com o sangue materno é maior que na sensibilização relacionada à gravidez ou ao parto, gerando, conseqüentemente, uma resposta imune mais significativa de anticorpos anti-RhD.²¹ Embora a aloimunização por transfusão sanguínea produza mais anticorpos, é um meio menos preocupante, pois o controle de qualidade quanto à compatibilidade sanguínea entre doador e receptor reduz significativamente o risco de imunização por meio de transfusões incompatíveis pelo antígeno RhD.²²

Após a primeira exposição ao aloantígeno RhD, a gestante começa a produzir imunoglobulina M (IgM), uma classe de anticorpos produzida de forma lenta (após várias semanas) e em pequenas quantidades na imunização primária.²³ A IgM, devido ao seu alto peso molecular, é incapaz de cruzar a placenta,²⁴ tornando muito rara a possibilidade de hemólise das hemácias fetais na primeira gravidez de feto RhD positivo, exceto nos casos de gestantes já imunizadas previamente.²⁵

Na exposição subsequente inicia-se a imunização secundária, caracterizada pela intensa e rápida produção (em poucos dias) de imunoglobulina G (IgG), a

principal classe de imunoglobulina (Ig) e a única capaz de ultrapassar a barreira placentária.^{26,27} Ao atingir a corrente sanguínea fetal, a IgG reconhece e se liga aos antígenos RhD da superfície dos eritrócitos fetais, promovendo a opsonização e estimulando a destruição desses eritrócitos por hemólise, causando a doença hemolítica do feto e do recém-nascido.^{28,29}

A doença hemolítica do feto e do recém-nascido, anteriormente denominada eritroblastose fetal ou doença hemolítica perinatal (descritores ainda utilizados), é caracterizada por um quadro de anemia hemolítica com gravidade variada, podendo apresentar icterícia, eritroblastose, hepatoesplenomegalia, edema, encefalopatia bilirrubínica (kernikterus) e hidropisia fetal.^{11,30} O grau de severidade dos danos da doença hemolítica do feto e do recém-nascido é extremamente heterogêneo, pois, em cenários de menor gravidade, mesmo quando não é instituído nenhum tratamento, o feto ou neonato podem recuperar-se completamente. No entanto, em casos mais severos podem ocorrer complicações com potencial de causar óbito fetal ou neonatal.^{25,31}

Para o diagnóstico da aloimunização materna e consequente manejo de possível doença hemolítica do feto e do recém-nascido utiliza-se a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), a qual fundamenta-se no teste indireto de antiglobulina humana, denominação atualmente utilizada em substituição ao teste de Coombs indireto, termo que ainda permanece entre os descritores em saúde. O teste detecta *in vitro* a presença de anticorpos irregulares no soro materno, e possibilita a determinação da titulação quando o anticorpo está presente.³² Importante salientar que nos casos em que a gestante faz uso da medicação alfa-metildopa e em portadoras de doenças mistas do conjuntivo é possível a ocorrência de resultados falso-positivos do teste indireto de antiglobulina humana.³³

O teste indireto de antiglobulina humana é realizado principalmente pelos métodos em tubo e em gel. Embora o método em tubo seja o mais utilizado nas avaliações laboratoriais devido ao seu custo inferior, o método em gel é mais reprodutível, com resultados estáveis por alguns dias e menos sujeito a variação na interpretação por diferentes analistas.^{34,35}

Em protocolos internacionais, padroniza-se que todas as grávidas devem realizar a PAI, independente da tipagem RhD no início da gravidez, preferencialmente na primeira consulta pré-natal.^{36,37} Outros protocolos também indicam a repetição da PAI por volta da 28ª semana de gravidez,^{38,39} prática menos mandatária.

Uma das primeiras hipóteses de que a imunoglobulina anti-Rho(D) (Ig anti-RhD) seria eficaz para evitar a imunização foi proposta em 1961. Os pesquisadores embasaram-se nas características da proteção parcial exercida pela incompatibilidade para o sistema ABO, e sugeriram que os eritrócitos fetais RhD positivos, ao atingirem a circulação sanguínea da mãe RhD negativo, pudessem ser destruídos por meio da Ig anti-RhD, a qual atuaria de forma semelhante aos anticorpos anti-A e anti-B, prevenindo assim a sensibilização RhD materna.⁴⁰ Na sequência, outras pesquisas foram realizadas para confirmação deste conceito. Hoje, considera-se que esta seja a principal estratégia para a prevenção da doença hemolítica do feto e do recém-nascido, administrando-se elevada quantidade de anticorpos policlonais do tipo IgG contra o antígeno RhD, provenientes de plasma humano de doadores.^{41,42}

Em 1962 foi iniciado um ensaio clínico sobre o uso da Ig anti-RhD após o parto, pois já era conhecido que este é o período de maior risco para a ocorrência da HFM. O procedimento consistiu em obter plasma de mulheres RhD negativo que tinham sido gravemente imunizadas e que geraram fetos hidrópicos e/ou natimortos. Estas amostras plasmáticas contendo anticorpos anti-RhD foram administradas em 500 mulheres RhD negativo, não sensibilizadas anteriormente, que gestaram fetos RhD positivo, cujo tipo sanguíneo ABO era compatível com o da mãe. Esta intervenção ocorreu nas primeiras 48 horas após o parto (mas, em alguns casos em até 96 horas). Observou-se que nenhuma das 74 mulheres que apresentaram gestações subsequentes com fetos RhD positivo foi sensibilizada.⁴³

Apesar de a HFM ocorrer com maior frequência e intensidade durante o parto, os eritrócitos fetais podem entrar na circulação materna ainda durante a gravidez, induzindo a imunização durante o processo gestacional.^{44,45} Logo, notou-se a importância de administrar a Ig anti-RhD também durante a gravidez, pois ao aplicar uma dose somente após o parto essas sensibilizações anteriores não seriam prevenidas. Com base nessa concepção, outra pesquisa, em 1967, realizou a aplicação de uma dose de 1,5 mL (90 µg) de Ig anti-RhD na 36ª semana de gravidez, a qual demonstrou ser segura para o feto e a mãe.⁴⁶

Estudos posteriores revelaram que muitas gestantes imunizadas começam a produzir anticorpos anti-RhD no início do terceiro trimestre de gravidez, sugerindo que a administração fosse realizada entre a 28ª e a 34ª semana. Em uma pesquisa, foram selecionadas 1357 gestantes RhD negativo não sensibilizadas, sendo que 1204 receberam uma dose de Ig anti-RhD na 28ª semana e outra dose na 34ª semana e

153 receberam uma dose única entre as semanas 28 a 34 de gravidez. Nenhuma delas apresentou sensibilização. Do total de gestantes, 413 tiveram uma gravidez subsequente e 343 destas conceberam fetos RhD positivo. Novamente, nenhuma das gestantes demonstrou evidências de resposta imune secundária.⁴⁷

No Brasil, o Ministério da Saúde determina a aplicação de 300 µg de Ig anti-RhD às gestantes com a PAI negativa, dentro de 72 horas após o parto, caso o neonato seja RhD positivo. O Ministério da Saúde também estabelece a administração após procedimentos invasivos em gestantes RhD negativo (amniocentese, cordocentese, biópsia de vilos coriais), aborto, gravidez ectópica, mola hidatiforme e sangramento obstétrico com risco de hemorragia feto-materna significativa. A dose pode ser maior que a estipulada se a HFM for comprovadamente maior que a habitual.⁴⁸

Na imunoprofilaxia pré-natal, o Ministério da Saúde⁴⁸ e a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo,⁴⁹ assim como nos Estados Unidos,⁵⁰ informam que a aplicação de 300 µg de Ig anti-RhD deve ser realizada na 28ª semana de gravidez, considerando a sua utilização até a 34ª semana, se for ultrapassada a época preconizada. Alternativamente, protocolos internacionais como no Canadá⁵¹ e Reino Unido,⁵² além de dose única, também relatam a possibilidade de serem administradas duas doses de 100 a 120 µg na 28ª e na 34ª semana de gravidez.

Conforme a preparação comercial, a Ig anti-RhD pode ser aplicada apenas por via intramuscular (Matergam®, Partogama®, RhoGAM®) ou também por via intravenosa (Rhophylac®). Embora os níveis máximos de Ig anti-RhD no organismo sejam atingidos mais rapidamente quando aplicada por via intravenosa, estudos sugerem que os níveis de Ig anti-RhD tornam-se similares em duas a três semanas após a utilização da via intramuscular ou intravenosa, sendo indiferente a via de administração da imunoglobulina.^{53,54} Cada 20 µg (100 UI) de Ig anti-RhD são suficientes para neutralizar a imunização gerada por cerca de 1 mL de eritrócitos fetais ou 2 mL de sangue total.^{55,56}

Desde sua implementação, a imunoprofilaxia anti-RhD tem reduzido a incidência da doença hemolítica do feto e do recém-nascido e obtido melhorias na saúde materna e perinatal.⁵⁷ Atualmente, as taxas de ocorrência têm permanecido estáveis devido a outros coeficientes, como problemas na administração da imunoprofilaxia (aplicação ausente ou inadequada) e erro ao detectar as situações

clínicas de HFM que também demandam imunoprofilaxia, a exemplo dos abortamentos espontâneos.⁵⁸

Avaliando objetivamente a questão da profilaxia da aloimunização pelo antígeno RhD durante a gravidez, o conhecimento científico produzido até o momento dá subsídio para esta prática considerando-se os aspectos relacionados ao custo-benefício.⁵⁹ Outro aspecto que também deve ser realçado é a questão da segurança da intervenção, havendo produção científica que sustenta a sua segurança negando o risco de hemólise fetal.⁶⁰

Com os resultados da literatura fica a dúvida se os atuais protocolos da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo⁴⁹ e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO),⁶¹ utilizando 300 µg de Ig anti-RhD na 28^a semana da gravidez, apresentam concentração protetora desta imunoglobulina contra a aloimunização RhD até o término da gravidez. Portanto, esta é uma lacuna no conhecimento em nosso meio demandando avaliação laboratorial específica. Da mesma forma, a avaliação da velocidade de decaimento dos títulos do anticorpo da Ig anti-RhD após a administração de imunoglobulina anti-RhD também é uma falha no conhecimento desta área. Seria extremamente oportuno que houvesse essa avaliação, pois traria mais segurança ao pré-natalista.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a variação biológica da velocidade de redução da Ig anti-RhD em gestantes após a imunoprofilaxia anti-RhD, há possibilidade de que existam pacientes nas quais a velocidade de decaimento é mais acelerada. Isso indica a necessidade de que haja alguma solução técnica para fazer esta avaliação sobre qual tempo a Ig anti-RhD continua na circulação, em nossa população, e sua relação com a positividade da PAI (marcador laboratorial de fácil acesso na prática clínica), indicando indiretamente segurança profilática dessa intervenção. Realizar o acompanhamento dos resultados da imunoprofilaxia utilizando a curva de decaimento da concentração da Ig anti-RhD por meio dos títulos e escores da Ig anti-RhD fornecerá esclarecimentos para essas questões e nos parece oportuno e racional a realização de uma pesquisa que busque respondê-las objetivamente.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a variação da concentração da Ig anti-RhD por meio dos títulos e escores do anticorpo anti-RhD na circulação materna após a imunoprofilaxia pré-natal até o parto.

3.2 Objetivos específicos

- a) Detectar se existem títulos e escores zerados da Ig anti-RhD antes do parto;
- b) Comparar os títulos e escores da Ig anti-RhD entre os testes em gel e em tubo;
- c) Investigar possível correlação entre os escores da Ig anti-RhD com:
 - condição nutricional da gestante;
 - incompatibilidade entre a tipagem sanguínea ABO do neonato e da puérpera;
 - tipagem sanguínea RhD neonatal.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Estudo observacional, analítico, longitudinal, prospectivo.

4.2 Aspectos éticos

Antes do início do projeto, conforme Resolução 196/96 envolvendo pesquisas com seres humanos, este recebeu aprovação da Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), sob protocolo 589 de 09 de maio de 2017 (Anexo A), e do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRPUSP), sob parecer 2.099.994 de 05 de junho de 2017 (Anexo B). Também foi autorizada a execução pela Secretaria de Saúde da cidade de Ribeirão Preto – SP, sob ofício OF4627/2017 de 27 de novembro de 2017 (Anexo C).

As gestantes receberam informações acerca do projeto, incluindo os objetivos e procedimentos a serem realizados. Quando concordaram em participar da pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em duas vias, as quais ficaram com uma via do documento (Apêndice A). Foi explicitado a permissão da interrupção da participação na pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo referente aos aspectos assistenciais.

4.3 Amostragem

A amostragem foi do tipo não probabilística, por conveniência, consecutiva. Não foi possível encontrar informações na literatura referentes à comparação do decaimento dos títulos da Ig anti-RhD pré-natal pelos dois métodos (gel e tubo) que dessem subsídio a uma avaliação estatisticamente embasada para o cálculo do tamanho amostral deste projeto. No entanto, os trabalhos⁶²⁻⁶⁴ que avaliaram a concentração Ig anti-RhD utilizaram 15, 16 e 43 pacientes. Outro trabalho⁶⁵ fez estudo semelhante, porém comparando o decaimento dos títulos de anticorpos anti-RhD de

gestantes já imunizadas e com títulos elevados de anticorpos (> 32) com a dosagem da concentração por citometria de fluxo, usando 16 gestantes como base. Partindo do princípio de que os resultados com essa média de 22,5 pacientes foram adequados para as respostas isoladas, trabalhamos com 30 gestantes nesta pesquisa.

Para o recrutamento das pacientes, foram selecionadas quinze unidades básicas de saúde (UBS) da cidade de Ribeirão Preto – SP, pertencentes aos Distritos Central e Oeste, devido à proximidade com o HC-FMRPUSP, e que proporcionavam atendimento pré-natal.

Dentre as unidades selecionadas, uma não permitiu a realização do projeto. Nas unidades autorizadas, todas as gestantes identificadas no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019 foram convidadas a participar da pesquisa, considerando os seguintes critérios:

- a) critérios de inclusão: todas as gestantes RhD negativo identificadas nas UBS previamente selecionadas que estivessem com menos de 27 semanas de gravidez e concordaram em participar do estudo, assinando o TCLE;
- b) critérios de exclusão: gestantes com parceiro RhD negativo; gestantes que apresentaram PAI prévia nesta gravidez com reação positiva, descartando gestantes já isoimunizadas; gestantes que não tiveram a Ig anti-RhD prescrita pelo médico que a acompanha; gestantes portadoras de doenças do conjuntivo e usuárias de alfa-metildopa, por ambos casos serem sujeitos a apresentarem variações do teste indireto de antiglobulina humana independente da isoimunização RhD;⁶⁶ gestantes que não tiveram condições de saúde, físicas e/ou psicológicas de participar do estudo; e gestantes que não aceitaram participar do estudo ou que não concordaram com o TCLE;
- c) critérios de descontinuidade: decisão da paciente em interromper as coletas das amostras ou de desistência a qualquer momento, e gestantes que, eventualmente, necessitaram de dose adicional de Ig anti-RhD, a exemplo de intervenções intrauterinas invasivas.

4.4 Desenvolvimento do projeto

O projeto foi desenvolvido no Ambulatório de Gravidez de Alto Risco (AGAR) do HC-FMRPUSP e nas UBS da cidade de Ribeirão Preto – SP, onde foi realizado o

pré-natal das gestantes, a aplicação da imunoglobulina e a coleta das amostras para a titulação da Ig anti-RhD.

As avaliações laboratoriais foram feitas no Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto.

O estudo foi realizado de acordo com as seguintes etapas:

- a)** recrutamento das gestantes RhD negativo não isoimunizadas e com parceiros RhD positivo, identificadas nas UBS e no AGAR;
- b)** apresentação e convite para participação no projeto;
- c)** oferecimento da possibilidade que a gestante continue a realização do pré-natal no AGAR do HC-FMRPUSP ou permanecer com o atendimento na UBS;
- d)** convite para ler o TCLE (Apêndice A), e, diante da concordância, sua assinatura;
- e)** aplicação do questionário geral (Apêndice B) com informações demográficas, gestacionais e antropométricas das pacientes;
- f)** coleta de amostra sanguínea em tubo plástico (4 mL) com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por meio de sistema de coleta à vácuo, para confirmação da tipagem para o grupo sanguíneo ABO e antígeno RhD (ver item 4.5.1); e coleta de amostra sanguínea em tubos plásticos (5 mL) sem anticoagulante e com separador de coágulo, por meio de sistema de coleta à vácuo, para realização de PAI prévia;
- g)** transporte das amostras coletadas para o Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde estas foram centrifugadas para a realização da tipagem ABO e RhD e PAI;
- h)** administração intramuscular da Ig anti-RhD 300 µg (1500 UI) nas gestantes com PAI negativa entre a 28^a e 34^a semana de gravidez;
- i)** coletas de amostra sanguínea em tubos plásticos (5 mL) sem anticoagulante e com separador de coágulo, por meio de sistema de coleta à vácuo, para realização das titulações, de acordo com o seguinte esquema:
 - 1^a coleta: três dias após a injeção da imunoglobulina anti-RhD (3 dias);
 - 2^a coleta: uma semana após a injeção da imunoglobulina anti-RhD (7 dias);
 - 3^a coleta: duas semanas após a última coleta (21 dias);
 - 4^a, 5^a e 6^a coletas: três semanas após a última coleta (42, 63 e 84 dias);
- j)** transporte das amostras coletadas para o Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde foram mantidas em temperatura

ambiente até a ocorrência de coagulação, procedendo a centrifugação a 3400 rpm por 5 minutos para separação do soro, transferência do soro para no mínimo dois tubos criogênicos (1 mL cada) e armazenamento dos tubos a -20 °C;

k) realização das titulações em tubo e em gel (ver itens 4.5.2.1 e 4.5.2.2)

l) análise e avaliação dos resultados.

4.5 Realização dos exames laboratoriais

Para a realização da tipagem sanguínea ABO e RhD e titulação da Ig anti-RhD nos métodos em tubo e em gel, serão apresentados alguns princípios de seus aspectos técnicos. Todos os testes foram realizados pela pesquisadora no laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto.

4.5.1 Tipagem sanguínea ABO e RhD

Para a determinação do grupo sanguíneo ABO e antígeno RhD, utiliza-se uma amostra de sangue total, coletada em tubo plástico (4 mL) com anticoagulante EDTA, sendo centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos para a separação de hemácias e plasma. A seguir, são realizadas as tipagens direta (que visa identificar os antígenos constituintes dos eritrócitos do paciente) e reversa, apenas para ABO (que busca por anticorpos presentes no plasma).^{67,68} O teste reverso no grupo ABO é possível pois este é o único grupo sanguíneo em que há presença natural de anticorpos contra seus antígenos faltantes sem que seja necessário o contato prévio com esses antígenos.⁶⁸ Na tipagem RhD, a fase reversa não é realizada justamente devido ao fato que o anticorpo anti-RhD é dependente de imunização prévia.⁶⁷

A princípio, é realizada uma suspensão de hemácias, na proporção aproximada de 5% (50 µL das hemácias do paciente a cada 1 mL de solução salina 0,9%). São identificados 5 tubos de ensaio de poliestireno, 12 mm x 75 mm - 5 mL com os termos “anti-A”, “anti-B”, “anti-D”, “reversa de A”, “reversa de B”. São adicionados 50 µL dos respectivos reagentes aos tubos “anti-A”, “anti-B” e “anti-D”, e, em seguida, 50 µL da solução de hemácias do paciente em cada um desses tubos. Para a fase reversa, são colocados 100 µL do soro do paciente nos tubos “reversa de A” e “reversa de B”,

acrescidos de 50 µL de hemácias comerciais correspondentes aos antígenos A e B. Posteriormente, todos os tubos são homogeneizados por meio de leve agitação e centrifugados a 3400 rpm por 20 segundos. Para realizar a leitura, suspende-se delicadamente o botão de hemácias por meio de leve agitação horizontal do tubo, examinando a presença e o grau de aglutinação. Para o grupo ABO, os resultados da tipagem direta e reversa devem ser complementares e concordantes.

