

PADRONIZAÇÃO DA TITULAÇÃO DO ANTI-D NA ROTINA PRÉ-NATAL.

STANDARDIZATION OF THE TITRATION OF ANTI-D IN ROUTINE PRENATAL.

¹SOUZA, M.C.S.; ²INÁCIO, J.C.; ³DEFFUNE, E.

¹*Graduanda em Biomedicina – Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos – UNIFIO*

²*Bióloga, Imuno-hematologista, Doutora em Imunologia Geral pelo Programa de Bases Gerais da Cirurgia – FMB Unesp. Docente da Faculdade de Medicina de Jaú – UNOESTE.*

³*Médica, Hematologista e Hemoterapeuta, Doutora em Imunologia Clínica pela Universidade Pierre et Marie Curie – IV – Paris. Docente do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.*

RESUMO

A Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) é caracterizada por aloimunização por antígenos de grupos sanguíneos do feto que são ausentes nas hemácias maternas. A hemólise dos eritrócitos fetais é causada por anticorpos da classe IgG que atravessam a barreira placentária causando sensibilização eritrocitária acelerando sua destruição. Devido a possibilidade de sensibilização que podem levar a produção destes anticorpos, todas as gestantes devem realizar acompanhamento através da realização da Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) e tipagem sanguínea. Quando detectado a presença do aloanticorpo de especificidade anti-D, deve-se complementar o diagnóstico através da titulação de anticorpos, em geral considera-se significativo um título maior ou igual a 32 que representa uma indicação para amniocentese. Considerando a relação entre o título do anticorpo da gestante e a severidade clínica da doença, o objetivo deste trabalho foi avaliar a importância da padronização quanto a melhor técnica para a realização da titulação do anticorpo no laboratório de Imunohematologia do paciente do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Unesp Botucatu. Foram retituladas 73 amostras e os resultados foram os seguintes: 46,7% apresentaram diferença inferior a duas diluições, 33% diferença inferior a três diluições e 20% diferença inferior a uma diluição quando comparadas as titulações realizadas anteriormente em gel-teste. Resultados foram relacionados os diferentes títulos com os dados clínicos das pacientes e/ou do recém-nascido.

Palavras-chave: Aloimunização. Doença Hemolítica Perinatal. Titulação de Anticorpos.

ABSTRACT

The hemolytic diseases (DHPN) is characterized by maternal alloimmunization by ABO incompatibility and blood group antigens of the fetus that are absent in maternal erythrocytes. The hemolysis of fetal erythrocytes is caused by IgG antibodies crossing the placenta and sensitize the fetal erythrocytes accelerating its destruction. Because of the possibility of awareness that can lead to production of these antibodies, all pregnant women should conduct monitoring over the implementation of irregular antibody screening (PAI) and blood typing. When detected the presence of alloantibody specificity of anti-D, one should supplement the diagnosis by serological test that can be accomplished by methods that use human globulin (AHG), generally considered to be significant a title greater than or equal to 32 This represents an indication for amniocentesis. Considering the relationship between the title of the antibody of the mother and the severity of clinical disease, the objective was to evaluate the importance of standardization as the best technique for carrying out the titration of antibody in the laboratory of the patient and Immunohematology Hospital das Clínicas Unesp Botucatu – Brazil. It were 73 samples were re-titred and the results were as follows: 46.7% had a difference of less than two dilutions, 33% difference of less than three dilutions and 20% differ by less than one dilution when compared to the previously titrated in gel-test, these results lead us to highlight the need to correlate the different titles with the clinical data of patients and / or the newborn.

Keywords: Alloimmunization. Hemolytic Diseases. Titration of Antibodies.