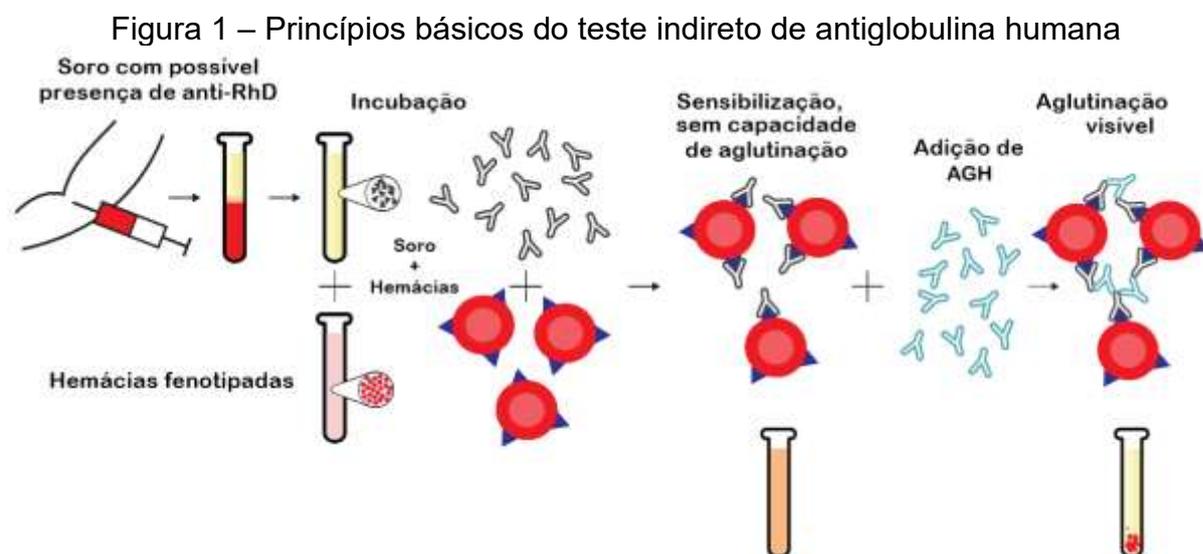
Diante de resultado negativo para o antígeno RhD, é procedida a determinação da presença de variantes. Para isto, a amostra é incubada a 37 °C por 15 minutos, para que seja possível identificar alguma variante que não apresenta reação a frio (temperatura ambiente). Após a incubação, é realizada nova centrifugação de leitura a 3400 rpm por 20 segundos, e, permanecendo resultado negativo, a amostra passa por um processo de lavagem: é acrescida de solução salina 0,9%, totalizando aproximadamente 4 mL, sendo homogeneizada por meio de leve agitação, centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos, e, em seguida, o sobrenadante é desprezado com o auxílio de pipetas plásticas descartáveis. Esse procedimento de lavagem com solução salina 0,9% é repetido por mais duas vezes. Adiciona-se 100 µL de antiglobulina humana (AGH), também conhecida como soro de Coombs. A amostra é homogeneizada por meio de leve agitação, centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos, e procedida a leitura. Resultados negativos confirmam a ausência do antígeno RhD; resultados positivos indicam a presença de uma variante do antígeno RhD, mas, sorologicamente, não é possível diferenciar entre D fraco ou D parcial,^{3,6,69} sendo necessárias investigações mais detalhadas.

4.5.2 Titulação de anticorpos

O teste indireto de antiglobulina humana objetiva a realização de pesquisa, de identificação e de titulação de anticorpos livres no plasma, podendo ser realizado por meio de diversos métodos, sendo os mais comuns em tubo e em gel.¹⁷ Fundamenta-se na reação de aglutinação de hemácias cujo antígeno corresponde ao anticorpo presente no soro ou plasma de interesse.

Com relação ao anticorpo anti-RhD, constituído principalmente por imunoglobulinas do tipo IgG, consideradas não-aglutinantes, a reação de aglutinação pode não ocorrer espontaneamente diante de uma sensibilização do anticorpo com seu antígeno. A IgG, por seu carácter monomérico, se liga ao seu antígeno em uma

célula, porém não é capaz de unir outras células e promover aglutinação. Nesse caso é necessário o uso da AGH, a qual potencializa a formação da aglutinação ao se ligar aos anticorpos que já sensibilizaram as hemácias, tornando possível a visualização macroscópica de aglutinação (Figura 1).^{6,67}



Fonte: Produzido pela autora com base em Harmening (2019)¹⁶ e <https://laboratoryinfo.com/coombs-test>

Em uma análise, caso a aglutinação ocorra, o teste é considerado positivo e demonstra a presença de anticorpos na amostra analisada. A positividade do resultado é descrita por meio do grau observado de aglutinação das hemácias, variando de uma reação fraca até uma reação 4+, considerado o nível máximo de aglutinação.^{70,71}

Em casos positivos, deve ser realizada a titulação do anticorpo, a qual visa demonstrar indiretamente a concentração do anticorpo de interesse. A titulação é feita por meio de diluição seriada de fator 2, na qual uma amostra de soro pura é diluída em solução de baixa força iônica (LISS) ou solução fisiológica na mesma quantidade de soro utilizado, sendo que cada diluição formada passará pelo mesmo procedimento até atingir um provável nível de diluição no qual resultará em ausência de aglutinação, sempre mantendo a última amostra, caso seja necessário proceder a diluição quando a última ainda apresentar resultado positivo.⁶⁸

Após a diluição, os valores observados podem ser descritos na forma de título, que se define como o inverso da maior diluição onde foi possível observar reação positiva de aglutinação ($\geq 1+$), desconsiderando reações fracas,^{16,17,72} e/ou como

escore, o qual é a gradação numérica obtida por meio da soma de valores estabelecidos para cada um dos graus de aglutinação, que visa corrigir parte da subjetividade da leitura em cruces da hemaglutinação.¹⁶

Para a realização da titulação de anticorpos por ambos os métodos é necessária a seleção de hemácias fenotipadas, ou seja, que possuem o fenótipo dos antígenos conhecido, e escolher a que apresente o antígeno específico que irá interagir com o anticorpo que se deseja estudar. Nesse caso, utilizam-se hemácias do tipo O positivo (por não promover reação com os antígenos A e B), com fenótipo R2R2 (cDE/cDE), o qual possui o antígeno D em duplicidade e o maior número de sítios antigênicos, facilitando a identificação dos anticorpos anti-RhD.^{16,68}

Inicialmente, foi selecionada uma bolsa de sangue total proveniente de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, com fenótipo R2R2. Cada bolsa possui uma extensão que mantém parte do sangue total isolado do restante da bolsa, para que sejam facilmente extraídos para análises, conservando a integridade da bolsa. Desse modo, é retirada uma alíquota de cerca de 1 mL desta extensão, a qual é colocada em um tubo de ensaio 5 mL, e acrescida de solução salina 0,9%, totalizando aproximadamente 4 mL. Essa solução é homogeneizada, centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos, e, em seguida, o sobrenadante é desprezado com o auxílio de pipetas plásticas descartáveis. Esse procedimento de lavagem com solução salina 0,9% é repetido por mais duas vezes, para garantir que todos os anticorpos livres presentes na amostra sejam removidos, com o intuito que não interfiram na realização da titulação do anticorpo de interesse.

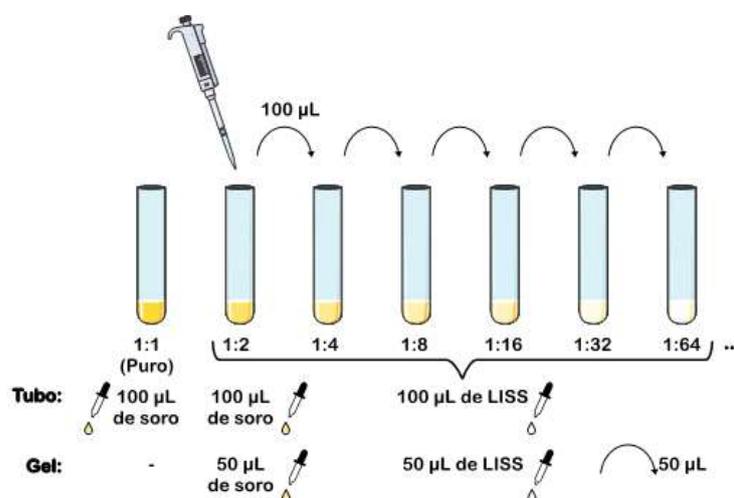
Após a lavagem das células, é realizada uma suspensão de hemácias nas proporções aproximadas de 5% para as análises em tubo (50 µL de hemácias lavadas a cada 1mL de LISS) e 1% para as análises em cartão gel (10 µL de hemácias lavadas a cada 1mL de LISS).

4.5.2.1 Titulação de anticorpos pelo método em tubo

Inicialmente, são realizadas as diluições de fator 2 em tubos de ensaio de poliestireno, 12 mm x 75 mm - 5 mL, os quais são denominados de “1:1” (puro), “1:2”, “1:4” (...) até “1:512”. São dispostos 100 µL do soro da paciente no tubo “1:1” (puro) e em todos os outros tubos (“1:2” até “1:512”) são colocados 100 µL de LISS em cada. No tubo “1:2”, adiciona-se 100 µL do soro da paciente para proceder a diluição, por

meio da homogeneização por cinco vezes com pipeta (coletando e desprezando o conteúdo da pipeta de volta para a amostra) e transferência de 100 μ L dessa solução para o tubo subsequente. Após o término da última diluição programada, os 100 μ L retirados do tubo “1:512” são reservados em um novo tubo, para que seja possível prosseguir o processo de diluição caso ainda ocorram valores positivos (Figura 2).

Figura 2 – Esquema de diluição para titulação de anticorpos, com as respectivas proporções dos reagentes nos métodos em tubo e em gel



Fonte: Produzido pela autora com base em Harmening (2019)¹⁶

São acrescentados em cada um dos tubos 50 μ L da solução de hemácias a 5% previamente preparada e 100 μ L do reagente de polietilenoglicol (PEG). Em seguida, os tubos são homogeneizados por meio de leve agitação, e incubados a 37 °C por 15 minutos. A adição de PEG, associado com a utilização de LISS, potencializa a reação antígeno-anticorpo, aproximando as hemácias e, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade na detecção dos anticorpos e a redução do tempo de incubação (sem a utilização de PEG as amostras devem ser incubadas por 60 minutos).¹⁶

Após o término da incubação, as amostras passam por três processos de lavagem com solução salina 0,9%, como descrito anteriormente no processo de preparação da solução de hemácias, porém desprezando o sobrenadante por inversão. Os procedimentos de lavagem visam remover todos os anticorpos presentes no soro da paciente que não se ligaram aos eritrócitos da amostra. Ao término da terceira lavagem, as bordas do tubo são secas com papel absorvente.

Em seguida, são acrescentados 100 μ L de AGH em cada tubo, os quais são homogeneizados por meio de leve agitação e centrifugados a 3400 rpm por 20

segundos. Para realizar a leitura, suspende-se delicadamente o botão de hemácias por meio de leve agitação horizontal do tubo, examinando a presença e o grau de aglutinação (Figura 3).

Figura 3 – Graus de aglutinação observados no método em tubo, sua descrição e o escore correspondente

Grau de aglutinação	Descrição	Escore
 4+	todas as células formando um aglutinado único, com fundo límpido	12
 3+	mais de uma grande aglutinação, com fundo límpido	10
 2+	diversas aglutinações menores, podendo apresentar células livres	8
 1+	numerosas microaglutinações, com fundo turvo	5
 Fraco	algumas microaglutinações, com fundo turvo	3
 Negativo	nenhuma aglutinação, formando uma suspensão de células uniforme	0

Fonte: Produzido com base em: Quinley (2011)⁷¹

Fotos: Adaptado de <https://www.vet.upenn.edu/images/default-source/New-Bolton-Post/blood-test5.jpg>

Em todos os resultados negativos são adicionados 50 µL do reagente controle de Coombs, o qual apresenta uma solução de hemácias do tipo O previamente sensibilizadas com anticorpos IgG. Ao fim dessa etapa, todos os tubos deverão apresentar reação positiva, validando os testes, pois as hemácias do controle de Coombs irão se ligar a AGH adicionada anteriormente, promovendo a aglutinação. Assim, o controle de Coombs visa atenuar resultados falso-negativos ao atestar que a etapa de lavagem foi adequada (pois mesmo os vestígios mínimos de soro ou plasma que permanecerem após a fase de lavagem podem neutralizar a AGH, causando resultados de teste falsamente negativos) e que a AGH apresentou reação

satisfatória (indicando que a não aglutinação da análise ocorreu realmente devido à ausência de Ig anti-RhD na amostra, e não por inatividade da AGH).

4.5.2.2 Titulação de anticorpos pelo método em gel

Comparado ao método em tubo, o método em gel diminui a probabilidade de resultados falso-negativos ao prescindir de procedimentos de lavagem (pois a suspensão de hemácias é colocada na micro coluna antes do soro, impedindo a neutralização da AGH pelas imunoglobulinas do soro que poderiam inativar a reação) e de adição do soro de Coombs (visto que este já se encontra agregado ao gel).^{16,35}

Para as análises, foram utilizados cartões ID-Card LISS/Coombs (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, USA) compostos de seis micro colunas, cada uma contendo soro antiglobulina humana poliespecífico (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal) suspenso em gel (Figura 4). As micropartículas de gel, pela sua característica porosa, atuam como filtro barrando e/ou limitando a passagem dos eritrócitos ao longo gel durante a centrifugação de acordo com o tamanho de sua aglutinação.^{16,73}

Figura 4 – Cartão gel ID-Card LISS/Coombs, com modelo de preenchimento



Fonte: A autora (2020)

Primeiramente, são realizadas as diluições de fator 2 em tubos denominados de “1:2”, “1:4” (...) até “1:512”. São dispostos 50 µL de LISS em cada tubo e 50 µL do soro da paciente no tubo “1:2” para proceder a diluição. Em cada diluição, a amostra é homogeneizada por cinco vezes e, em seguida, são transferidos 50 µL dessa solução para o tubo subsequente. Após o término da última diluição programada, os 50 µL retirados do tubo “1:512” são reservados em um novo tubo, para que seja

possível prosseguir o processo de diluição caso ainda ocorram valores positivos (Figura 2).

São preparados os cartões, demarcados de “1:1” (puro) a “1:512” (Figura 4), onde são colocados 50 µL da solução de hemácias a 1% previamente preparada em cada campo de análise. Em seguida, são adicionados 25 µL de soro do paciente no campo puro e transferidos 25 µL de cada diluição feita no tubo para seu respectivo campo no cartão. Os cartões são levemente homogeneizados por meio de leve agitação, incubados a 37 °C por 15 minutos, centrifugados a 910 rpm por 10 minutos e procedida a leitura, conforme os critérios utilizados na definição do grau de aglutinação (Figura 5).

Figura 5 – Graus de aglutinação observados nos cartões de gel teste, sua descrição e o escore correspondente

Grau de aglutinação	Descrição	Escore
 4+	aglomerado uniforme de eritrócitos aglutinados na extremidade superior da coluna	12
 3+	eritrócitos aglutinados em tamanho médio presentes na fração superior da coluna	10
 2+	aglutinações menores dispersas ao longo de toda coluna, sendo que células não aglutinadas podem encontrar-se no fundo da coluna	8
 1+	eritrócitos aglutinados em tamanho pequeno dispostos na fração inferior da coluna, com células não aglutinadas no fundo da coluna	5
 Fraco	algumas aglutinações pequenas na fração inferior da coluna, com quantidade razoável de eritrócitos não aglutinados na base da coluna	3
 Negativo	todas as células não aglutinadas dispostas uniformemente na extremidade inferior da coluna	0

Fonte: Produzido com base em Bruce et al. (2013),⁷² Szkotak et al. (2016)⁷⁴ e Harmening (2019)¹⁶
Fotos: A autora (2018)

4.6 Banco de dados

Os dados do estudo foram armazenados e gerenciados usando a ferramenta eletrônica de captura de dados Research Electronic Data Capture (REDCap),^{75,76} hospedada em <https://redcap.fmrp.usp.br/>.

O REDCap é uma plataforma de *software* segura e baseada na Web, projetada para suportar captura de dados para estudos de pesquisa, fornecendo: 1) uma interface intuitiva para entrada de dados validada; 2) rastreamento de manipulação de dados e procedimentos de exportação; 3) procedimentos automatizados de exportação para downloads de dados de forma facilitada e integrada com pacotes estatísticos comuns; e 4) procedimentos para integração e interoperabilidade de dados com fontes externas. A ferramenta garante a segurança e sigilo necessários para o gerenciamento das informações sobre a pesquisa.

4.7 Análise estatística

As análises de estatística descritiva e inferência estatística foram realizadas por meio do *software* IBM SPSS Statistics (IBM Inc., versão 24.0 para Windows, Armonk, NY)⁷⁷ e os gráficos gerados também por meio do *software* Microsoft® Excel® para Microsoft 365.

Para estimar os valores de escore dos pontos de coletas ausentes e dos casos em que o parto ocorreu em data anterior a esperada de 40 semanas de gravidez, foi utilizado o método de imputação de dados de maximização esperada, o qual considera os padrões de escore ao longo da curva de concentração de cada paciente, assim como o padrão de covariância entre as demais pacientes para cada ponto de coleta.

O coeficiente de correlação de postos de Spearman foi utilizado para comparar os níveis máximos obtidos dos escores da Ig anti-RhD em gel com variáveis independentes qualitativas com possível influência sobre a concentração de Ig anti-RhD: tipo sanguíneo RhD neonatal positivo ou negativo; presença de incompatibilidade ABO entre a puérpera e o neonato e estado nutricional com base no índice de massa corporal (IMC) por idade gestacional (baixo peso, adequado, sobrepeso, obesidade). Também foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson para analisar a associação entre os valores máximos dos escores da Ig anti-RhD em

gel e o IMC medido no momento da aplicação da imunoglobulina, por se tratarem de variáveis dependentes quantitativas, sendo considerado o nível de significância de 5% em todos os casos.

Foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas e teste de comparação múltipla para verificar a diferença entre as médias dos escores obtidos em cada ponto de coleta.

4.8 Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por meio de bolsa de pós-graduação concedida à aluna pelo Programa de Excelência Acadêmica (Código de Financiamento 88882.179989/2018-1) e com verba da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA), concedida por meio de Auxílio à Projeto de Pesquisa (1504/2017) ao orientador Prof. Dr. Geraldo Duarte.

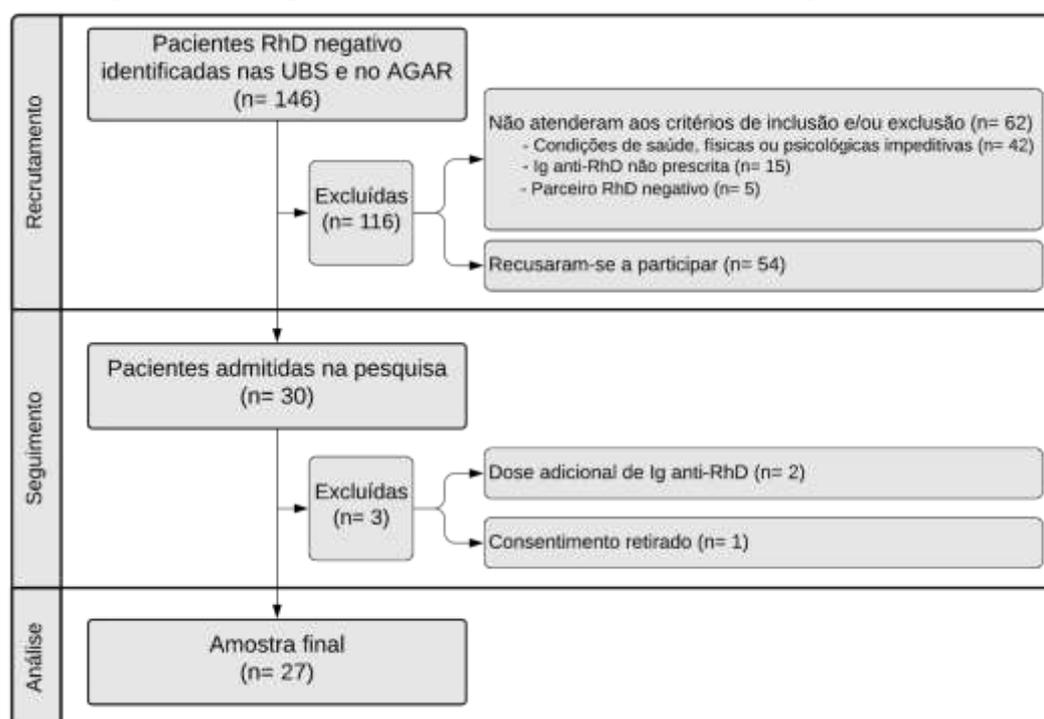
Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Características das gestantes

Foram avaliadas 27 pacientes, oriundas de sete unidades básicas de saúde, recrutadas de janeiro de 2018 a dezembro de 2019, cujo acompanhamento ocorreu na própria unidade básica de saúde com suas gestações resolvidas nas maternidades de Ribeirão Preto – SP ou as gestantes foram transferidas para a realização do pré-natal no AGAR do HC-FMRPUSP (Figura 6).

Figura 6 – Diagrama de fluxo das pacientes ao longo do estudo



Os principais dados antropométricos e gestacionais das participantes foram obtidos por meio do questionário geral (Apêndice 2) e por acesso ao prontuário eletrônico, sendo relatados na Tabela 1, sumariados por média e desvio padrão.

Tabela 1 – Informações antropométricas e gestacionais das pacientes do estudo

Parâmetros	Média (DP)
Idade materna (anos)	26.74 (5.83)
IMC (peso[kg] / altura[m] ²)	29.29 (5.15)
Histórico gestacional (número de gestações)	1.85 (1.13)
Idade gestacional na aplicação da Ig anti-RhD	29.09 (1.00)
Idade gestacional no parto	39.17 (1.53)

IMC - Índice de massa corporal; Ig anti-RhD - Imunoglobulina anti-RhD; DP – Desvio padrão

A idade das pacientes variou entre 17 e 38 anos e praticamente metade (48%) eram primigestas. Nenhuma delas possuía antecedentes transfusionais e, entre as múltiparas, nenhuma relatou histórico de aloimunização em gestações prévias.

Dentre as gestantes, duas foram consideradas de baixo peso, e quase metade estava acima do peso ideal (seis em sobrepeso e sete com obesidade), de acordo com os critérios do Ministério da Saúde,⁷⁸ disponibilizados na Tabela 2, que classifica o estado nutricional associando faixas estratificadas de IMC para cada semana de gravidez. Neste caso, foi utilizada a semana gestacional na data da aplicação da Ig anti-RhD para a definição de obesidade neste grupo de pacientes.

Tabela 2 – Critérios para obesidade segundo o índice de massa corporal por semana gestacional

Semana gestacional	Baixo peso: IMC menor do que	Adequado: IMC entre	Sobrepeso: IMC entre	Obesidade: IMC maior do que
[...]				
28	22,9	23,0 – 27,5	27,6 – 31,9	32,0
29	23,1	23,2 – 27,6	27,7 – 32,0	32,1
30	23,3	23,4 – 27,8	27,9 – 32,1	32,2
31	23,4	23,5 – 27,9	28,0 – 32,2	32,3
32	23,6	23,7 – 28,0	28,1 – 32,3	32,4
[...]				

Fonte: Adaptada de Brasil (2012, p. 75)⁷⁸

Nota: As semanas de gravidez são arredondadas pelo critério: 1, 2, 3 dias: considerado o número de semanas completas; 4, 5, 6 dias: considerada a semana seguinte.

5.2 Titulação das amostras

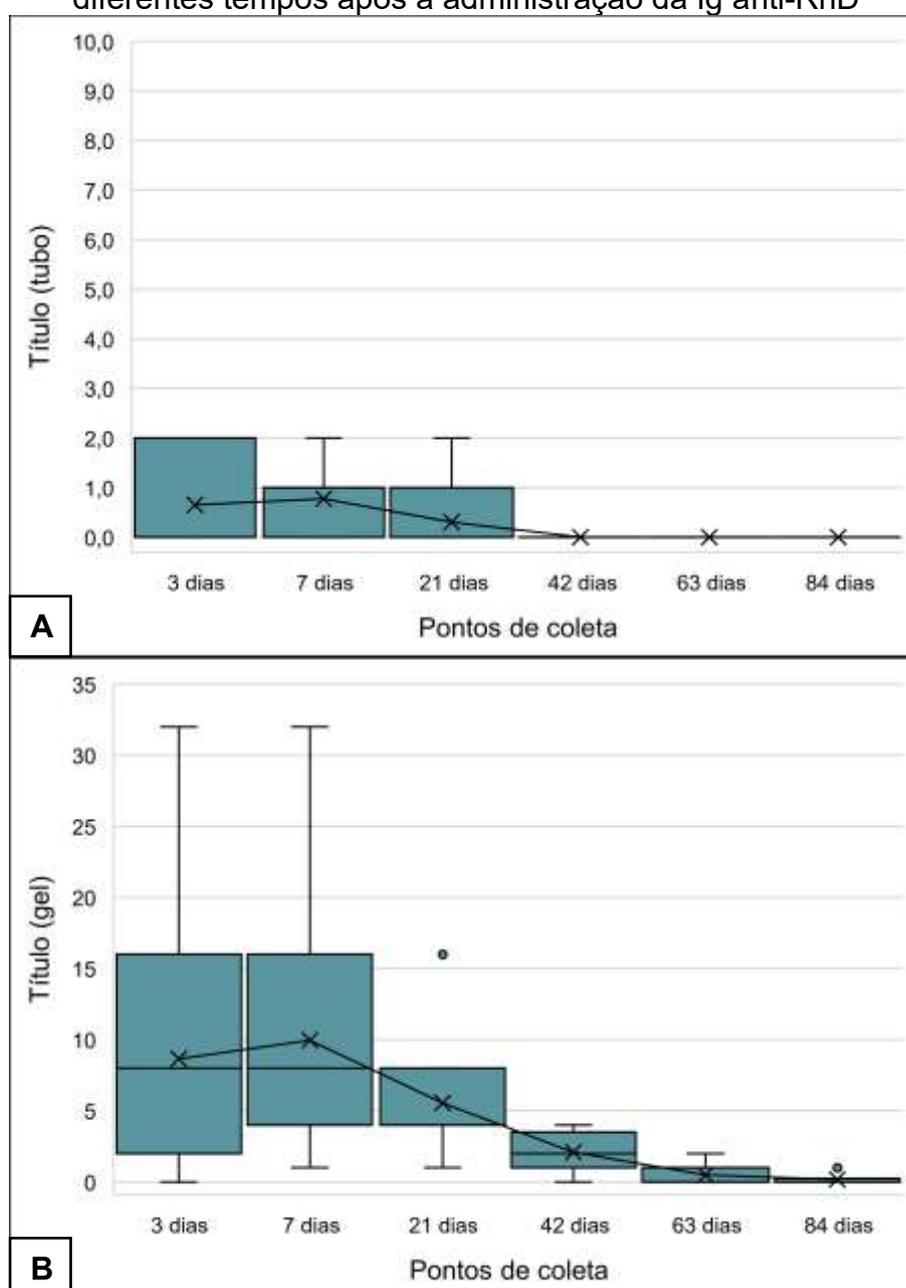
Eram previstas 162 coletas, considerando seis pontos de coleta para cada paciente, cessando no momento do parto. Seis participantes tiveram o parto em data que permitiram a realização de todos os pontos de coleta; em 14 pacientes foram realizadas coletas até 63 dias (5 pontos), em 7 pacientes até 42 dias (4 pontos) e uma paciente apenas os três primeiros pontos (21 dias). Com isso, entre as 134 amostras possíveis (já descartadas as coletas previamente agendadas cujo parto ocorreu antes), 126 foram realizadas, sendo que 81% das coletas foram feitas na data prevista, e o restante ocorreu no intervalo de -1 a +2 dias de diferença.

Para evitar viés de reprodutibilidade, ao comparar resultados de diversas titulações de uma mesma paciente foi imprescindível que todas as amostras fossem analisadas com hemácias provenientes de um mesmo doador,⁶⁸ por isso a

necessidade de que as amostras fossem congeladas e analisadas concomitantemente.

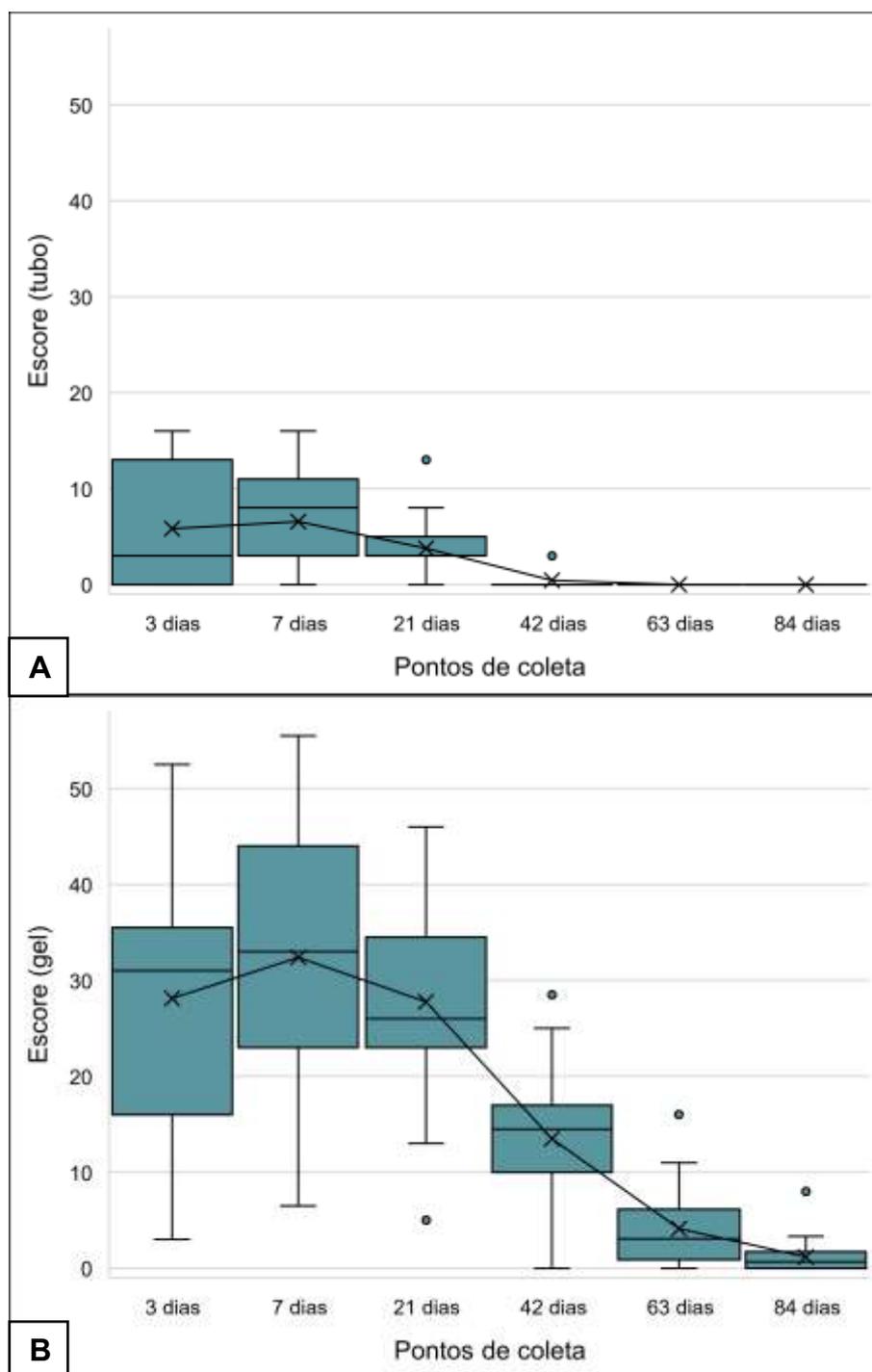
As amostras de todas as pacientes em todos os pontos de coleta foram tituladas em duplicata, pelos métodos em gel e tubo. Para cada paciente e pontos de coleta, foram realizadas as titulações por meio de diluição seriada de fator 2 e os resultados foram reportados pelo título médio (Figura 7) e pelo escore médio (Figura 8) entre as duplicatas de cada amostra.

Figura 7 – Título das análises em tubo (A) e em gel (B) das amostras coletadas em diferentes tempos após a administração da Ig anti-RhD



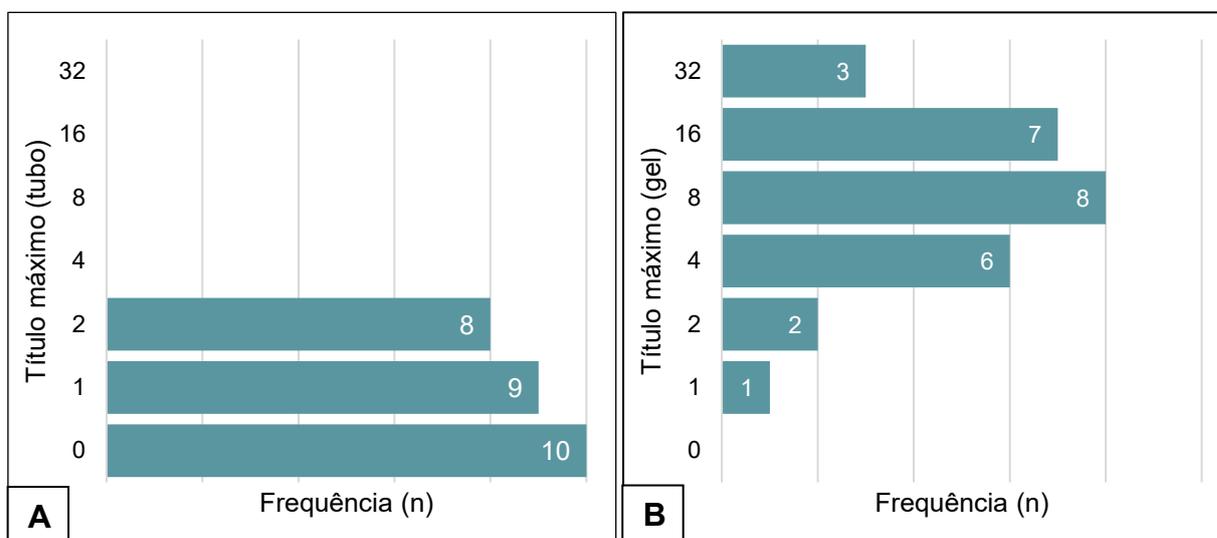
Nota: Atentar-se que os gráficos A e B estão apresentados em diferentes escalas para melhor visualização da titulação em tubo

Figura 8 – Escore das análises em tubo (A) e em gel (B) das amostras coletadas em diferentes tempos após a administração da Ig anti-RhD



Também foram descritos os títulos máximos obtidos por cada paciente ao longo dos pontos de coleta (Figura 9), evidenciando a diferença entre as pacientes e entre os métodos.

Figura 9 – Título máximo obtido ao longo dos pontos de coleta por meio da análise em tubo (A) e em gel (B)



Como esperado, utilizando avaliação estatística pela ANOVA para medidas repetidas verificou-se diferença significativa entre os escores (gel) ao longo dos seis pontos de coleta ($f 5,21=60,77, p<0,001$). Essas diferenças entre cada um dos pontos de coleta subsequentes foram determinadas por meio do teste de comparação múltipla (Tabela 3), relacionando cada um dos momentos de avaliação.

Tabela 3 – Resultados do teste de comparação múltipla com a estimativa de diferença entre as médias para os escores de pontos de coleta subsequentes

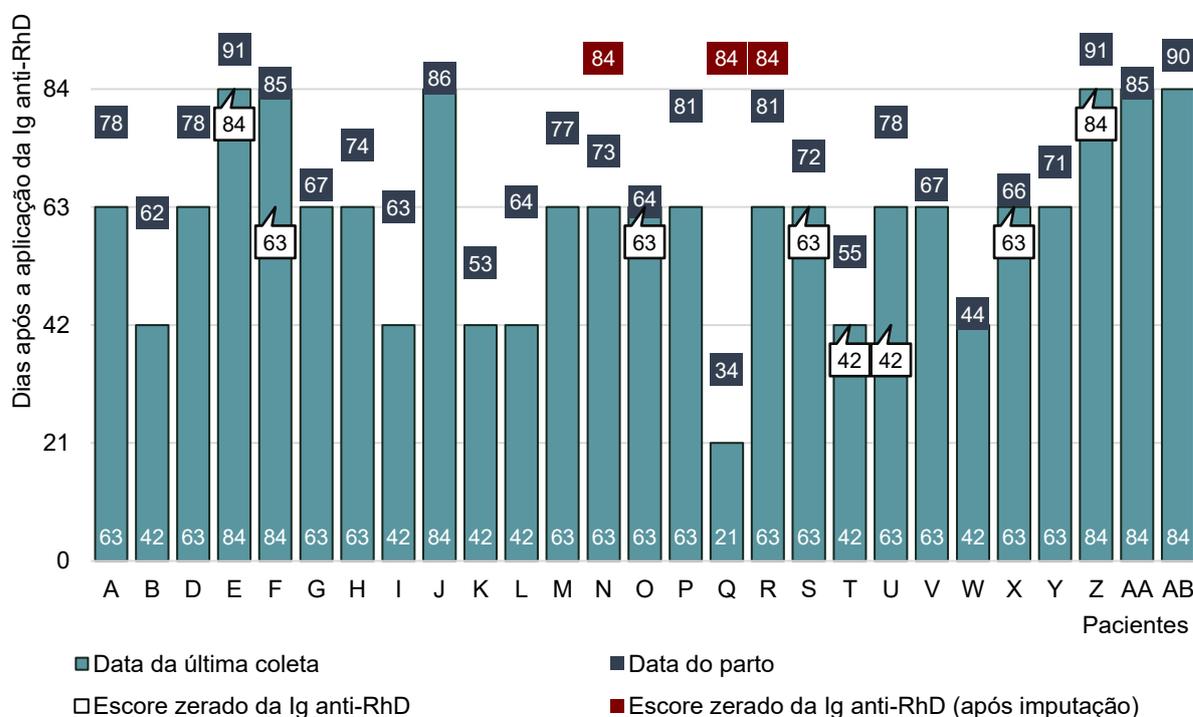
Coletas	Estimativa de diferença entre as médias	Estatística do teste Padrão	Intervalo de confiança de 95% para a diferença		<i>p</i>
			Limite inferior	Limite superior	
3 dias - 7 dias	-4,178	1,132	-7,825	-0,531	<0,05
7 dias - 21 dias	4,726	1,247	0,708	8,744	<0,05
21 dias - 42 dias	14,148	1,464	9,432	18,864	<0,001
42 dias - 63 dias	9,437	0,884	6,588	12,286	<0,001
63 dias - 84 dias	3,074	0,487	1,506	4,642	<0,001

Como relatado nos gráficos sobre o comportamento da curva de concentração da Ig anti-RhD ao longo dos pontos de coleta, com o teste de comparação múltipla foi possível verificar que entre as coletas 3 e 7 dias há uma estimativa de diferença entre as médias de -4,178 pontos, e esse valor indica que houve um aumento de cerca de 4 pontos na média dos escores da coleta 3 dias para a coleta 7 dias (dado que a

estimativa de diferença é calculada com a média 2 menos a média 1: como no exemplo calcula-se a média em 7 dias menos a média em 3 dias). A partir do ponto de coleta 7 dias, a estimativa de diferença entre as médias tem valores positivos, indicando que os escores tendem a decair a partir desse ponto, com a maior diferença ocorrendo entre as coletas de 21 e 42 dias.

Com relação à constatação da presença da Ig anti-RhD ao final da gravidez, oito gestantes não apresentaram níveis detectáveis de Ig anti-RhD pelo método em gel antes do parto. No caso da paciente U, o escore encontrava-se zerado 36 dias antes do parto. Após estimar os valores dos escores médios (por meio da imputação de dados de maximização esperada) para os pontos de coleta em que o parto ocorreu antes da data esperada de 40 semanas (ou do ponto de coleta de 84 dias), totaliza-se onze pacientes com valores indetectáveis de escore Ig anti-RhD no momento do parto, sugerindo período significativo sem cobertura profilática (Figura 10).

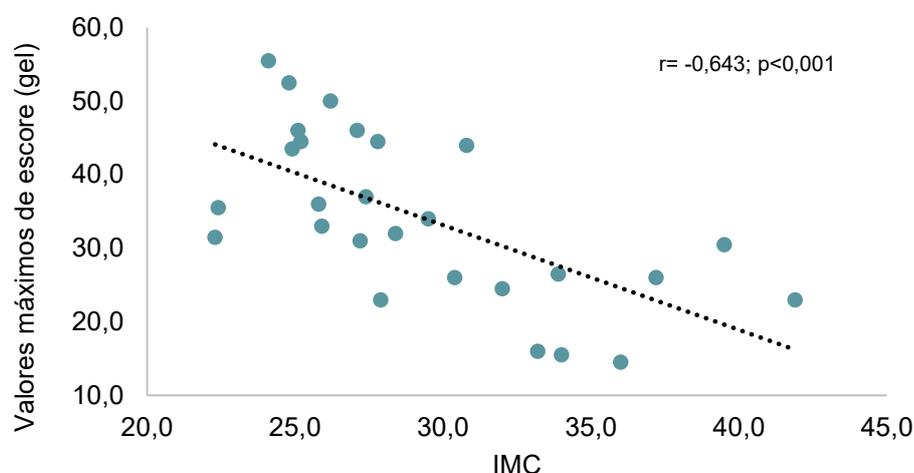
Figura 10 – Comparação entre a data da última coleta, data do parto e data em que os escores da Ig anti-RhD apresentaram-se zerados, por paciente, descritas em dias após a aplicação da Ig anti-RhD



As investigações seguintes foram realizadas comparando as variáveis com os valores máximos de escore de cada paciente resultantes do método em gel.

Observou-se uma possível correlação inversa entre o IMC e os escores máximos da Ig anti-RhD em gel, tanto ao comparar o IMC de forma isolada, medido no momento em que a gestante recebe a Ig anti-RhD ($r = -0,643$; $p < 0,001$) (Figura 11), como também ao classificar as gestantes pelo seu estado nutricional (Tabela 2), com base no IMC por idade gestacional ($r = -0,620$; $p < 0,001$). Além disso, quatro das oito pacientes com escores zerados no momento do parto eram obesas.

Figura 11 – Correlação entre os valores máximos de escore (gel) ao longo dos pontos de coleta e o IMC



5.3 Características dos neonatos

Não foi fornecida a informação da tipagem sanguínea de três dos recém-nascidos. Entre os 24 neonatos com o tipo sanguíneo identificado, 37,5% ($n=9$) eram RhD negativo. Ao comparar a tipagem sanguínea ABO da gestante e dos recém-nascidos, 13 pares mãe-neonato apresentaram grupo ABO idêntico, 4 eram ABO compatível (mãe tipo A ou B e neonato O) e 6 apresentaram incompatibilidade ABO.

Não foi detectada diferença ($p=0,479$) entre as gestantes cujos fetos eram RhD positivos e as gestantes cujos fetos eram RhD negativos, ao compará-los aos valores máximos de escore. Também não houve correlação ($p=0,483$) dos valores máximos de escore entre as gestantes cujo tipo sanguíneo ABO era incompatível com o do feto ao compará-lo com o grupo com tipagem sanguínea compatível.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A imunoprofilaxia anti-RhD pré-natal, administrada no início do terceiro trimestre, tem sido amplamente empregada no Brasil e em diversos países, aliada à aplicação pós-parto. Essas medidas reduzem a incidência da aloimunização para 0,1 a 0,3%.^{79,80} No entanto, a evolução dos títulos e escores que avaliam indiretamente a concentração da Ig anti-RhD no período entre sua administração até o parto era uma lacuna na literatura.