INTRODUÇÃO

A Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) é uma doença de fetos e recém-nascidos, ou seja, afecção imunológica causada pela passagem, através da placenta, de anticorpos maternos específicos para antígenos, de origem paterna, presentes nas hemácias do concepto escassando o seu tempo de vida.^{1, 2, 3} Os anticorpos que reagem em um teste de Antiglobulina Indireto (Coombs Indireto) a 37°C, têm potencial para causar DHPN. Praticamente todos os anticorpos antieritrocitários podem ser enquadrados em um dos 29 sistemas de grupos sanguíneos já conhecidos, sendo o Sistema Rh o mais imunogênico e complexo após o ABO. Embora a DHPN causada pela incompatibilidade ABO seja a mais comum, ela apresenta caráter benigno, pois raramente é grave e em raras exceções provoca anemia.^{4, 5, 6} O sistema Rhesus (Rh) de grupo sanguíneo é responsável por 95% dos casos de DHPN além de ser bastante amplo, perdendo em complexidade apenas para o HLA, já sendo descrito perto de 50 antígenos ligados ao sistema Rh. Portanto somente 5 sorotipos estão envolvidos com formas clinicamente significantes na DHPN: D,C,c,e, sendo o D o mais implicado nos casos de aloimunização onde na maioria dos casos manifesta a DHPN de maneira severa devido a alta antigenicidade deste antígeno, possibilitando a produção de altos títulos de anticorpos promovendo acentuada destruição das hemácias do feto.^{6, 7, 9, 10}

Para que um antígeno de grupo sanguíneo possa causar uma resposta imunológica capaz de produzir anticorpos responsáveis por DHPN, é necessário que possua uma força antigênica, que lhe é dada por suas características, dentre as quais sobressaem a sua expressividade e o número de sítios antigênicos na hemácia do feto e nas do recém-nascido.^{5, 11, 12, 13} O estímulo antigênico produzido pelos grupos sanguíneos capaz de produzir aloimunização materna pode ocorrer por gestação, cujos fetos expressam em suas células sanguíneas antígenos exclusivamente de origem paterna, os quais podem chegar à circulação da mãe durante a gestação ou no parto. Outra maneira de sensibilização é por hemoterapia, que ocorre quando a mulher, em qualquer época da sua vida, recebeu um sangue incompatível através de transfusão.^{5, 14, 15, 16} Ao ser cruzada a placenta, a partir da 10ª semana de gestação, os anticorpos de IgG maternos dirigidos contra antígenos eritrocitários desencadeiam um processo de hemólise imunomediada que resulta em anemia fetal.⁶ Até a 12ª semana de gestação essa transferência é pequena e ocorre de forma lenta. Porém a partir da 24ª semana de gestação o teor de IgG no feto é de 1,8 g/L e daí até o

termino, o seu crescimento é exponencial.^{5, 12} O grau de hemólise por DHPN depende da quantidade de hemácias sensibilizadas por IgG e/ou complemento, para induzir a fagocitose, as células devem ter sido sensibilizadas por 1000-4000 moléculas de IgG1 ou 135-500 moléculas de IgG3, o mesmo não se pode afirmar das subclasses IgG2 e IgG4, cuja capacidade de ligação aos receptores dos macrófagos é fraca ou nula.^{5, 17, 18}

Deve-se estabelecer um protocolo para o acompanhamento de gestantes e do recém-nascido visando o diagnóstico, a previsão e acompanhamento da doença realizando os seguintes exames: tipagem sanguínea ABO/Rh, pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), identificação de anticorpos irregulares (IAI) e a titulação de anticorpos irregulares nas amostras de gestantes; e nas de RN a tipagem sanguínea ABO/Rh, o teste de Coombs direto (TAD) e o eluato.^{17, 19, 20} A PAI deve ser realizada para todas as gestantes, se um anticorpo é identificado e ele está associado ao desenvolvimento de DHPN, então uma titulação deve ser obtida.^{21, 23} O transporte de IgG pela barreira placentária pode resultar em títulos de anticorpos mais elevados no feto com relação aqueles da mãe, o que nem sempre se associa a hemólise perinatal.^{21, 22, 24, 25} Quando detectado a presença do aloanticorpo de especificidade anti-D, deve-se complementar o diagnóstico através da titulação de anticorpos que pode ser realizada por métodos que utilizam antiglobulina humana (AGH), em geral considera-se significativo um título maior ou igual a 32 que representa uma indicação para amniocentese. A amniocentese é um procedimento obstétrico considerado invasivo no qual pode ocorrer hemorragia feto-materna e, conseqüentemente, nos casos de incompatibilidade sanguínea, a aloimunização. O título do anticorpo não pode prever a gravidade da DHPN, em algumas gestantes sensibilizadas este pode permanecer moderadamente alto durante toda a gravidez enquanto o feto fica cada vez mais gravemente afetado²⁶. Em outras pacientes o título pode subir rapidamente desencadeando o aumento da gravidade da doença. Porém o título do anticorpo é um alerta para a complementação do diagnóstico de provável sofrimento fetal através de outros exames como por exemplo a análise da velocidade do pico sistólico da artéria cerebral média fetal (MCA-PSV) realizada através de Ultrassonografia com dopplerfluxometria²⁷. Considerando a relação entre o título do anticorpo da gestante e a severidade clínica da doença, o objetivo deste trabalho foi avaliar a importância da padronização quanto a melhor técnica para a realização da titulação do anticorpo no