No presente estudo foi realizada a titulação da Ig anti-RhD e foram relatados os resultados por meio do título e do escore. A decisão de reportar os dois valores visou demonstrar a medida mais utilizada na prática clínica ao titular anticorpos (título) e a que fornece informações mais discriminadas (escore).⁷²

Além disso, a escolha entre cada um dos parâmetros (título e escore) também depende do propósito da análise. Utilizar o título é uma medida útil quando variações pequenas não são relevantes, como no acompanhamento de uma paciente aloimunizada, onde geralmente aumento de dois títulos indica maior risco, pois a mudança de apenas um título pode não ser significativa, principalmente em tubo, dado que a leitura dos resultados pode apresentar variações subjetivas.^{34,81} Nos casos em que a avaliação detalhada é imprescindível, como nesta investigação indireta da concentração da Ig anti-RhD, a análise em título não detecta diferenças nos valores observados ao longo da titulação, pois leva em consideração apenas a última diluição com reação positiva, desprezando os graus de aglutinação observados nas diluições intermediárias assim como as reações fracas após a definição do título também não são contempladas.⁷²

Com relação às participantes, todas as gestantes que fizeram parte da pesquisa receberam a Ig anti-RhD no período preconizado pelo Ministério da Saúde,⁴⁸ que recomenda o uso na 28ª semana, e se necessário, aplicar até a 34ª semana de gravidez, sendo que 81% delas receberam a Ig anti-RhD antes de completarem a 30ª semana de gravidez, e o período mais longo para o recebimento foi de 31 semanas e 4 dias de gravidez.

Relevante destacar, no entanto, que durante o recrutamento das pacientes, após convite inicial para participação no estudo, 15 gestantes não puderam ser incluídas no estudo por não terem recebido a Ig anti-RhD. Entre os motivos observados, destaca-se a ausência dos exames necessários para a realização da Ig

anti-RhD; gestantes que não receberam a Ig anti-RhD, mesmo tendo sido prescrita (por decisão própria ou por falta de Ig anti-RhD no local de dispensação do município); e prescrição não realizada pelo médico, mesmo com os resultados dos exames essenciais disponíveis.

Essas circunstâncias expõem lacunas na profilaxia da doença hemolítica do feto e do recém-nascido, que deveriam ser evitadas ao máximo, haja vista que a Ig anti-RhD já está inclusa no rol de medicamentos distribuídos gratuitamente pelo SUS exatamente para prover acesso a todas as pacientes que a demandarem. Além de problemas no acesso à Ig anti-RhD, prover conhecimentos para as gestantes sobre a relevância da imunoprofilaxia na prevenção da doença hemolítica do feto e do recém-nascido também poderia melhorar as taxas de aplicação da Ig anti-RhD.⁸²

Impasses na administração da Ig anti-RhD também foram relatados em estudo publicado recentemente por Pegoraro et al.,³⁰ no qual estimaram que, mundialmente, em média 50% das gestantes que necessitam da imunoprofilaxia anti-RhD pré e pós-natal não a recebem, principalmente pela indisponibilidade da Ig, dificuldade de acesso e falta de conscientização quanto à relevância da Ig anti-RhD.

Diante desses relatos de redução significativa das ações de prevenção da doença hemolítica do feto e do recém-nascido, sugere-se estudo que avalie o percentual de gestantes RhD negativo e RhD variantes com iminente risco de aloimunização que efetivamente recebem a Ig anti-RhD em nosso país, visando identificar os motivos pelos quais a Ig anti-RhD não foi administrada, em busca de melhor gerenciamento do processo para prevenção da doença em futuras gestações.

Os resultados de titulações da Ig anti-RhD pelos métodos em tubo e em gel estão concordância com estudos de farmacocinética da Ig anti-RhD, que relatam as maiores concentrações em 3 a 10 dias após sua aplicação.^{54,63,64,83} Como nosso interesse principal era na investigação da duração de níveis profiláticos mensuráveis de anti-D próximo ao parto, o intervalo de amostragem não foi definido com o propósito de detectar o dia exato das concentrações plasmáticas máximas, mas o período em que esse pico seria observado (Figura 7 e Figura 8).

Importante destacar a amplitude e divergência entre amostras de diferentes gestantes em um mesmo ponto de coleta, principalmente na análise em gel, como por exemplo no tempo 3 dias, no qual foi observada uma amplitude de 49,5 nos escores, que variaram de 3 a 52,5. Grandes discrepâncias entre as pacientes também foram

relatadas por Tiblad et al.,⁶³ que observaram concentrações máximas variando de 9 a 58 ng/mL pela quantificação da Ig anti-RhD por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo também é um dos métodos utilizados para quantificar diretamente anticorpos anti-RhD. Comparada à titulação manual pelos métodos em gel e tubo, a análise por citometria de fluxo apresenta acurácia, precisão, sensibilidade e reprodutibilidade mais elevadas.^{65,84,85} Outra vantagem é que apenas a classe IgG da Ig anti-RhD é detectada, ao contrário de outros métodos que reconhecem também a classe IgM.^{29,63,85} Infelizmente, não é uma técnica acessível aos padrões da assistência pré-natal em nosso país.

O manejo de uma possível doença hemolítica do feto e do recém-nascido inicia-se na constatação da aloimunização durante a gravidez por meio da PAI. No entanto, a recomendação internacional de investigação da aloimunização materna em todas as gestantes, independentemente do tipo sanguíneo RhD, não ocorre nos protocolos brasileiros e sequer na prática clínica. Na maioria dos casos, a PAI é solicitada exclusivamente para as gestantes que possuem tipo sanguíneo RhD negativo, conforme está explicitamente descrito em recomendações do Ministério da Saúde⁷⁸ e da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo,⁴⁹ assim como observado durante a revisão dos prontuários eletrônicos no rastreio das pacientes elegíveis.

Realizar a PAI exclusivamente em gestantes RhD negativo limita a possibilidade de identificar uma aloimunização potencial por outros anticorpos anti-Rh e de outros sistemas sanguíneos de relevância clínica perinatal. Nos casos de limitação econômica para a realização da PAI para todas as pacientes, independentemente do tipo sanguíneo RhD, sugere-se que ao menos as gestantes com histórico de potencial de aloimunização (como pacientes com transfusões sanguíneas anteriores e perdas gestacionais recorrentes) deveriam ter a realização de ao menos uma PAI.⁸⁶

Diante de uma PAI positiva, realiza-se a identificação e a titulação do anticorpo. Nas titulações em tubo e em gel de anticorpos anti-RhD gerados por aloimunização observa-se valores geralmente equivalentes ou com títulos mais altos em gel, com diferença de uma a duas diluições.^{87,88} Ao se realizar a titulação dos anticorpos pertencentes à Ig anti-RhD, no entanto, a disparidade constatada entre os títulos obtidos pelos dois métodos foi maior que o normalmente relatado, sendo que em alguns casos foi observada diferença de quatro diluições entre os métodos (tubo= 2 e gel= 32). Altas discrepâncias entre os métodos também já foram relatadas por outros

autores ao titularem amostras de pacientes aloimunizados, como demonstrado por Krishnan et al.,³⁴ que observaram diferença média de três diluições a mais em gel, e Novaretti et al.,⁸⁹ que detectaram em todas as 79 amostras analisadas divergências de três a oito diluições maiores em gel que em tubo.

Apesar de não ser possível diferenciar por meio dos métodos em gel e em tubo que tipo de anticorpo está sendo titulado (se proveniente de profilaxia pela Ig anti-RhD ou se devido à aloimunização da gestante),⁷⁴ os resultados deste estudo podem ser úteis para corroborar esse discernimento.

Há uma série de medidas detalhadas a serem tomadas na distinção entre o tipo de Ig, como a estratégia proposta pela Sociedade Britânica de Hematologia,³⁸ porém utilizam a quantificação por meio de métodos não acessíveis para o SUS, como a análise de fluxo contínuo, o que dificulta o seguimento do protocolo.

Com isso, a tentativa de discriminar entre imunização passiva ou imune seria facilitada com o uso de técnicas mais acessíveis como titulação em tubo ou em gel. Ao analisar o título obtido em nossas amostras pelo método em tubo (o mais utilizado nas investigações laboratoriais), observa-se valor máximo 2, com grande quantidade de pacientes com títulos 1 ou 0; e quando medidos por meio do gel, o título máximo foi 32, também com grande dispersão desse valor máximo entre as gestantes. Todavia, quando é realizada a titulação de pacientes aloimunizadas, os títulos obtidos em tubo e em gel são geralmente mais elevados, ou ainda, nos casos de títulos menores que 16 a 32 habitualmente não são correlacionados a desfechos perinatais adversos, demandando supervisão da gestante, mas menos obrigatoriedade de realizar a distinção entre aloimunização e Ig anti-RhD.³⁴

Crítérios como esses não discriminam o tipo de anticorpo dosado, pois não é possível excluir que uma gestante aloimunizada apresente títulos baixos devido à série de fatores que culminam em aloimunização (como o potencial de resposta imunológica e a quantidade de antígeno em contato, por exemplo).⁷⁴ Por outro lado, nos casos de títulos acima de 64 em gel, é grande a probabilidade de se tratar de anticorpo produzido pela gestante, considerando que nenhuma das amostras de Ig anti-RhD analisadas atingiu esse patamar (máximo observado neste estudo foi de 32). Quando a titulação é feita em tubo, é indispensável uma análise detalhada do método, considerando que há uma diversidade de protocolos para uso em tubo, que podem dificultar o critério para distinção, sendo normalmente considerado como título crítico o valor de 16 (nível também não atingido na titulação da Ig anti-RhD).⁸¹

Outro ponto importante é realizar o acompanhamento dos títulos ao longo da gravidez, analisando novamente a amostra após três a quatro semanas (sempre que possível em paralelo com a amostra anterior), pois, caso o anticorpo da amostra seja profilático, é provável que o título tenha decaído, como demonstrado. Quando a amostra é de uma aloimunização, nesse período é esperado que o título da amostra tenha aumentado após o contato com o antígeno.⁷⁴

Ao analisar a duração dos títulos e escores da Ig anti-RhD, foi observado que onze pacientes (40%) não apresentaram escores detectáveis no momento do parto ou após 12 semanas da aplicação da Ig anti-RhD (ponto de 84 dias), para os casos em que foi realizada predição dos valores quando o parto ocorreu antes. No entanto, se considerarmos como indetectáveis os valores de escore menores que 3 (que é o menor valor de aglutinação observável: uma única reação fraca na amostra pura), apenas três pacientes (11%) apresentariam escores detectáveis após 12 semanas da aplicação da Ig anti-RhD.

Dados similares foram observados em estudo realizado por MacKenzie et al.,⁶⁴ que avaliou de forma seriada 43 gestantes RhD negativo pelo método de análise de fluxo contínuo da concentração da Ig anti-RhD após a aplicação de duas doses de 100 µg de Ig anti-RhD, respectivamente nas semanas 28 e 34 da gravidez. Das 17 gestantes que tiveram o parto com 40 semanas de gravidez, cerca de um terço delas (n=6) não apresentou valores detectáveis. Importante destacar que a dosagem utilizada foi 200 µg total, mas com esquema de duas doses.

Diferentemente dos resultados mostrados, pesquisa realizada por Tiblad et al.,⁶³ uma dose de 250 µg de Ig anti-RhD foi aplicada em mulheres com idade gestacional média de 29,39 semanas e os autores observaram que 9 das 12 gestantes (75%) ainda apresentariam níveis detectáveis de Ig anti-RhD na 40ª semana de gravidez, considerando projeções estatísticas, se o parto não tivesse ocorrido antes.

Em 1982, Eklund et al.⁶² também observaram valores de concentração da Ig anti-RhD de pelo menos 1,0 ng/mL no momento do parto (medidos por meio de analisador de fluxo contínuo), após uma dose de 250 µg de Ig anti-RhD pré-natal. Ainda assim, os autores salientaram que com a imunoprofilaxia de 250 µg poderão ocorrer casos ocasionais de imunização durante a gravidez, devido às amplas variações individuais.

Após o conhecimento fornecido por esta pesquisa, de que há uma porcentagem considerável de parturientes com escores zerados no momento do parto em nossa

população, nossa recomendação visa a análise em estudos futuros desse impacto nos desfechos perinatais. Considerando que esse não foi nosso objetivo, pois demandariam recursos além dos disponíveis para a realização de um estudo de mestrado, sugerimos a investigação se neonatos cujas mães tiveram escores zerados antes do momento do parto apresentariam sinais e sintomas relacionados à doença hemolítica do feto e do recém-nascido ou se os fetos/neonatos estão protegidos apesar de serem encontrados valores zerados de escore no momento do parto. Desse modo, serão necessários novos estudos para definir se seria necessária dose maior que 300 µg de Ig anti-RhD ou ainda alterar o protocolo para duas doses (1ª dose com 28 semanas e 2ª dose com 34 semanas), aos moldes do que é utilizado no Canadá e Reino Unido.^{51,52}

Comparando os escores máximos obtidos pelo método em gel e o IMC das gestantes, verificou-se uma possível correlação inversa entre aumento de peso e redução dos níveis máximos de concentração da Ig anti-RhD. Estudos com a administração pré-natal⁵⁴ e pós-parto⁹⁰ da Ig anti-RhD também demonstraram relação entre concentrações mais baixas da Ig em pacientes com IMC elevado (> 28 a 30, a depender da idade gestacional).

Em 2006, MacKenzie et al.⁶⁴ também verificaram uma expressiva correlação inversa entre a superfície corporal e o valor máximo de concentração da Ig anti-RhD (maiores picos de concentração da imunoglobulina foram encontrados nas gestantes com superfícies corporais menores), correlação também vista com o peso. O mesmo não ocorreu entre a superfície corporal e a persistência da Ig anti-RhD, pois a imunoglobulina ainda foi detectada após 12 semanas em cerca de metade das gestantes com diferentes áreas de superfície corporal.

No presente estudo, quando analisada a concentração máxima indireta obtida dos escores em gel não foi observada diferença entre as mulheres que gestaram fetos RhD positivos e as gestantes cujos fetos eram RhD negativos. Dados semelhantes foram descritos em pesquisa realizada por Eklund et al.,⁶² a qual também demonstrou que não foi observada diferença significativa entre esses grupos tanto em relação à concentração máxima da Ig anti-RhD quanto em relação ao número médio de dias após a aplicação da Ig anti-RhD que os valores não eram mais detectáveis. A meia vida da Ig anti-RhD também não apresentou diferença entre os dois grupos no estudo de Bichler et al.⁵⁴

Apesar dos resultados gerais observados por Eklund et al.,⁶² esses pesquisadores sugeriram que uma das pacientes que apresentou concentrações muito inferiores ao restante do grupo que havia gestado feto RhD positivo, se justificaria por possível consumo da Ig anti-RhD por opsonização dos eritrócitos fetais originados de uma HFM. Essa suposição, apesar de não investigada, poderia explicar alguns resultados também mais baixos de escores em gestantes com fetos RhD positivos em nosso estudo. Considerando que a HFM não transcorre em todas as gestações, logo, nem todos os casos de fetos RhD positivo acarretariam dispêndio da Ig anti-RhD e, conseqüentemente, não apresentariam valores mais baixos de escore, por isso a média entre os dois grupos seria similar como foi observada.

Outra possível correlação analisada de que a incompatibilidade do tipo sanguíneo ABO entre gestante e feto poderia resultar em maiores escores da Ig anti-RhD também não foi observada, assim como relatado por MacKenzie et al.⁶⁴ A hipótese baseava-se na proteção parcial contra aloimunização RhD oferecida pela incompatibilidade ABO, em que seria gasto menor quantidade de Ig anti-RhD apenas para sensibilizar os eritrócitos fetais que atingissem a corrente sanguínea materna e não tivessem sido destruídos por meio da sensibilização pelos anticorpos ABO. Considerando essa hipótese verdadeira, a ausência dessa correlação poderia ser justificada também devido à HFM não ocorrer de modo significativo em todas as gestações.

Também com relação ao grupo sanguíneo, observou-se que mais de um terço das pacientes estudadas gestaram fetos RhD negativo. Nesses casos, a aplicação da Ig anti-RhD não se faz necessária, pois não haverá possibilidade de sensibilização materna pelo antígeno RhD fetal, submetendo a gestante a um hemoderivado e seus ínfimos riscos de modo desnecessário, além do custo dispensável da aplicação Ig anti-RhD.³⁹

O diagnóstico do tipo sanguíneo fetal por meio de métodos não invasivos poderia ser uma solução para evitar o uso desnecessário da Ig anti-RhD. Segundo publicação do Instituto Nacional para Saúde e Excelência Clínica – Reino Unido (NICE) em 2016, a possibilidade de saber previamente se o feto é RhD positivo ou negativo pode indicar a necessidade da profilaxia da isoimunização pelo antígeno RhD com extrema assertividade.⁹¹ Estes testes se baseiam na presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) fetal na circulação materna e permitem caracterizar com

segurança a tipagem sanguínea fetal quanto ao antígeno RhD, promovendo a indicação de uso da Ig anti-RhD apenas para gestantes com fetos RhD positivos.⁹²

Estudos brasileiros já indicaram que a genotipagem do antígeno RhD fetal é adequada para aplicação clínica em nossa população,^{93,94} assim como relatado em pesquisas internacionais, que avaliaram diversas estratégias, sua implementação e qualidade.^{79,95-97}

Infelizmente, a tipagem sanguínea fetal não invasiva não é prática rotineira devido ao seu “custo elevado”. Ainda assim, pesquisa de custo-efetividade realizada na França⁹⁸ indicou que a substituição do fornecimento da Ig anti-RhD em gestantes com fetos RhD negativo pela testagem pré-natal não invasiva, apesar de, em sua análise, não reduzir custos, traz expressivos benefícios para o cuidado perinatal. Todavia, uma tese realizada no estado de Minas Gerais⁹⁹ indicou redução significativa de custos com a implementação da genotipagem do antígeno RhD fetal, além dos benefícios assistenciais gerados. Com isso, é considerável a realização de mais estudos financeiros e assistenciais para investigar se o custo da aplicação da Ig anti-RhD supera a utilização do diagnóstico do antígeno RhD fetal, visto que a imunoglobulina é fornecida pelo SUS.

Outra medida na tentativa de diminuir o uso prescindível de um hemoderivado é a busca pelo desenvolvimento de Ig anti-RhD recombinante^{100,101} como substituto para a Ig anti-RhD atualmente produzida com base em plasma humano, que, apesar de toda segurança amplamente comprovada, não extingue os mínimos riscos inerentes do uso de um hemoderivado.³⁹ Além disso, a disponibilidade de plasma humano com altos títulos do anticorpo para a produção da Ig anti-RhD é assunto pertinente, considerando que muitos países precisam importar plasma para este procedimento.^{96,102}

O diagnóstico do antígeno RhD fetal e administração da Ig anti-RhD recombinante resultariam em redução objetiva de custos, permitindo que a profilaxia possa ser oferecida a um maior número de gestantes, inclusive apenas àquelas que realmente necessitam. No entanto, até que estas técnicas possam ser oferecidas de forma universal em nosso país, a profilaxia da isoimunização administrando a imunoglobulina anti-RhD a todas as gestantes RhD negativo com parceiro RhD positivo ou desconhecido ainda continua a ser o padrão ouro de assistência para este quesito.^{61,91}

Aspectos relevantes e limitantes do estudo

7 ASPECTOS RELEVANTES E LIMITANTES DO ESTUDO

Analisando o projeto e os resultados do presente estudo foi possível descrever suas potencialidades e limitações. Uma análise crítica sobre estes aspectos pode orientar o delineamento de futuras pesquisas sobre o assunto.

7.1 Aspectos relevantes

Uma das contribuições positivas deste estudo foi a demonstração dos resultados por meio tanto dos títulos como dos escores da Ig anti-RhD. Este é um diferencial, considerando que muitos estudos utilizam apenas um deles. Ter acesso às duas informações possibilita ao leitor a escolha de qual critério é mais útil de acordo com seus recursos e interesses.

Adicionalmente, a realização da análise concomitante de todas as amostras de uma mesma paciente foi essencial para evitar o viés de variação dos escores que pudesse ser causado por hemácias provenientes de diferentes doadores.

7.2 Aspectos limitantes

Um dos pontos limitantes do estudo foi a amostragem por conveniência, que visou a facilidade de acesso das pacientes ao HC-FMRPUSP. Apesar de contar com amostra bem diversificada de pacientes, isto pode restringir a extrapolação dos resultados.

Outro aspecto foi a inviabilidade do acompanhamento dos neonatos na investigação dos possíveis efeitos relacionados à doença hemolítica do feto e do recém-nascido. Esta análise demandaria acessibilidade, tempo e recursos além dos disponíveis, visto que os partos foram realizados em diferentes maternidades do município em virtude de serem gestações de baixo risco, não exigindo sua transferência para o HC-FMRPUSP, onde são atendidas apenas gestantes de alto risco materno e/ou perinatal. Caso esse acompanhamento tivesse sido realizado, seria possível deliberar com maior assertividade sobre o atual protocolo de utilização de 300 µg de Ig anti-RhD pré-natal ou as modificações necessárias.

Finalmente, as dificuldades laboratoriais que impediram a aferição da concentração da Ig anti-RhD com o uso da citometria de fluxo representaram uma grande limitação para o resultado desejado, sendo uma variável que demandará estudos posteriores para sua correta determinação.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, é possível concluir:

Sobre a variação da concentração da Ig anti-RhD:

- Mais da metade das pacientes não apresentaram escores detectáveis da Ig anti-RhD no momento do parto, evidenciando período de potencial cobertura profilática insuficiente para a isoimunização RhD;

Sobre a comparação entre as titulações pelos métodos em tubo e em gel:

- O método em tubo não é aconselhável para investigação da duração da Ig anti-RhD, visto que em 42 dias após a aplicação da Ig anti-RhD pré-natal todos as pacientes já apresentaram títulos zerados, quando o mesmo não ocorreu em gel, sendo detectados em até 84 dias.

Sobre a correlação da Ig anti-RhD com as variáveis investigadas:

- Gestantes em sobrepeso/obesidade podem apresentar menores concentrações da Ig anti-RhD, sugerindo necessidade de estudos complementares para elucidação definitiva;
- Não foram constatadas relações entre os escores máximos ao compará-los com as variáveis tipo sanguíneo RhD do neonato e a incompatibilidade ABO materno-neonatal.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA*

- 1 ZIMRING, J. C. et al. Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. **Transfusion**. v. 51, n. 2, p. 435-441, 2011. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.03024.x
- 2 STORRY, J. R. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. **Vox Sang**. v. 114, n. 1, p. 95-102, 2019. doi:10.1111/vox.12717
- 3 CAMPOS, F. C. A. et al. Variant RhD types in brazilians with discrepancies in RhD typing. **J. Clin. Lab. Anal.** v. 30, n. 6, p. 845-848, 2016. doi:10.1002/jcla.21946
- 4 DANIELS, G. Variants of RhD - current testing and clinical consequences. **Br. J. Haematol.** v. 161, n. 4, p. 461-470, 2013. doi:10.1111/bjh.12275
- 5 CRUZ-LEAL, Y.; MARJORAM, D.; LAZARUS, A. H. Prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn: what have we learned from animal models? **Curr. Opin. Hematol.** v. 24, n. 6, p. 536-543, 2017. doi:10.1097/MOH.0000000000000374
- 6 SIMON, T. L. et al. **Rossi's Principles of Transfusion Medicine**. 5. ed. Wiley-Blackwell. 2016.
- 7 LUBUSKY, M. Prevention of RhD alloimmunization in RhD negative women. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.** v. 154, n. 1, p. 3-7, 2010. doi:10.5507/bp.2010.003
- 8 AL-DUGHAIHI, T. et al. Red cell alloimmunization to Rhesus antigen among pregnant women attending a tertiary care hospital in Oman. **Oman Med. J.** v. 31, n. 1, p. 73-76, 2016. doi:10.5001/omj.2016.15
- 9 WYLIE, B. J.; D'ALTON, M. E. Fetomaternal hemorrhage. **Obstet. Gynecol.** v. 115, n. 5, p. 1039-1051, 2010. doi:10.1097/AOG.0b013e3181da7929
- 10 LIUMBRUNO, G. M. et al. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. **Blood Transfus.** v. 8, n. 1, p. 8-16, 2010. doi:10.2450/2009.0108-09
- 11 EL DIN, S. M. N.; ARAMY, A. R. M.; ALI, M. S. Correlation between the RhD genotyping and RhD serotyping in isoimmunized pregnancies. **Egypt. J. Med. Hum. Genet.** v. 12, n. 2, p. 127-133, 2011. doi:10.1016/j.ejmhg.2011.06.005
- 12 CACCIATORE, A. et al. Obstetric management in RhD alloimmunized pregnancy. **J. Prenat. Med.** v. 3, n. 2, p. 25-27, 2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439037>.
- 13 STOCKMAN III, J. A. Overview of the state of the art of Rh disease: history, current clinical management, and recent progress. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.** v. 23, n. 8, p. 554-562, 2001. doi:10.1097/00043426-200111000-00018
- 14 KUMPEL, B. M. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. **Transfusion**. v. 46, n. 9, p. 1652-1656, 2006. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00924_1.x
- 15 AL-SWAF, F. B.; JUMAA, R. S.; SAEED, I. S. Hemolytic disease of newborn due to ABO incompatibility. **Tikrit Med. J.** v. 15, n. 2, p. 70-78, 2009. doi:10.1001/archpedi.1953.02050070672004
- 16 HARMENING, D. **Modern blood banking and transfusion practices**. 7. ed. HARMENING, D. (Ed.). Philadelphia: F. A. Davis Company. 2019.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- 17 FASANO, R. M.; HENDRICKSON, J. E.; LUBAN, N. L. C. Alloimmune hemolytic disease of the fetus and newborn. In: KAUSHANSKY, K. et al. (Ed.). **Williams Hematology**. 9. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2016. cap. 55. p. 847-861.
- 18 ZWIERS, C. et al. ABO incompatibility and RhIG immunoprophylaxis protect against non-D alloimmunization by pregnancy. **Transfusion**. v. 58, n. 7, p. 1611-1617, 2018. doi:10.1111/trf.14606
- 19 MINUK, L.; CLARKE, G.; LIEBERMAN, L. Approach to red blood cell antibody testing during pregnancy: Answers to commonly asked questions. **Can. Fam. Physician**. v. 66, n. 7, p. 491-498, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32675093>. Accessed July 23, 2020.
- 20 PANDEY, H.; DAS, S. S.; CHAUDHARY, R. Red cell alloimmunization in transfused patients: a silent epidemic revisited. **Asian J. Transfus. Sci**. v. 8, n. 2, p. 75-77, 2014. doi:10.4103/0973-6247.137433
- 21 URBANIAK, S. J. Alloimmunity to RhD in humans. **Transfus. Clin. Biol**. v. 13, n. 1-2, p. 19-22, 2006. doi:10.1016/j.tracbi.2006.02.020
- 22 VALENTE, M. E. R. F. Avaliação do impacto da determinação do grupo fetal RhD na profilaxia da aloimunização na gravidez. 2009.
- 23 AGARWAL, K.; RANA, A.; RAVI, A. K. Treatment and Prevention of Rh Isoimmunization. **J. Fetal Med**. v. 1, n. 2, p. 81-88, 2014. doi:10.1007/s40556-014-0013-z
- 24 SALHAN, S. Isoimmunisation and other autoimmune disorders in pregnancy. In: SALHAN, S. (Ed.). **Textbook of Obstetrics**. 1. ed. Nel Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2007. cap. 26. p. 228-242.
- 25 BENNARDELLO, F. et al. Recommendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. **Blood Transfus**. v. 13, n. 1, p. 109-134, 2015. doi:10.2450/2014.0119-14
- 26 NEAL, J. L. RhD Isoimmunization and Current Management Modalities. **J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs**. v. 30, n. 6, p. 589-606, 2001. doi:10.1111/j.1552-6909.2001.tb00006.x
- 27 HALL, V.; AVULAKUNTA, I. D. **Hemolytic diseases of the newborn**. 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491355>.
- 28 DEAN, L. Hemolytic disease of the newborn. In: DEAN, L. (Ed.). **Blood Groups and Red Cell Antigens**. 1. ed. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005. cap. 4. p. 25-30., 2005. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- 29 AUSTIN, E. B. B.; MCINTOSH, Y. Anti-D quantification by flow cytometry: a comparison of five methods. **Transfusion**. v. 40, n. 1, p. 77-83, 2000. doi:10.1046/j.1537-2995.2000.40010077.x
- 30 PEGORARO, V. et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to Rh(D) incompatibility: A preventable disease that still produces significant morbidity and mortality in children. OEI, J. L. (Ed.). . **PLoS One**. v. 15, n. 7, p. e0235807, 2020. doi:10.1371/journal.pone.0235807
- 31 URBANIAK, S. J.; GREISS, M. A. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. **Blood Rev**. v. 14, n. 1, p. 44-61, 2000. doi:10.1054/blre.1999.0123
- 32 MOISE, K. J. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. **Obstet. Gynecol**. v. 112, n. 1, p. 164-176, 2008. doi:10.1016/S0029-7844(02)02180-4
- 33 SNYDER, E. L.; SPIVACK, M. Clinical and serologic management of patients with methyldopa-induced positive antiglobulin tests. **Transfusion**. v. 19, n. 3, p. 313-316, 1979. doi:10.1046/j.1537-2995.1979.19379204213.x

- 34 KRISHNAN, V. et al. Defining critical antibody titre in column agglutination method to guide fetal surveillance. **Transfus. Apher. Sci.** v. 59, n. 3, p. 102732, 2020. doi:10.1016/j.transci.2020.102732
- 35 GARG, S. et al. Comparison of micro column technology with conventional tube methods for antibody detection. **J. Lab. Physicians.** v. 9, n. 02, p. 095-099, 2017. doi:10.4103/0974-2727.199627
- 36 GHESQUIÈRE, L. et al. Management of red blood cell alloimmunization in pregnancy. **J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.** v. 47, n. 5, p. 197-204, 2018. doi:10.1016/j.jogoh.2018.02.001
- 37 AGRAWAL, A.; HUSSAIN, K. S.; KUMAR, A. Minor blood group incompatibility due to blood groups other than Rh(D) leading to hemolytic disease of fetus and newborn: a need for routine antibody screening during pregnancy. **Intractable Rare Dis. Res.** v. 9, n. 1, p. 43-47, 2020. doi:10.5582/irdr.2019.01094
- 38 WHITE, J. et al. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. **Transfus. Med.** v. 26, n. 4, p. 246-263, 2016. doi:10.1111/tme.12299
- 39 GUIVER, J.; WRIGHT, G. Routine antenatal management later in pregnancy. **Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.** v. 29, n. 6, p. 164-169, 2019. doi:10.1016/j.ogrm.2019.03.003
- 40 FINN, R. et al. Experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. **Br. Med. J.** v. 1, n. 5238, p. 1486-1490, 1961. doi:10.1136/bmj.1.5336.979
- 41 FUNG, K. F. K. et al. Prevention of Rh Alloimmunization. **J. Obstet. Gynaecol. Canada.** v. 25, n. 9, p. 765-773, 2003. doi:10.1016/S1701-2163(16)31006-4
- 42 TIBLAD, E. et al. Targeted routine antenatal anti-D prophylaxis in the prevention of RhD immunisation - outcome of a new antenatal screening and prevention program. **PLoS One.** v. 8, n. 8, p. 1-7, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0070984
- 43 HAMILTON, E. G. Prevention of Rh isoimmunization by injection of anti-D antibody. **Obstet. Gynecol.** v. 30, n. 6, p. 812-815, 1967. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6061830>.
- 44 ZIPURSKY, A. The universal prevention of Rh immunization. **Clin. Obstet. Gynecol.** v. 14, n. 3, p. 869-884, 1971. doi:10.1097/00003081-197109000-00013
- 45 BOWMAN, J. M.; POLLOCK, J. M.; PENSTON, L. E. Fetomaternal Transplacental Hemorrhage during Pregnancy and after Delivery. **Vox Sang.** v. 51, n. 2, p. 117-121, 1986. doi:10.1111/j.1423-0410.1986.tb00226.x
- 46 ZIPURSKY, A.; ISRAELS, L. G. The pathogenesis and prevention of Rh immunization. **Can. Med. Assoc. J.** v. 97, n. 21, p. 1245-1257, 1967. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4168032>.
- 47 BOWMAN, J. M. et al. Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis. **Can. Med. Assoc. J.** v. 118, n. 6, p. 623-627, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/77714>.
- 48 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE AÇÕES PROGRAMÁTICAS ESTRATÉGICAS. **Gestação de alto risco: manual técnico.** 5. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2010.
- 49 SÃO PAULO (ESTADO). SECRETARIA DA SAÚDE. COORDENADORIA DE PLANEJAMENTO EM SAÚDE. ACESSORIA TÉCNICA EM SAÚDE DA MULHER. **Atenção à gestante e à puérpera no SUS-SP: manual técnico do pré natal e puerpério.** São Paulo. 2010.
- 50 AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS

- (ACOG). Practice Bulletin n. 181 - Prevention of Rh D Alloimmunization. **Obstet. Gynecol.** v. 130, n. 2, p. e57-e70, 2017. doi:10.1097/AOG.0000000000002232
- 51 FUNG, K. F. K.; EASON, E. No. 133-Prevention of Rh Alloimmunization. **J. Obstet. Gynaecol. Canada.** v. 40, n. 1, p. e1-e10, 2018. doi:10.1016/j.jogc.2017.11.007
- 52 QURESHI, H. et al. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. **Transfus. Med.** v. 24, n. 1, p. 8-20, 2014. doi:10.1111/tme.12091
- 53 OKWUNDU, C. I.; AFOLABI, B. B. Intramuscular versus intravenous anti-D for preventing Rhesus alloimmunization during pregnancy. **Cochrane Database Syst. Rev.** v. 1, n. 1, p. 1-13, 2013. doi:10.1002/14651858.CD007885
- 54 BICHLER, J. et al. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. **BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.** v. 110, n. 1, p. 39-45, 2003. doi:10.1046/j.1471-0528.2003.02158.x
- 55 NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL; NATIONAL BLOOD AUTHORITY; NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Guidelines on the prophylactic use of Rh D immunoglobulin (anti-D) in obstetrics.** Canberra: National Health and Medical Research Council. 2003.
- 56 POLLACK, W. et al. Studies on Rh prophylaxis: II. Rh immune prophylaxis after transfusion with Rh-positive blood. **Transfusion.** v. 11, n. 6, p. 340-344, 1971. doi:10.1111/j.1537-2995.1971.tb04425.x
- 57 KENT, J.; FARRELL, A.-M.; SOOTHILL, P. Routine administration of anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal *RHD* genotyping and a review of policy and practice. **BMC Pregnancy Childbirth.** v. 14, n. 87, p. 1-4, 2014. doi:10.1186/1471-2393-14-87
- 58 GEAGHAN, S. M. Diagnostic laboratory technologies for the fetus and neonate with isoimmunization. **Semin. Perinatol.** v. 35, n. 3, p. 148-154, 2011. doi:10.1053/j.semperi.2011.02.009
- 59 NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE (NICE). **Routine antenatal anti-D prophylaxis for women who are rhesus D negative.** TA156. ed. London: NICE. 2008.
- 60 MAAYAN-METZGER, A. Maternal anti-D prophylaxis during pregnancy does not cause neonatal haemolysis. **Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.** v. 84, n. 1, p. F60-F62, 2001. doi:10.1136/fn.84.1.F60
- 61 FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA (FEBRASGO). **Manual de assistência pré-natal.** São Paulo: FEBRASGO. 2014.
- 62 EKLUND, J. et al. Turnover rate of anti-D IgG injected during pregnancy. **BMJ.** v. 284, n. 6319, p. 854-855, 1982. doi:10.1136/bmj.284.6319.854
- 63 TIBLAD, E. et al. Pharmacokinetics of 250 µg anti-D IgG in the third trimester of pregnancy: an observational study. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** v. 91, n. 5, p. 587-592, 2012. doi:10.1111/j.1600-0412.2012.01377.x
- 64 MACKENZIE, I. Z. et al. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin. **BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.** v. 113, n. 1, p. 97-101, 2006. doi:10.1111/j.1471-0528.2005.00789.x
- 65 CHRISTENSSON, M. et al. Flow cytometric quantitation of serum anti-D in pregnancy. **Transfusion.** v. 36, n. 6, p. 500-505, 1996. doi:10.1046/j.1537-2995.1996.36696269507.x

- 66 GARRATTY, G. Drug-induced immune hemolytic anemia. **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.**, p. 73-79. 2009. doi:10.1182/asheducation-2009.1.73
- 67 WHITLOCK, S. A. **Immunohematology for Medical Laboratory Technicians**. Sidney: Cengage Learning. 2010.
- 68 AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (AABB). **Technical Manual**. 18. ed. FUNG, M. K. et al. (Ed.). Bethesda: American Association of Blood Banks (AABB). 2014. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- 69 BUB, C. B. et al. *RHD* alleles among pregnant women with serologic discrepant weak D phenotypes from a multiethnic population and risk of alloimmunization. **J. Clin. Lab. Anal.** v. 32, n. 1, p. 1-5, 2018. doi:10.1002/jcla.22221
- 70 HILL, J. M.; HABERMAN, S. The Coombs (antiglobulin) test: indications and technics. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 24, n. 3, p. 305-320, 1954. doi:10.1093/ajcp/24.3.305
- 71 QUINLEY, E. D.; ed. **Immunohematology: principles and practice**. 3. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2011.
- 72 BRUCE, D. G. et al. Antenatal monitoring of anti-D and anti-c: could titre scores determined by column agglutination technology replace continuous flow analyser quantification? **Transfus. Med.** v. 23, n. 1, p. 36-41, 2013. doi:10.1111/tme.12002
- 73 BLOMME, S.; DE MAERTELAERE, E.; VERHOYE, E. A comparison of three column agglutination tests for red blood cell alloantibody identification. **BMC Res. Notes**. v. 13, n. 1, p. 129, 2020. doi:10.1186/s13104-020-04974-x
- 74 SZKOTAK, A. J. et al. Interpretation of pretransfusion testing in obstetrical patients who have received antepartum Rh immunoglobulin prophylaxis. **Vox Sang.** v. 110, n. 1, p. 51-59, 2016. doi:10.1111/vox.12302
- 75 HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap) — A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **J. Biomed. Inform.** v. 42, n. 2, p. 377-381, 2009. doi:10.1016/j.jbi.2008.08.010
- 76 HARRIS, P. A. et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. **J. Biomed. Inform.** v. 95, n. April, p. 103208, 2019. doi:10.1016/j.jbi.2019.103208
- 77 IBM CORP. IBM SPSS Statistics for Windows. 2016.
- 78 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. **Atenção ao pré-natal de baixo risco**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2012.
- 79 CLAUSEN, F. B.; HELLBERG, Å. External quality assessment of noninvasive fetal RHD genotyping. **Vox Sang.** v. 115, n. 5, p. 466-471, 2020. doi:10.1111/vox.12908
- 80 SAHOO, T. et al. Rh alloimmunisation: current updates in antenatal and postnatal management [Ahead of print]. **Indian J. Pediatr.** July 2020. doi:10.1007/s12098-020-03366-0
- 81 IRVING, C.; CRENNAN, M.; VANNIASINKAM, T. Can serological methods help distinguish between prophylactic and alloimmune anti-D? **Transfus. Med.** v. 27, n. 5, p. 362-368, 2017. doi:10.1111/tme.12420
- 82 GLAZEBROOK, B. et al. Quality audit of the guidelines for the use of RhD immunoglobulin in obstetrics: Are we getting it right? [Ahead of print]. **Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.**, p. 1-5. May 18. 2020. doi:10.1111/ajo.13177
- 83 SINCLAIR, C. J.; BROOKS, W.; GENEREUX, M. G. Comparative pharmacokinetics of liquid and lyophilized formulations of IV RhIG immune

- globulin. **Biologicals**. v. 36, n. 4, p. 256-262, 2008. doi:10.1016/j.biologicals.2008.02.003
- 84 SCHÄFFNER, G. et al. Validation of flow cytometry to quantify the potency of anti-D immunoglobulin preparations. **Vox Sang**. v. 84, n. 2, p. 129-136, 2003. doi:10.1046/j.1423-0410.2003.00267.x
- 85 HILDÉN, J. et al. Flow-cytometric quantitation of anti-D antibodies. **Vox Sang**. v. 72, n. 3, p. 172-176, 1997. doi:10.1046/j.1423-0410.1997.7230172.x
- 86 SANKARALINGAM, P. et al. Red cell alloimmunization in RhD positive pregnant women and neonatal outcome. **Transfus. Apher. Sci.** v. 55, n. 1, p. 153-158, 2016. doi:10.1016/j.transci.2016.06.002
- 87 FLESIPOULOU, I. et al. Red Blood Cell Alloantibody Titration - Does the Titration Method Matter? **Clin. Lab.** v. 66, n. 6, p. 1-8, 2020. doi:10.7754/Clin.Lab.2019.191021
- 88 FINCK, R. et al. Comparison of a gel microcolumn assay with the conventional tube test for red blood cell alloantibody titration. **Transfusion**. v. 53, n. 4, p. 811-815, 2013. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03793.x
- 89 NOVARETTI, M. C. Z. et al. Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti-D titration. **Clin. Lab. Haematol.** v. 25, n. 5, p. 311-315, 2003. doi:10.1046/j.1365-2257.2003.00540.x
- 90 WOELFER, B. et al. Postdelivery levels of anti-D IgG prophylaxis in D- mothers depend on maternal body weight. **Transfus. Pract.** v. 44, n. 4, p. 512-517, 2004. doi:10.1111/j.1537-2995.2004.03287.x
- 91 NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE (NICE). **High-throughput non-invasive prenatal testing for fetal RHD genotype**. London. 2016.
- 92 WESTHOFF, C. M. Blood group genotyping. **Blood**. v. 133, n. 17, p. 1814-1820, 2019. doi:10.1182/blood-2018-11-833954
- 93 AMARAL, D. R. T. et al. Fetal *RHD* genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. **J. Clin. Lab. Anal.** v. 25, n. 2, p. 100-104, 2011. doi:10.1002/jcla.20440
- 94 SCHMIDT, L. C. et al. Noninvasive fetal *RHD* genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian population. **Genet. Mol. Res.** v. 13, n. 1, p. 799-805, 2014. doi:10.4238/2014.February.7.1
- 95 RYCZEK, E.; WHITE, J.; CAROLAN-REES, G. Implementation of high-throughput non-invasive prenatal testing for fetal RHD genotype testing in England: Results of a cross-sectional survey of maternity units and expert interviews. **Transfus. Med.** v. 30, n. 4, p. 287-294, 2020. doi:10.1111/tme.12702
- 96 RUNKEL, B. et al. Targeted antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative pregnant women: A systematic review. **BMC Pregnancy Childbirth**. v. 20, n. 1, p. 1-10, 2020. doi:10.1186/s12884-020-2742-4
- 97 WIENZEK-LISCHKA, S. et al. Potential of next-generation sequencing in noninvasive fetal molecular blood group genotyping. **Transfus. Med. Hemotherapy**. v. 47, n. 1, p. 14-22, 2020. doi:10.1159/000505161
- 98 DARLINGTON, M. et al. Effectiveness and costs of non-invasive foetal *RHD* genotyping in rhesus-D negative mothers: a French multicentric two-arm study of 850 women. **BMC Pregnancy Childbirth**. v. 18, n. 1, p. 496, 2018. doi:10.1186/s12884-018-2114-5
- 99 SCHMIDT, L. C. et al. **Avaliação do impacto assistencial e financeiro da genotipagem RHD fetal no plasma materno como ferramenta não-invasiva na conduta de atendimento a gestantes RhD Negativo**. 2015. 123 f. Tese

- (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Genética. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,. 2015. https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-A3KGGH/1/tese_final_recuperado.pdf. Accessed July 18, 2020.
- 100 MAYEKAR, R. V. et al. Recombinant anti-D for prevention of maternal-foetal Rh(D) alloimmunization: a randomized multi-centre clinical trial. **Obstet. Gynecol. Sci.** v. 63, n. 3, p. 315-322, 2020. doi:10.5468/ogs.2020.63.3.315
- 101 CHAUHAN, A. R. et al. A multicenter, randomized, open-label trial comparing the efficacy and safety of monoclonal anti-Rh (D) immunoglobulin with polyclonal anti-Rh (D) immunoglobulin for the prevention of maternal Rh-isoimmunization. **J. Obstet. Gynecol. India.** v. 69, n. 5, p. 420-425, 2019. doi:10.1007/s13224-019-01234-2
- 102 SANDLER, S. G. et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. **Transfusion.** v. 55, n. 3, p. 680-689, 2015. doi:10.1111/trf.12941

Anexos

ANEXOS

**ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE PESQUISA DO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049-900
Fone (016) 3602-2583 - Fax (016) 3602-1524

Ribeirão Preto, 9 de maio de 2017.