laboratório de Imunohematologia do paciente e Hemobiologia Perinatal do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Unesp Botucatu.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo de 73 amostras obtidas da soroteca de 28 gestantes provenientes do Hospital das Clínicas de Botucatu e outros hospitais da região, cujas PAI apresentaram positividade e confirmada a presença de aloanticorpos de especificidade anti-D, no período de abril de 2014 a julho de 2018. Comparamos os resultados das titulações realizadas anteriormente em nosso serviço pela técnica em gel-teste DIAMED® com a retitulação realizada em tubo utilizando AGH.

Os títulos foram determinados para as amostras de sangue das gestantes que possuíam aloanticorpos identificados. As Hemácias de triagem (Imunocel I ou II) usadas foram as que expressavam o antígeno correspondente à especificidade do aloanticorpo irregular detectado. Além das hemácias de triagem (Imunocel I ou II), foi usado o Soro de AGH da DiaMed®. Para a titulação dos aloanticorpos o plasma foi diluído seriadamente em solução salina 0,9% (por exemplo, 1:2 até 1:2048). Para isso, 11 tubos foram identificados de acordo com a diluição do plasma. Em cada tubo foram colocados 100 µL de soro fisiológico 0,9%.

No primeiro tubo foram adicionados 100 µL de plasma da gestante. E com auxílio da pipeta, a mistura foi levemente homogeneizada e foram retirados, do tubo, 100 µL para adicionar no tubo seguinte e assim, sucessivamente. Ao final, do primeiro ao penúltimo tubo foram adicionados 50 µL da suspensão de hemácias selecionadas para a titulação. O tubo 11 foi reservado para ser utilizado nos casos onde ocorreu aglutinação até o tubo 10, para dar continuidade às diluições. Os tubos foram levemente homogeneizados e incubados por 30 minutos, à 37°C. Após, foram lavados com soro fisiológico 0,9% por três vezes. Após a terceira lavagem, o sobrenadante foi decantado e pipetado 100 µL de Soro de AGH, em cada tubo. Novamente os tubos foram centrifugados com rotação de 3500 rpm, durante 15 segundos. Após a centrifugação, cada tubo foi levemente homogeneizado para ser observada a aglutinação. Para cada reação, encontrada nas diferentes diluições, foi atribuído valor em “cruzes”.

RESULTADOS

Foram retituladas 73 amostras e os resultados foram os seguintes: 46,7% apresentaram diferença inferior a duas diluições, 33% diferença inferior a três diluições e 20% diferença inferior a uma diluição quando comparadas as titulações realizadas anteriormente em gel-teste.

De acordo com esses resultados, evidenciamos a necessidade de correlacionar os diferentes títulos com os dados clínicos das pacientes e/ou recém-nascidos, porém devido a interrupção do acompanhamento gestacional e realização dos partos em outros serviços, não foi possível realizar a correlação de todas as pacientes cujas amostras foram submetidas a essa pesquisa.

No entanto 25% das pacientes mantiveram acompanhamento pré-natal e os partos foram realizados no nosso serviço. Das 18 pacientes, 10 apresentavam título \geq 32 quando esses eram realizados em gel-teste, porém a retitulação em tubo mostrou uma diferença inferior a 2 diluições, resultado este que se encaixa perfeitamente com os dados clínicos e procedimentos descritos nos prontuários, dessas 10 pacientes nenhuma foi submetida a amniocentese, 2 dos recém-nascidos apresentaram um discreto aumento da taxa de bilirrubina, porém esse quadro foi involuído com procedimentos clínicos não invasivos e sem necessidade de intervenção terapêutica com transfusão sanguínea e/ou transfusão intra uterina no período pré-natal.