Ilmo. Sr. Prof. Dr.
Geraldo Duarte

Prezado Professor,

O projeto intitulado "**Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia pré-natal em gestantes Rh negativo**", protocolado sob nº 589 de sua autoria foi analisado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Informamos que o projeto foi **APROVADO** para ser desenvolvido em nosso Departamento, devendo ser enviado à Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para análise, antes do início da coleta de dados.

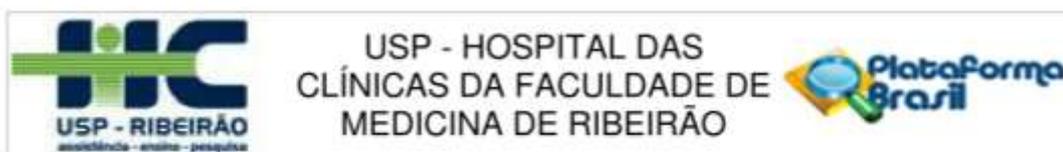
Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, reading 'Ricardo de Carvalho Cavalli'.

Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli

Presidente da Comissão de Pesquisa do Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP

ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia pré-natal em gestantes Rh negativo.

Pesquisador: Geraldo Duarte

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68074417.9.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

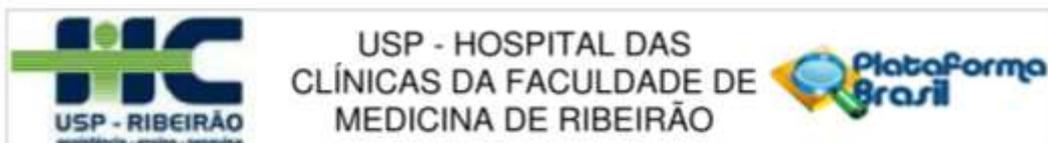
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.099.994

Apresentação do Projeto:

Considera-se a aloimunização materna contra o antígeno eritrocitário RhD como a principal causa da doença hemolítica perinatal. Para seu controle, a imunoprofilaxia com Imunoglobulina anti-RhD (Ig anti-RhD) pré e pós-natal foi assumida amplamente nos cenários assistenciais como medida efetiva de prevenção desta sensibilização. Não obstante, ainda há lacunas na literatura quanto às melhores estratégias imunoproláticas (uma ou duas doses), dados farmacocinéticos referentes à velocidade de redução da concentração da imunoglobulina anti-RhD e as correlações com o Teste de Coombs Indireto (TIC). No Município de Ribeirão Preto utiliza-se uma dose de Ig anti-RhD 300 µg na 28ª semana gestacional, esquema que nunca foi avaliado. Baseado nessas indagações, justifica-se a realização deste projeto. Para responder estas perguntas este projeto pretende avaliar qual é a variação da concentração da Ig anti-RhD e dos títulos do TIC materno após o uso de Ig anti-RhD até o nascimento. O estudo será desenvolvido no Ambulatório de Gravidez de Alto Risco do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de Ribeirão Preto (HC-FMRPUSP), na agência transfusional do HC-FMRPUSP e no Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto. Serão avaliadas gestantes Rh negativo identificadas nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Ribeirão Preto-SP, cujo parceiro possui fator Rh positivo. Após cumprirem os trâmites éticos da pesquisa, assinarem o Termo de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.099.994

Compromisso Livre e Esclarecido, farão o TIC para descartar alguma tipo de anticorpo que influencie este teste e receberão a dose de Ig anti RhD. A partir daí, prospectivamente, farão avaliações regulares da concentração Ig anti RhD e do TIC. Para as análises estatísticas dos resultados deste estudo serão utilizados o teste "t" de Student para comparações das variáveis paramétricas e o teste de Fisher para as variáveis não paramétricas. A projeção é que a pesquisa seja concluída em 20 meses e contará com verbas da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HC-FMRPUSP e verba de bancada do orientador.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar o comportamento dos níveis de imunoglobulina anti RhD após o uso de imunoglobulina exógena realizada na 28ª semana de gestação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos inerentes à coleta semanal de sangue devidamente descritos no projeto e no TCLE;
Sem benefícios diretos previstos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo prospectivo que pretende estudar o comportamento dos níveis de imunoglobulina anti RhD após o uso de imunoglobulina exógena realizada na 28ª semana de gestação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. O Pesquisador atendeu adequadamente as recomendações solicitadas no parecer anterior.

Recomendações:

não se aplica

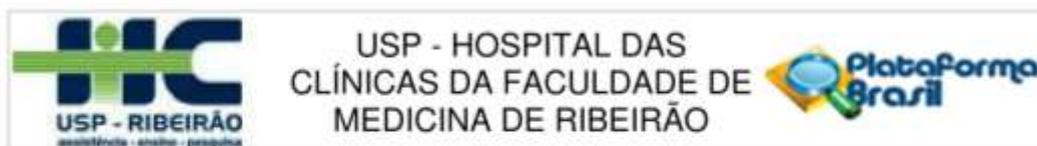
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido v. 3 de 29/05/2017, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.099.994

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_916693.pdf	29/05/2017 22:07:57		Aceito
Outros	Carta_de_pendencias.docx	29/05/2017 22:06:52	Geraldo Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_v3.docx	29/05/2017 21:54:06	Geraldo Duarte	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Oficio_Comissao_de_Pesquisa.docx	09/05/2017 09:31:10	Geraldo Duarte	Aceito
Orçamento	Oficio_Orcamento.pdf	09/05/2017 09:30:24	Geraldo Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_2017_Ana_Claudia.docx	08/05/2017 17:10:12	Geraldo Duarte	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Plataforma_Brasil.pdf	08/05/2017 17:02:15	Geraldo Duarte	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 05 de Junho de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DO PROJETO PELA SECRETARIA DE SAÚDE DA CIDADE DE RIBEIRÃO PRETO



Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto

Estado de São Paulo - Secretaria Municipal da Saúde



OF4627/2017– CAPP

ALS/2017

Ribeirão Preto 27 de novembro de 2017.

Prezada Senhora,

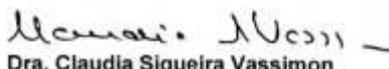
Informo que o responsável pela UBS José Sampaio recusou-se a participar da pesquisa. Os gerentes do CSE Cuiabá, UBS Dom Miele, UBS Vila Recreio, UBS Maria Casagrande, UBS Vila Albertina, CSE Vila Lobato, PSF Jardim Paiva, UBS Presidente Dutra, USF Paulo Gomes Romeo, CSE Vila Tibério, UBS Vila Tibério, UBDS Central, UBS Ipiranga e CSE Ipiranga da Secretaria Municipal da Saúde manifestaram a concordância com a realização do projeto de pesquisa.

Sendo assim, declaro estar ciente e concordo com a realização do projeto de pesquisa: **“Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia em gestantes Rh negativo”** sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Geraldo Duarte** e da Pesquisadora **Ana Cláudia Rabelo e Silva**, nas unidades concordes.

Informo que a pesquisa somente poderá iniciar quando obtiver a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição proponente, devendo a pesquisadora apresentar-se com antecedência à Gerência para combinar melhor data de acesso à Unidade.

Fica consignada a liberdade desta Secretaria em retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem que isso lhe traga prejuízo ou responsabilização de qualquer ordem. Solicito que a pesquisadora encaminhe à Secretaria Municipal da Saúde o Relatório Final ao encerrar a pesquisa.

Cordialmente,


Dra. Claudia Siqueira Vassimon

**Coordenadora da Comissão de Avaliação de Projeto de Pesquisa
da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto - CAPP**

Ilustríssimo Senhor

Professor Dr. GERALDO DUARTE

COORDENADOR DO PROJETO DE PESQUISA

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

NESTA

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/12)

Título do estudo: Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia pré-natal em gestantes Rh negativo

Nome da Instituição: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Participante do estudo: _____

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Pesquisadora: Ana Cláudia Rabelo e Silva

A senhora está sendo convidada a participar do estudo "**Curva da concentração de imunoglobulina anti-RhD após imunoprofilaxia pré-natal em gestantes Rh negativo**". Antes que a senhora decida se quer ou não participar, é importante que a senhora entenda porque este estudo está sendo feito e o que ele envolve. Por favor, leia com atenção as informações descritas neste documento e discuta-as, se desejar, com sua família ou amigos. Pergunte aos pesquisadores do estudo qualquer dúvida que não tenha ficado clara ou que você necessite de mais informações. Use o tempo necessário para a senhora decidir se deseja ou não participar deste estudo.

Quando a gestante apresenta tipo sanguíneo Rh negativo e o parceiro apresenta tipo sanguíneo Rh positivo pode ocorrer um problema de compatibilidade entre o sangue da mãe e o sangue do feto, se ele apresentar tipo sanguíneo Rh positivo. Neste caso, quando o sangue do feto entra em contato com a corrente sanguínea da mãe, as defesas da mãe vão encará-lo como um invasor e produzir anticorpos para combatê-lo. Na próxima gestação de feto Rh positivo, estes anticorpos atravessarão a placenta e poderão atacar as hemácias do feto, causando a Doença Hemolítica Perinatal (DHPN), popularmente conhecida como Eritroblastose Fetal, que provoca sérias complicações na gravidez e até a morte do bebê. Para evitar a formação desses anticorpos, é administrada a Imunoglobulina anti-RhD. O objetivo deste estudo é avaliar a concentração dos anticorpos e da Imunoglobulina anti-RhD desde a aplicação até o parto. Espera-se que os resultados desse estudo ajudem a fornecer informações importantes sobre a prevenção da DHPN, gerando melhorias na saúde dos bebês de gestantes Rh negativo.

Serão convidadas a participar do estudo todas as gestantes com fator Rh negativo, cujos parceiros apresentem fator Rh positivo ou desconhecido, que realizarem o pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Ribeirão Preto-SP e no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Caso a senhora concorde em participar desta pesquisa, a partir do momento que a senhora receber uma dose da Imunoglobulina anti-RhD (na 28ª semana de gravidez) serão coletadas amostras de sangue para a realização do teste de Coombs indireto (TCI), que avaliará a quantidade de anticorpos anti-RhD no seu sangue, e para dosagem de imunoglobulina anti-RhD no seu sangue. As coletas serão realizadas durante as consultas do seu pré-natal, de acordo com a seguinte programação: 1ª coleta: Três dias após a aplicação da imunoglobulina; 2ª coleta: Uma semana após a injeção da imunoglobulina anti-RhD; 3ª coleta: Duas semanas após a última coleta; 4ª e demais coletas: Três semanas de intervalo até o nascimento. Além disso, será solicitado o preenchimento de um questionário com dados pessoais e informações acerca da gravidez e da sua saúde.

Os inconvenientes desta pesquisa são os desconfortos gerados pela coleta de sangue, tais como dor e hematoma no local da coleta. Caso aconteçam, esses sintomas desaparecem naturalmente. Para acelerar o processo, é indicado o uso de compressas frias por 15 minutos a cada hora nas primeiras seis horas, e após esse prazo, o uso de compressa morna de 3 a 4 vezes ao dia.

Rubrica da participante

Rubrica da pesquisadora

v. 3

29/05/2017

Página 1 de 2



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

É garantida a senhora assistência integral e gratuita pelo tempo que se fizer necessário para o tratamento de qualquer dano direto ou indireto, imediato ou tardio sofrido no decorrer de sua participação neste estudo. A senhora terá direito ao ressarcimento de todas as despesas geradas por sua participação no estudo, incluindo refeições e transporte. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da sua participação no estudo, a senhora será devidamente indenizada, conforme determina a lei.

Para qualquer informação durante ou após a realização do estudo, a senhora poderá entrar em contato com o pesquisador do estudo ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones e endereços descritos em CONTATOS. A senhora receberá informação atualizada durante o estudo e acesso total aos resultados do estudo.

Os pesquisadores a identificarão através de um código. Seu nome nunca será mencionado em qualquer relatório ou publicação que possam resultar deste estudo, ou seja, sua identidade será mantida em confidencialidade e sigilo pelos pesquisadores e sua equipe de acordo com as leis, resoluções e códigos de conduta profissional aplicáveis no Brasil, se comprometendo a manter em segredo os dados individuais, resultados de exames e testes, bem como informações de seu prontuário médico. Não será permitido o acesso a terceiros.

A decisão de participar ou não do estudo é inteiramente da senhora. Mesmo depois de ter concordado em participar, a senhora ainda tem a liberdade de sair do estudo a qualquer momento sem penalização alguma para a senhora.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será assinado em duas vias pela senhora e pelos pesquisadores, e uma das vias ficará com a senhora.

Nome da Participante: _____

Ass.: _____ Data: _____

Nome da Pesquisadora: _____

Ass.: _____ Data: _____

CONTATOS

Pesquisadora: Ana Cláudia Rabelo e Silva
Telefones: (16) 99781-3741 - (37) 99122-0527
E-mail: anarabelo@usp.br

Orientador: Professor Dr. Geraldo Duarte
Telefone: (16) 3602-2588
E-mail: gduarte@fmrp.usp.br

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Local: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, 8º andar, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP, CEP: 14049-900

Comitê de Ética em Pesquisa
Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP, CEP: 14049-900
Telefone: (16) 3602-2228
E-mail: cep@hcrp.usp.br

Rubrica da participante

Rubrica da pesquisadora

v. 3

29/05/2017

Página 2 de 2

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO GERAL

Data da entrevista: ____ / ____ / ____

Nome: _____ Código: _____

Endereço: _____

Telefone(s): _____ Idade: _____ Tipo sanguíneo: _____

Hygia/HC: _____ UBS: _____

Semanas de gestação: _____ 28ª Semana: _____

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ Data de Nasc.: ____ / ____ / ____

Cor: () branca () negra () amarela () parda/indígena

Você já foi submetida a uma transfusão sanguínea prévia?

() Sim () Não Se sim, descreva: _____

Você já foi submetida a alguma aplicação anterior de Imunoglobulina Anti-RhD (Maternam®, Partogama®, RhoGAM®, Rhophylac® ou similares) nesta gravidez?

() Sim () Não Se sim, descreva: _____

Você já foi submetida a algum procedimento invasivo relacionado à gravidez, tal como amniocentese, cordocentese, biópsia de vilos coriais, versão cefálica externa, nesta gravidez?

() Sim () Não Se sim, descreva: _____

Usa medicamentos à base de metildopa (Aldomet®, Aldoril®, Dopamet®, ou similares)?

() Sim () Não Se sim, descreva: _____

Observações: _____

Nome do parceiro: _____

Tipo sanguíneo do parceiro: _____

APÊNDICE C – INFORMAÇÕES ANTROPOMÉTRICAS E GESTACIONAIS INDIVIDUAIS

Paciente	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Estado nutricional	Histórico Gestacional	Idade gestacional (semanas + dias)	
							Na aplicação da Ig anti-RhD	No parto
A	24	65	1,54	27,4	Adequado	G1 P0 A0 C0	28 + 2	39 + 3
B	22	73	1,55	30,4	Sobrepeso	G1 P0 A0 C0	31 + 4	40 + 3
D	38	104	1,75	34,0	Obesidade	G3 P2 A0 C0	28 + 3	39 + 4
E	18	63	1,59	24,9	Adequado	G2 P1 A0 C1	28 + 1	40 + 3
F	24	61	1,65	22,4	Baixo peso	G2 P1 A0 C0	28 + 3	40 + 4
G	36	76	1,65	27,9	Adequado	G6 P5 A0 C1	29 + 5	39 + 2
H	29	70	1,54	29,5	Sobrepeso	G1 P0 A0 C0	28 + 6	39 + 3
I	31	71	1,62	27,1	Adequado	G2 P1 A0 C0	29 + 1	38 + 1
J	21	68	1,58	27,2	Adequado	G2 P1 A0 C0	29 + 1	41 + 2
K	24	88	1,76	28,4	Sobrepeso	G2 P0 A1 C0	31 + 1	38 + 6
L	30	58	1,50	25,8	Adequado	G3 P2 A0 C1	28 + 2	37 + 3
M	29	110	1,62	41,9	Obesidade	G2 P1 A0 C0	28 + 3	39 + 3
N	33	73	1,68	25,9	Adequado	G1 P0 A0 C0	30 + 0	40 + 3
O	24	90	1,63	33,9	Obesidade	G1 P0 A0 C0	28 + 0	37 + 1
P	27	65	1,62	24,8	Adequado	G2 P1 A0 C0	28 + 3	39 + 4
Q	19	84	1,59	33,2	Obesidade	G1 P0 A0 C0	30 + 6	35 + 5
R	27	66	1,54	27,8	Sobrepeso	G1 P0 A0 C0	29 + 1	40 + 6
S	36	98	1,65	36,0	Obesidade	G1 P0 A0 C0	28 + 0	38 + 2
T	26	66	1,72	22,3	Baixo peso	G3 P2 A1 C0	29 + 5	37 + 4
U	26	105	1,68	37,2	Obesidade	G1 P0 A0 C0	28 + 2	37 + 6
V	25	68	1,61	26,2	Adequado	G1 P0 A0 C0	29 + 2	38 + 5
W	23	58	1,55	24,1	Adequado	G3 P2 A0 C0	29 + 4	36 + 0
X	22	101	1,60	39,5	Obesidade	G2 P1 A0 C1	30 + 4	40 + 0
Y	23	75	1,53	32,0	Sobrepeso	G1 P0 A0 C0	28 + 5	38 + 6
Z	38	67	1,63	25,2	Adequado	G3 P1 A1 C0	28 + 2	41 + 2
AA	17	61	1,56	25,1	Adequado	G1 P0 A0 C0	28 + 3	39 + 4
AB	30	86	1,67	30,8	Sobrepeso	G1 P0 A0 C0	28 + 4	41 + 3
Média:	26,74	76,67	1,62	29,29		1,85*	29,09	39,17
(DP):	(5,83)	(15,66)	(0,07)	(5,15)		(1,13) *	(1,00)	(1,53)

IMC - Índice de massa corporal; Ig anti-RhD - Imunoglobulina anti-RhD; G - Gestações; P - Partos; A - Abortos; C - Cesáreas; DP – Desvio padrão

(*) Média e DP referentes à quantidade de gestações

**APÊNDICE D – TITULAÇÕES INDIVIDUAIS DAS PACIENTES
(REPRESENTADAS EM ESCORE – MÉTODO EM GEL)**

Paciente	3 dias	7 dias	21 dias	42 dias	63 dias	84 dias
A	[34,0]	37,0	33,0	19,5	4,0	{0,7}
B	21,0	26,0	20,0	11,0	{3,1}	{0,9}
D	6,5	6,5	15,5	11,0	3,0	{0,9}
E	39,5	43,5	26,0	16,0	5,0	0,0
F	35,5	35,5	23,0	2,5	0,0	0,0
G	13,0	23,0	23,0	[11,6]	5,0	{2,2}
H	33,5	34,0	28,5	19,5	8,0	{2,5}
I	46,0	45,0	38,0	25,0	{8,9}	{2,4}
J	31,0	28,0	26,0	16,0	8,0	1,5
K	[29,2]	32,0	26,0	16,0	{5,1}	{1,4}
L	[30,7]	36,0	31,0	13,0	[4,0]	{1,1}
M	16,0	23,0	16,0	8,0	1,5	{0,4}
N	33,0	33,0	26,0	16,0	3,0	{0,0}
O	[20,8]	26,5	24,0	10,0	0,0	{0,0}
P	52,5	43,0	32,0	16,0	5,0	{0,3}
Q	16,0	13,0	13,0	{7,9}	{0,9}	{0,0}
R	42,0	44,5	37,5	11,5	1,5	{0,0}
S	13,0	14,5	5,0	1,5	0,0	{0,0}
T	14,5	24,0	31,5	0,0	{0,0}	{0,0}
U	3,0	20,0	26,0	0,0	0,0	{0,0}
V	34,5	50,0	40,0	[18,3]	8,0	{3,3}
W	49,0	55,5	46,0	17,0	{6,1}	{1,7}
X	17,5	22,5	30,5	14,5	0,0	{0,0}
Y	14,5	24,5	22,0	16,0	3,0	{1,0}
Z	34,5	44,5	34,5	14,5	1,5	0,0
AA	46,0	46,0	37,5	28,5	11,0	3,0
AB	33,0	44,0	[38,0]	24,0	16,0	8,0
Média	28,14	32,41	27,76	13,51	4,13	1,16
(Desvio-padrão)	(13,43)	(12,28)	(9,19)	(7,17)	(3,93)	(1,71)

[--] Pontos de coletas ausentes, cujos valores foram estimados por meio da imputação de dados de maximização esperada

{--} Pontos de coleta não realizados pois o parto ocorreu em data anterior à esperada da coleta, cujos valores foram estimados por meio da imputação de dados de maximização esperada

**APÊNDICE E – TITULAÇÕES INDIVIDUAIS DAS PACIENTES
(REPRESENTADAS EM ESCORE – MÉTODO EM TUBO)**

Paciente	3 dias	7 dias	21 dias	42 dias	63 dias	84 dias
A	[13,0]	13,0	5,0	3,0	0,0	[0,0]
B	0,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]	[0,0]
D	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]
E	8,0	8,0	3,0	0,0	0,0	0,0
F	13,0	8,0	3,0	0,0	0,0	0,0
G	0,0	0,0	0,0	[0,0]	0,0	[0,0]
H	3,0	8,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]
I	13,0	13,0	3,0	0,0	[0,0]	[0,0]
J	3,0	3,0	3,0	0,0	0,0	0,0
K	[13,0]	13,0	8,0	0,0	[0,0]	[0,0]
L	[8,0]	8,0	3,0	0,0	[0,0]	[0,0]
M	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	[0,0]
N	16,0	16,0	8,0	0,0	0,0	[0,0]
O	[0,0]	3,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]
P	13,0	8,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]
Q	0,0	0,0	0,0	[0,0]	[0,0]	[0,0]
R	11,0	11,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]
S	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	[0,0]
T	0,0	3,0	5,0	0,0	0,0	[0,0]
U	0,0	3,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]
V	6,0	8,0	6,0	[3,0]	0,0	[0,0]
W	13,0	13,0	13,0	0,0	0,0	[0,0]
X	0,0	3,0	8,0	0,0	0,0	[0,0]
Y	0,0	3,0	3,0	0,0	0,0	[0,0]
Z	3,0	5,0	3,0	0,0	0,0	0,0
AA	13,0	13,0	8,0	3,0	0,0	0,0
AB	5,0	8,0	[5,0]	3,0	0,0	0,0
Média	5,70	6,56	3,89	0,44	0,00	0,00
(Desvio-padrão)	(5,88)	(4,83)	(3,07)	(1,09)	(0,00)	(0,00)

[--] Pontos de coletas ausentes, cujos valores foram estimados por meio da imputação de dados de maximização esperada

{--} Pontos de coleta não realizados pois o parto ocorreu em data anterior à esperada da coleta, cujos valores foram estimados por meio da imputação de dados de maximização esperada

**APÊNDICE F – TITULAÇÕES INDIVIDUAIS DAS PACIENTES
(REPRESENTADAS EM TÍTULO – MÉTODO EM GEL)**

Paciente	3 dias	7 dias	21 dias	42 dias	63 dias	84 dias
A	(-)	16	8	4	1	(*)
B	4	4	2	1	(*)	(*)
D	1	1	1	1	0	(*)
E	16	16	4	2	1	0
F	8	8	4	1	0	0
G	2	4	4	(-)	1	(*)
H	8	8	4	4	1	(*)
I	16	16	8	4	(*)	(*)
J	4	8	4	2	1	0
K	(-)	8	4	2	(*)	(*)
L	(-)	8	8	2	(-)	(*)
M	2	4	2	1	0	(*)
N	8	8	4	2	0	(*)
O	(-)	4	4	2	0	(*)
P	32	16	8	2	1	(*)
Q	2	2	2	(*)	(*)	(*)
R	16	16	8	2	0	(*)
S	2	2	1	0	0	(*)
T	2	4	8	0	(*)	(*)
U	0	4	4	0	0	(*)
V	8	24	8	(-)	1	(*)
W	32	32	16	4	(*)	(*)
X	2	4	8	2	0	(*)
Y	2	4	4	2	0	(*)
Z	8	16	8	2	0	0
AA	16	16	8	4	1	0
AB	8	16	(-)	4	2	1
Moda	2	16	8	2	0	0
Mínimo e Máximo	0-32	1-32	1-16	0-4	0-2	0-1

(-) Pontos de coletas ausentes

(*) Pontos de coleta não realizados pois o parto ocorreu em data anterior à esperada da coleta

**APÊNDICE G – TITULAÇÕES INDIVIDUAIS DAS PACIENTES
(REPRESENTADAS EM TÍTULO – MÉTODO EM TUBO)**

Paciente	3 dias	7 dias	21 dias	42 dias	63 dias	84 dias
A	(-)	2	1	0	0	(*)
B	0	0	0	0	(*)	(*)
D	0	0	0	0	0	(*)
E	1	1	0	0	0	0
F	2	1	0	0	0	0
G	0	0	0	(-)	0	(*)
H	0	1	0	0	0	(*)
I	2	2	0	0	(*)	(*)
J	0	0	0	0	0	0
K	(-)	2	1	0	(*)	(*)
L	(-)	1	0	0	(-)	(*)
M	0	0	0	0	0	(*)
N	2	2	1	0	0	(*)
O	(-)	0	0	0	0	(*)
P	2	1	0	0	0	(*)
Q	0	0	0	(*)	(*)	(*)
R	1	1	0	0	0	(*)
S	0	0	0	0	0	(*)
T	0	0	1	0	(*)	(*)
U	0	0	0	0	0	(*)
V	0	1	0	(-)	0	(*)
W	2	2	2	0	(*)	(*)
X	0	0	1	0	0	(*)
Y	0	0	0	0	0	(*)
Z	0	1	0	0	0	0
AA	2	2	1	0	0	0
AB	1	1	(-)	0	0	0
Moda	0	0	0	0	0	0
Mínimo e Máximo	0-2	0-2	0-2	0-2	0-0	0-0

(-) Pontos de coletas ausentes

(*) Pontos de coleta não realizados pois o parto ocorreu em data anterior à esperada da coleta

APÊNDICE H – MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Rho(D) Immune Globulin (anti-D) concentration-time curve after antenatal immunoprophylaxis in RhD-negative pregnant women.

Ana Cláudia Rabelo e Silva¹; Flávia Leite Souza Santos²; Silvana Maria Quintana¹; Ricardo Carvalho Cavalli¹; Alessandra Cristina Marcolin¹; Geraldo Duarte¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

²Regional Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

ABSTRACT

Objective: To assess anti-D titers and scores after RhD-negative pregnant women receive antenatal anti-D until delivery. **Methods:** Observational study evaluating 27 RhD-negative pregnant women after receiving a prenatal anti-D (300 µg) dose around 28th week of pregnancy. Serial blood samples were collected at 3, 7, 21, 42, 63 and 84 days after anti-D administration. We titrate anti-D by conventional tube test (CTT) and gel microcolumn assay (GMA) to assess anti-D scores and titers. Statistical analyzes were performed using IBM SPSS Statistics software. **Results:** Anti-D had maximum scores values around 7 days after its administration, and scores were higher in GMA than CTT for all patients. Anti-D was detected at delivery in 59% of the participants by GMA. Overweight and obese pregnant women may present lower concentrations of anti-D. No correlation was found between maximum scores when comparing them with newborn RhD blood type and maternal-neonatal ABO incompatibility. **Conclusion:** Administering 300 µg of anti-D in 28th week of pregnancy should be compared in studies analyzing perinatal outcomes, since anti-D was not detectable in 41% of patients, suggesting a significant period without prophylaxis.

KEYWORDS: Rhlg; Anti-RhD; Anti-D; Erythroblastosis Fetalis; Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn; Antibody titration.

INTRODUCTION

Maternal-fetal alloimmunization is sensitization of RhD-negative pregnant women exposed to RhD antigen expressed on the surface of RhD-positive fetus red blood cells (RBCs). These RBCs can naturally cross the placenta, in a fetomaternal hemorrhage (FMH), and reach maternal circulation during pregnancy (usually after third trimester) or in childbirth sensitizing maternal immune system to develop anti-RhD antibodies (also known anti-D). There are several other Rh and non-Rh antigens capable of causing alloimmunization, but RhD is the most immunogenic.[1]

After first exposure to RhD alloantigens, pregnant woman begins to produce IgM, a class of antibodies unable to cross placental barrier. In subsequent exposure, as a second pregnancy of a RhD-positive fetus, IgG is produced, and it can reach fetal bloodstream. There can recognize and bind to RhD antigens on the surface of fetal RhD-positive RBC, stimulating its destruction by hemolysis, causing hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN).[2]

The HDFN, formerly called erythroblastosis fetalis, is characterized by hemolytic anemia with distinct severity. It can be asymptomatic, with full recovery even without treatment, or it can present erythroblastosis, jaundice, edema, hepatosplenomegaly, bilirubin encephalopathy (kernicterus) and hydrops fetalis. Severe cases can lead to fetal or neonatal death.[3]

Irregular antibody screening is performed to diagnose maternal alloimmunization, using indirect antiglobulin test, term currently used instead of indirect Coombs test. The test is based on agglutination reaction of RhD erythrocyte antigen to maternal anti-D antibodies in serum/plasma. In positive cases, titration is determined to show the strength of the antibody.[4]

All pregnant women should perform irregular antibody screening, regardless RhD typing at least in the first antenatal appointment.[5]

Since anti-D immunoprophylaxis implementation, HDFN incidence have been reduced and achieved improvements in maternal and perinatal health. Currently, occurrence rates have remained stable due to other coefficients, such as absent or inadequate immunoprophylaxis and error in detecting clinical situations of FMH that also require immunoprophylaxis.[6]

Considering biological variation of anti-D in pregnant women, it is needed some technical solution to make this assessment. Therefore, the aim of our study is to assess whether anti-D is detectable at delivery, after prenatal anti-D immunoprophylaxis, by anti-D titers and scores.

MATERIALS AND METHODS

We carried out an observational study at 15 primary health care in Ribeirão Preto-SP, Brazil, from January 2018 to December 2019. Pregnant women were invited by convenience sampling until the minimum sample size was obtained considering the following criteria: healthy RhD-negative pregnant women without previous history of pregnancy complications, in the second trimester of a singleton pregnancy and with RhD-positive partners. Exclusion criteria were pregnant women: who had received anti-D prophylaxis earlier in current pregnancy; who had previous positive antibody screening in this pregnancy and who did not have anti-D prescribed by the physician. As discontinuing criteria were the patient's decision to drop out at any time and pregnant women who required an additional dose of anti-D during pregnancy.

Enrolled participants had ABO and RhD blood groups confirmed and an antibody screening to confirm whether the patient was not alloimmunized. An intramuscular administration of 300 µg (1500 IU) anti-D was done at gestational week 28-32. Serial blood samples were performed at 3, 7, 21, 42, 63 and 84 days post injection, and analyzed by conventional tube test (CTT) and gel microcolumn assay (GMA). To avoid reproducibility bias when comparing results of several titrations from the same patient, all serum samples were storage at -20 °C to be tested simultaneously using same RBCs.

Antibody titration was performed by serial twofold dilutions. Serum samples were diluted from 1:1 to 1:512 in a low ionic strength solution (LISS). Dilutions were incubated with a RBCs suspension (R2R2 - cDE/cDE) at proportions of 5% for CTT analyses and 1% for GMA analyses. After incubation, all reactions were read and each positivity reaction were described by an agglutination degree, ranging from a weak reaction to a 4+ reaction. Titration were described as titer and as score. Titer is the inverse of the largest dilution where it was observed positive agglutination reaction ($\geq 1+$). Score is a numeric gradation obtained by sum of established values for each agglutination degrees throughout dilutions.[7]

Ethical approval was obtained from the Research Ethics Committee of University Hospital of the Ribeirão Preto Medical School (Ethics approval number: 2.099.994). Prior to enrollment, participants provided written consent to participate in the study with the understanding that they reserved the right to withdraw from the study at any time.

The protocol for this study was in line with the STROBE statement. Study data were managed using REDCap (Research Electronic Data Capture, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA).

Descriptive statistics and statistical inference analyses were performed using IBM SPSS Statistics (IBM Inc., version 24.0 for Windows, Armonk, NY, USA) and the graphs were also created using Microsoft® Excel® 365 (Microsoft, Redmond, WA, USA). We use expectation-maximization algorithm to estimate score values of missing samples and time points which delivery occurred previous than 40 weeks of pregnancy. Spearman's rank correlation coefficient was used to compare GMA maximum scores with qualitative independent variables: positive or negative fetal RhD blood type; ABO incompatibility between pregnant woman and fetus; and nutritional status based on body mass index (BMI) by gestational age (underweight, normal weight, overweight, obesity). Pearson's correlation coefficient was used to analyze GMA maximum scores and BMI measured at the time of anti-D administration. We considered a significance level of 5% in all cases. Repeated measures

ANOVA and multiple comparison test were used to verify the difference between mean scores obtained at each time point.

RESULTS

We had enrolled 30 eligible subjects, although one patient left the study with incomplete data and two needed an additional anti-D dose. In total, 27 RhD-negative pregnant women were evaluated.

Anthropometric and gestational participants data were obtained from questionnaire and accessing electronic medical records. Summarized information was reported in Table 1, and detailed data are described at supporting information Table S1.

Table 1. Baseline characteristics of the study patients

Parameter	Mean (SD)
Maternal age (years)	26.74 (5.83)
BMI (weight[kg] / height[m] ²)	29.29 (5.15)
Gestational history (number of pregnancies)	1.85 (1.13)
Gestational age at anti-D administration (weeks)	29.09 (1.00)
Gestational age at delivery (weeks)	39.17 (1.53)

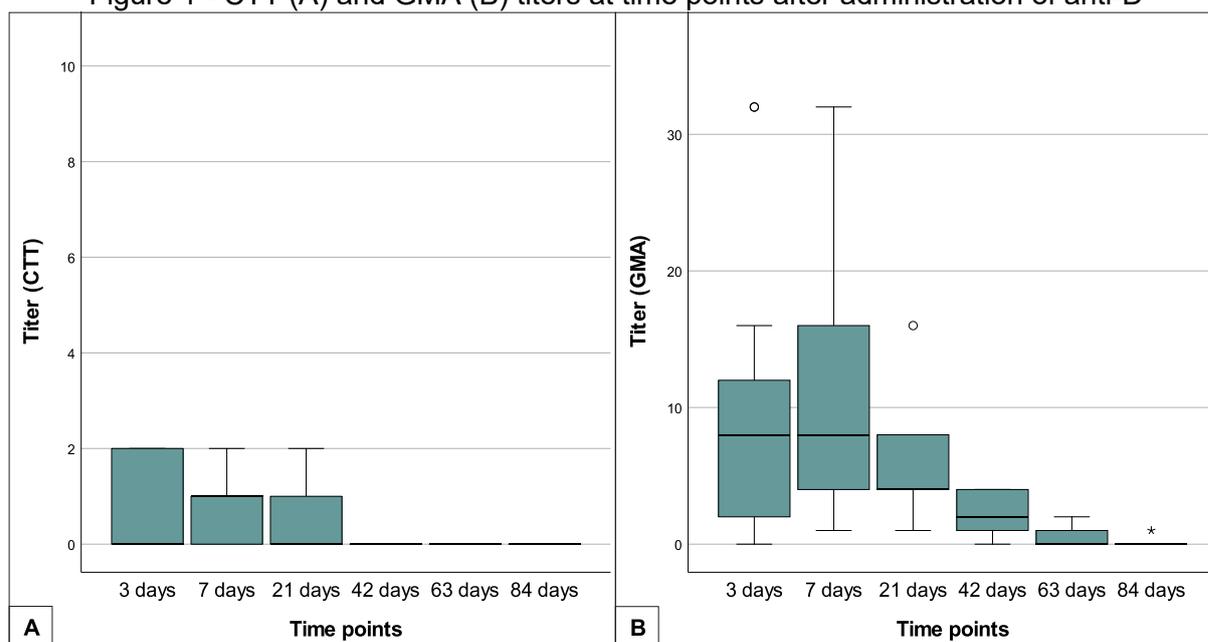
According to Atalah scale,[8] which classifies nutritional status by associating BMI ranges for each week of pregnancy, two patients were considered underweight, and 48% were above the ideal weight (six overweight and seven obese).

A total of 126 out of 134 possible samples (without previously scheduled sample when delivery happened before) were performed. Of these 126 samples, 81% (n=103) were collected at the predefined time point, and remaining samples within -1 to +2 days.

Samples from all patients and all time points were analyzed in duplicate by CTT and GMA methods and titrations were performed by serial twofold dilutions. Main results were reported by mean titer (Figure 1) and mean score (Figure 2) between duplicates.

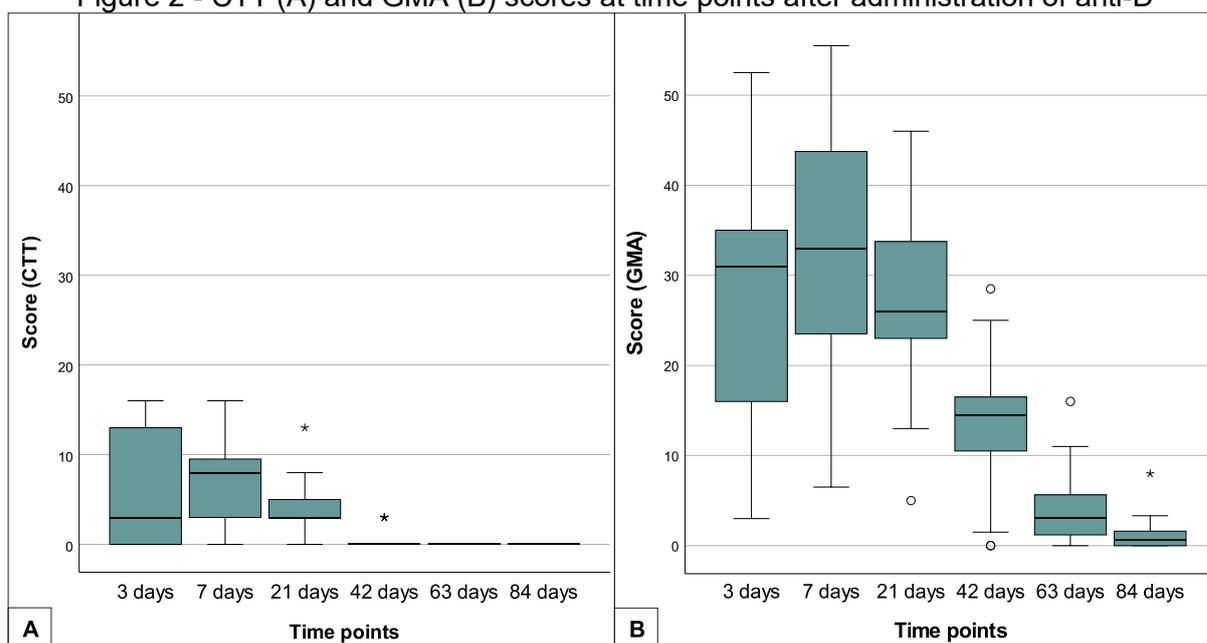
The maximum titers obtained by each patient along the time points were also described (Figure 3), showing the difference between the patients and methods

Figure 1 - CTT (A) and GMA (B) titers at time points after administration of anti-D



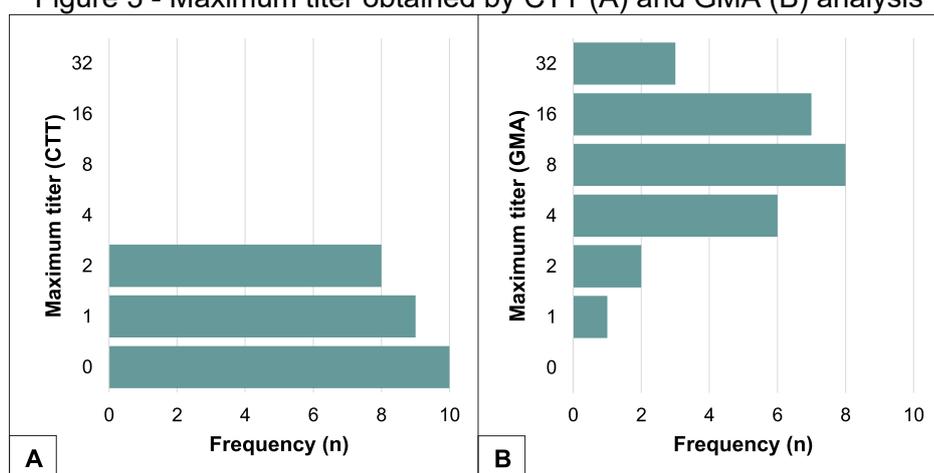
Note: Notice that graphs A and B are displayed at different scales for better viewing
Abbreviations: CTT - Conventional tube test; GMA - Gel microcolumn assay

Figure 2 - CTT (A) and GMA (B) scores at time points after administration of anti-D



Abbreviations: CTT - Conventional tube test; GMA - Gel microcolumn assay

Figure 3 - Maximum titer obtained by CTT (A) and GMA (B) analysis



Abbreviations: CTT - Conventional tube test; GMA - Gel microcolumn assay

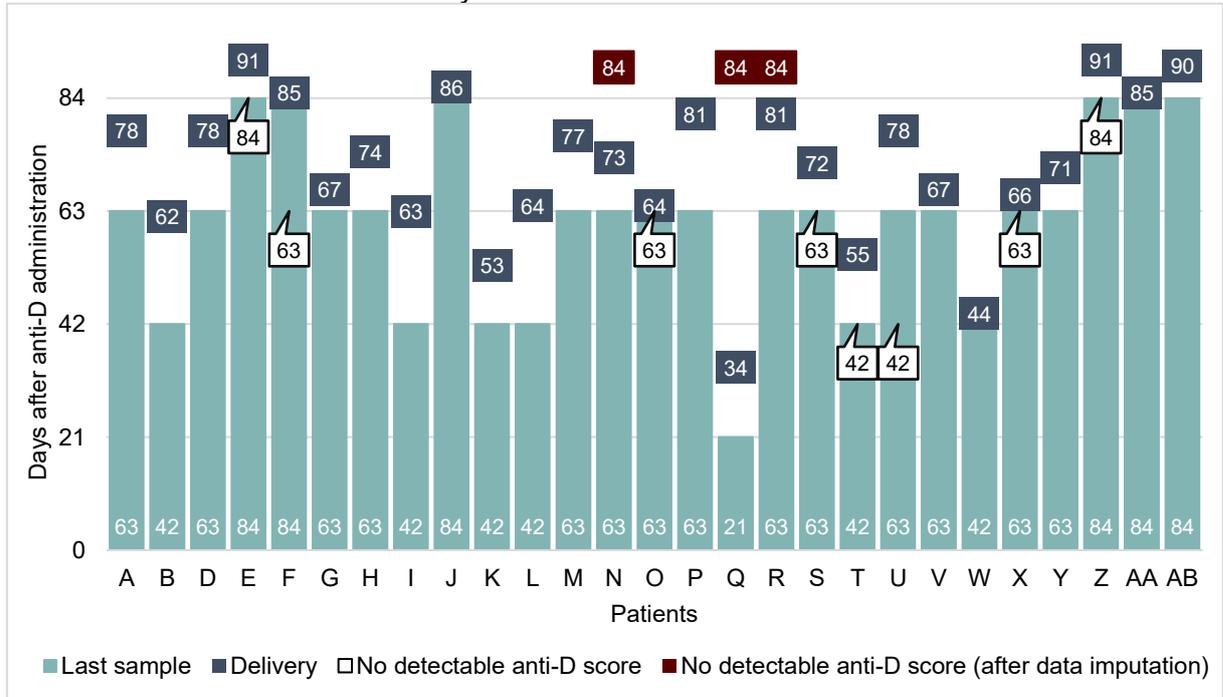
As expected, repeated measurements ANOVA indicated a significant difference between scores (GMA) over the six time points ($f 5.21=60.77, P<0.001$), and these differences between each subsequent time points were determined by multiple comparison test (Table 2).

Table 2. Multiple comparison test with the difference estimate between means for the subsequent time point scores

Samples	Mean difference	Standard error	95% Confidence interval		P
			Lower bound	Upper bound	
3 days - 7 days	-4.178	1.132	-7.825	-0.531	<0.05
7 days - 21 days	4.726	1.247	0.708	8.744	<0.05
21 days - 42 days	14.148	1.464	9.432	18.864	<0.001
42 days - 63 days	9.437	0.884	6.588	12.286	<0.001
63 days - 84 days	3.074	0.487	1.506	4.642	<0.001

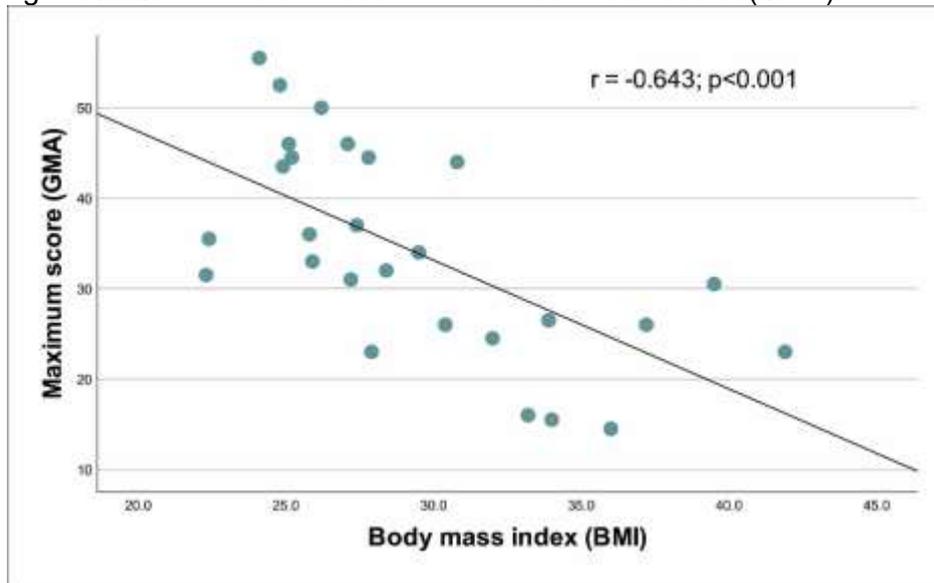
Eight pregnant women did not have detectable anti-D scores by GMA at delivery, and one patient had no score around 36 days before delivery. After estimating missing scores from samples that delivery happened before 40 weeks (or before 84 days point) using expectation maximization algorithm, a total of eleven patients had undetectable anti-D scores at delivery (Figure 4).

Figure 4 - Last sample, delivery, and undetectable anti-D scores times, per patient, described in days after anti-D administration



An inverse correlation was detected between BMI and maximum scores (GMA), when comparing BMI in isolation (Figure 5), measured at the moment pregnant woman receives anti-D ($r = -0.643$; $P < 0.001$) as well as classifying pregnant women by their nutritional status, based on BMI by gestational age ($r = -0.620$; $P < 0.001$).

Figure 5 - Correlation between maximum values of score (GMA) and BMI



Abbreviation: GMA - Gel microcolumn assay; BMI - Body mass index

Among the 24 neonates with blood type identified, 37.5% (n=9) were RhD-negative. When comparing ABO blood typing, 13 mother-neonate pairs presented identical ABO group, 4 were compatible ABO (mother type A or B and neonate O) and 6 presented ABO incompatibility.

The following investigations were performed comparing maximum score values from GMA with these following variables. No difference was detected between: a) pregnant women whose fetuses were RhD-positive and whose fetuses were RhD-negative ($P=0.479$); b) pregnant women whose ABO blood type was incompatible with fetus and the group with compatible blood typing ($P=0.483$).

DISCUSSION

Antenatal and postnatal anti-D immunoprophylaxis has been widely used in several countries, reducing the incidence of immunization to 0.2 to 0.3%.^[9]

In the present study, anti-D titration results were reported by means of the titer and score. The decision to report the two values aimed to demonstrate the most used measure in clinical practice (titer) and the one that provides more discriminated information (score).

All pregnant women received anti-D within recommended period (28-34 week) and 81% received anti-D before gestational week 30. The longest time was 31+4 weeks of pregnancy. However, during patients' recruitment, after an initial invitation, 15 pregnant women could not be included in the study since they did not receive anti-D. Reasons were lack of necessary exams prior anti-D prescription; pregnant women who did not receive anti-D, even though it was prescribed (by own decision or shortage of anti-D); and prescription not performed, even with essential exams available. Pegoraro et al.^[1] estimated on average 50% of pregnant women worldwide who need pre and postnatal anti-D immunoprophylaxis do not receive it, mainly due to the unavailability, difficulty in access and lack of awareness about the relevance of anti-D.

Results of anti-D titrations by CTT and GMA are in agreement with pharmacokinetic studies, which reported highest concentrations at 3-10 days after administration.^[10–13] There was a high divergence between samples of different pregnant women at the same time point, especially in GMA analysis, such as in 3-day time (scores ranged 3-52.5). Large discrepancies were also reported by Tiblad et al.,^[13] who noticed maximum concentrations ranging from 9 to 58 ng/mL by flow cytometric quantification.

We noticed a large disparity between titers obtained by CTT and GMA (in some cases, four dilutions: CTT= 2 and GMA= 32). Three to eight dilutions greater in GMA than in CTT were likewise reported by other authors when analyzing alloimmunized patients.^[14, 15] Nonetheless, equivalent levels or one to two differences in dilution by the two methods were also detected.^[16, 17] Although it is not possible to differentiate through CTT or GMA which type of antibody is being titrated (whether from anti-D prophylaxis or due to alloimmunization)^[18] the results of this study may be useful to corroborate this discernment. When analyzing titers obtained in our samples, a maximum value of 2 is detected in CTT and 32 in GMA. However, when alloimmunized patients are titrated, the titers obtained in CTT and GMA are generally higher. In cases of titers smaller than 16 to 32, it is usually not correlated to adverse perinatal outcomes. It requires antenatal supervision, but less mandatory distinguishing between alloimmunization and anti-D.^[14] Criteria such as these do not discriminate antibody source, since it is not possible to exclude an alloimmunized pregnant woman with low titers. On the other hand, in cases of titers higher than 64 in GMA and 8-16 in CTT there is a high probability of being an alloimmunization, since these levels were not reached in the titration of anti-D.^[19] It is also important to monitor titers throughout pregnancy, re-analyzing samples after 3-4 weeks (whenever possible in parallel with previous sample), since if antibody were prophylactic, it is likely titer has declined, as demonstrated. When sample is from alloimmunization, titer is expected to have increased after contact with antigen.^[18]

We notice an inverse correlation between weight gain and reduction of maximum anti-D levels. Studies with prenatal^[10, 11] and postpartum^[20] anti-D administration also demonstrated a relationship between lower anti-D concentrations in patients with higher BMI (>28 to 30, depending on gestational age).

When maximum scores obtained from GMA was analyzed, there was no difference between women who gave birth to RhD-positive newborns and those whose fetuses were RhD-negative. No difference was also reported by other authors in relation to average number of days after anti-D that titer was no longer detectable[21] and half-life of anti-D[10]. Even not detecting statistical difference, some pregnant women with RhD-positive fetuses had lower scores than remaining group. Considering FMH does not occur in all pregnancies, it is possible that only some cases of RhD-positive fetuses would result in a consumption of anti-D and, consequently, the mean between the two groups would be similar as detected. This assumption, although not investigated, could explain these results.

Mother-fetus ABO incompatibility did not result in higher anti-D scores, as reported by MacKenzie et al.[11] This hypothesis was based on partial protection against RhD alloimmunization by ABO incompatibility: in this case, a smaller amount of anti-D would be spent to sensitize only fetal RBCs that had not been destroyed through sensitization by ABO antibodies. Whether this was a true hypothesis, not having this correlation could likewise be justified due to FMH not occurring significantly in all pregnancies.

More than one third participants had RhD-negative fetuses. In these cases, anti-D administration was not necessary, as there will be no possibility of maternal sensitization by fetal RhD antigen, subjecting pregnant woman to a blood product and its tiny risks in an unnecessary way, in addition to the expendable cost of anti-D.[2] Replace anti-D supply expenses in pregnant women with RhD-negative fetuses by noninvasive prenatal testing, although might not reduce costs, brings significant benefits for perinatal care.[9, 22–24] Another measure is recombinant anti-D[25] as a substitute for anti-D currently produced from human plasma, which, despite all widely proven safety, does not extinguish minimum risks inherent of a blood product. However, until these techniques can be universally offered, HDFN prophylaxis by administering anti-D immunoglobulin to all RhD-negative pregnant women with positive or unknown RhD partner remains the gold standard for this issue.

Detectable scores were not found in eleven patients (40%) 12 weeks after anti-D (84-day point). However, if we consider score values lower than 3 as undetectable (which is the lowest observable agglutination score: a single weak reaction), only three patients (11%) would have detectable scores after 12 weeks of anti-D administration. Similar data were noticed by MacKenzie et al.[11], where one third of the patients did not present detectable values after a two 100 µg dose regimen. Unlike the results shown, research conducted by Tiblad et al.[13] detected 9 out of 12 pregnant women (75%) still present detectable levels of anti-D at the 40th week of pregnancy.

A limiting point of the study was convenience sampling. Despite having a remarkably diverse sample of patients, this can restrict results generalization to the entire population.

In conclusion, since there is a considerable percentage of parturients with zero scores at delivery, suggesting a significant period without prophylactic coverage, we recommend future studies to analyze this impact on perinatal outcomes.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

ACRS: Project development. Data collection and management. Data analysis. Manuscript writing

FLSS, GD: Project development. Data analysis. Manuscript editing

SMQ, RCC, ACM: Data analysis. Manuscript editing

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 88882.179989/2018-1, and by the Foundation for the Support of Teaching, Research and Service of the University Hospital (FAEPA) - Finance Code 1504/2017.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Pegoraro V, Urbinati D, Visser GHA, et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to Rh(D) incompatibility: A preventable disease that still produces significant morbidity and mortality in children. *PLoS One*. 2020;15:e0235807.
- [2] Guiver J, Wright G. Routine antenatal management later in pregnancy. *Obstet Gynaecol Reprod Med*. 2019;29:164–169.
- [3] Bennardello F, Coluzzi S, Curciarello G, Todros T, Villa S. Recommendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. *Blood Transfus*. 2015;13:109–134.
- [4] Moise KJ. Fetal anemia due to non-Rhesus-D red-cell alloimmunization. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13:207–214.
- [5] Agrawal A, Hussain KS, Kumar A. Minor blood group incompatibility due to blood groups other than Rh(D) leading to hemolytic disease of fetus and newborn: a need for routine antibody screening during pregnancy. *Intractable Rare Dis Res*. 2020;9:43–47.
- [6] Geaghan SM. Diagnostic laboratory technologies for the fetus and neonate with isoimmunization. *Semin Perinatol*. 2011;35:148–154.
- [7] Harmening D. *Modern blood banking and transfusion practices*. 7th ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2019.
- [8] Atalah E, Castillo C, Castro R, Aldea A. Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas. *Rev Med Chil*. 1997;125:1429–1436.
- [9] Clausen FB, Hellberg Å. External quality assessment of noninvasive fetal RHD genotyping. *Vox Sang*. [preprint] 12 March 2020. DOI: 10.1111/vox.12908.
- [10] Bichler J, Schöndorfer G, Pabst G, Andresen I. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2003;110:39–45.
- [11] MacKenzie IZ, Roseman F, Findlay J, et al. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2006;113:97–101.
- [12] Sinclair CJ, Brooks W, Genereux MG. Comparative pharmacokinetics of liquid and lyophilized formulations of IV RhIG immune globulin. *Biologicals*. 2008;36:256–262.
- [13] Tiblad E, Wikman A, Rane A, Jansson Y, Westgren M. Pharmacokinetics of 250 µg anti-D IgG in the third trimester of pregnancy: an observational study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012;91:587–592.
- [14] Krishnan V, Shenoy V, Sunny S, et al. Defining critical antibody titre in column agglutination method to guide fetal surveillance. *Transfus Apher Sci*. 2020;59:102732.
- [15] Novaretti MCZ, Jens E, Pagliarini T, Bonifacio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti-D titration. *Clin Lab Haematol*. 2003;25:311–315.
- [16] Finck R, Lui-Deguzman C, Teng SM, Davis R, Yuan S. Comparison of a gel microcolumn assay with the conventional tube test for red blood cell alloantibody titration. *Transfusion*. 2013;53:811–815.
- [17] Flesiopoulou I, Pouliakis A, Politou M, et al. Red Blood Cell Alloantibody Titration - Does the Titration Method Matter? *Clin Lab*. [preprint] 1 June 2020. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.191021.
- [18] Szkotak AJ, Lundy B, Nahirniak S, Clarke G. Interpretation of pretransfusion testing in obstetrical patients who have received antepartum Rh immunoglobulin prophylaxis. *Vox Sang*. 2016;110:51–59.
- [19] Irving C, Crennan M, Vanniasinkam T. Can serological methods help distinguish between prophylactic and alloimmune anti-D? *Transfus Med*. 2017;27:362–368.
- [20] Woelfer B, Schuchter K, Janisiw M, Hafner E, Philipp K, Panzer S. Postdelivery levels of anti-D IgG prophylaxis in D- mothers depend on maternal body weight. *Transfus Pract*. 2004;44:512–517.
- [21] Eklund J, Hermann M, Kjellman H, Pohja P. Turnover rate of anti-D IgG injected during pregnancy. *BMJ*. 1982;284:854–855.
- [22] Schmidt LC, Cabral ACV, Faria MA, Monken F, Tarazona-Santos E, Martins ML. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian

- population. *Genet Mol Res.* 2014;13:799–805.
- [23] Ryczek E, White J, Carolan-Rees G. Implementation of high-throughput non-invasive prenatal testing for fetal RHD genotype testing in England: Results of a cross-sectional survey of maternity units and expert interviews. *Transfus Med.* [preprint] 11 June 2020. DOI: 10.1111/tme.12702.
- [24] Darlington M, Carbonne B, Mailloux A, et al. Effectiveness and costs of non-invasive foetal RHD genotyping in rhesus-D negative mothers: a French multicentric two-arm study of 850 women. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018;18:496.
- [25] Mayekar RV, Paradkar GV, Bhosale AA, et al. Recombinant anti-D for prevention of maternal-foetal Rh(D) alloimmunization: a randomized multi-centre clinical trial. *Obstet Gynecol Sci.* 2020;63:315–322.

Supporting information

Table S1 – Anthropometric and gestational information of the participants

Patient	Age (years)	BMI (kg/m ²)	Nutritional status	Gestational history	Gestation age (weeks ^{+days})	
					At anti-D administration	At delivery
A	24	27.4	Normal	G1 A0	28 ⁺²	39 ⁺³
B	22	30.4	Overweight	G1 A0	31 ⁺⁴	40 ⁺³
D	38	34.0	Obesity	G3 A0	28 ⁺³	39 ⁺⁴
E	18	24.9	Normal	G2 A0	28 ⁺¹	40 ⁺³
F	24	22.4	Underweight	G2 A0	28 ⁺³	40 ⁺⁴
G	36	27.9	Normal	G6 A0	29 ⁺⁵	39 ⁺²
H	29	29.5	Overweight	G1 A0	28 ⁺⁶	39 ⁺³
I	31	27.1	Normal	G2 A0	29 ⁺¹	38 ⁺¹
J	21	27.2	Normal	G2 A0	29 ⁺¹	41 ⁺²
K	24	28.4	Overweight	G2 A1	31 ⁺¹	38 ⁺⁶
L	30	25.8	Normal	G3 A0	28 ⁺²	37 ⁺³
M	29	41.9	Obesity	G2 A0	28 ⁺³	39 ⁺³
N	33	25.9	Normal	G1 A0	30 ⁺⁰	40 ⁺³
O	24	33.9	Obesity	G1 A0	28 ⁺⁰	37 ⁺¹
P	27	24.8	Normal	G2 A0	28 ⁺³	39 ⁺⁴
Q	19	33.2	Obesity	G1 A0	30 ⁺⁶	35 ⁺⁵
R	27	27.8	Overweight	G1 A0	29 ⁺¹	40 ⁺⁶
S	36	36.0	Obesity	G1 A0	28 ⁺⁰	38 ⁺²
T	26	22.3	Underweight	G3 A1	29 ⁺⁵	37 ⁺⁴
U	26	37.2	Obesity	G1 A0	28 ⁺²	37 ⁺⁶
V	25	26.2	Normal	G1 A0	29 ⁺²	38 ⁺⁵
W	23	24.1	Normal	G3 A0	29 ⁺⁴	36 ⁺⁰
X	22	39.5	Obesity	G2 A0	30 ⁺⁴	40 ⁺⁰
Y	23	32.0	Overweight	G1 A0	28 ⁺⁵	38 ⁺⁶
Z	38	25.2	Normal	G3 A1	28 ⁺²	41 ⁺²
AA	17	25.1	Normal	G1 A0	28 ⁺³	39 ⁺⁴
AB	30	30.8	Overweight	G1 A0	28 ⁺⁴	41 ⁺³
Mean:	26.74	29.29		1.85*	29.09	39.17
(SD):	(5.83)	(5.15)		(1.13) *	(1.00)	(1.53)

Abbreviation: BMI - Body mass index; G - Gravidity; A - Abortions; SD - Standard deviation

(*) Mean and SD refer to the number of pregnancies