CONCLUSÃO

Esse conjunto de resultados nos leva a concluir que a técnica clássica de titulação de anticorpos em tubo apresenta maior segurança e confiabilidade nos resultados imunohematológicos. Sabemos que o título do anticorpo pode não prever a gravidade da DHPN, porém um resultado superestimado pode interferir de forma negativa na conduta terapêutica com a indicação de um procedimento invasivo desnecessário como a amniocentese.

REFERÊNCIAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ARAÚJO, MA, DEFFUNE E, CARLOS LMB, MAGALHÃES SMM, GOLIM MA, CÂMARA LMC. Avaliação das subclasses IgG1 e IgG3 na doença hemolítica perinatal. **Rev Bras Hematol Hemoter**. p. 25, n. 4, p. 201-206, 2013.

AVENT ND, REID ME. The Rh blood group system: a review. **Blood Transfus**. v.95, n.2, p. 375-87, 2000;

BAIOCH E, CAMANO L, BORDIN JO, AVRITSHER AP, ANDRADE CM, TRAINA E. Porque usamos imunoglobulina anti-D em excesso no abortamento precoce? **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 26, n.5, p. 363-367, 2004.

BENACHI, A. , COSTA, J. AND VIVANTI, A. What if(2019), no Rh D prophylaxis is given after CVS and amniocentesis?. BJOG: Int J Obstet Gy. Accepted Author Manuscript. doi:[10.1111/1471-0528.15915](https://doi.org/10.1111/1471-0528.15915)

CABRAL, ACV, PEREIRA AK, ASSREUY SS, TAVEIRA MR. Isoimunização materna e Doença Hemolítica Perinatal: Realidade e perspectivas. **Rev Brás Ginecol Obstet**. v.108, p. 181-185, 2018.

CAVALCANTE FO. **Presença de aloanticorpos eritrocitários e gestantes Rh negativo, atendidas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas** (Tese). Amazonas: Universidade Federal do Amazonas; 2005

DANIELS G, POOLE J, DE SILVA M, CALLAGHAN T, MACLENNAN S, SMITH N. The clinical significance of blood group antibodies. **Transfus Med**. v.12, n. 5, p. 287-95, 2012.

FLEGEL WA. The genetics of the Rhesus blood group system. **Blood Transfus**. v. 5, n. 2, p. 50-57, 2017.

Gambero S, Secco VNDP, Ferreira RR, Deffune E, Machado PEA. Frequência de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. **Rev Bras Hematol Hemoter**. p. 26, n.1, p. 28-34, 2004.

GEHA R, ROSEN F. **Estudo de casos em Imunologia**: Um guia clinico. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.

GIRELLO AL, KUHN TIB. **Fundamentos da imunohematologia eritrocitária**. São Paulo: Senac; 2002.

GUYTON MD, HALL JE. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 1998.

HARMENING DM. **Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. 4ª ed. Rio de Janeiro; Revinter; 2006.

JOHNSON & JOHNSON. **Antígenos e anticorpos de grupos sanguíneos aplicados à Doença Hemolítica Perinatal**. 2ª ed. São Paulo; Divisão Diagnóstica da Johnson's; 1976

JUNQUEIRA PC. **Doença Hemolítica Perinatal**. São Paulo: Editora Andrei; 1991.

LOBATO G, SONCINI CS. Relationship between obstetric history and Rh (D) alloimmunization severity. **Arch Gynecol. Obstet.** v. 277, p. 245- 248, 2008.

LOBO GA, NARDOZZA LM, CAMANO L. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. **Int J Gynaecol Obstet.** v. 94, n. 2, p.139-40, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA EXECUTIVA. **Gestante de alto risco**. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.

MOISE KJJR. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. **Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.** v. 92, n.1, p. 75-81, 2000.

MONTENEGRO CAB, FILHO JR. **Obstetrícia fundamental**. 11ª ed. São Paulo. Guanabara Koogan; 2008.

MURRAY JC, KARP LE, WILLIAMSON RA, CHENG EY, LUTHY DA. Rh isoimmunization related to amniocentesis. **Am J Med Genet.**; v.16, n. 4, p. 527-534, 1983.

NARDOZZA LM, LOBO GR, MORON AF, CAMANO L, ARAUJO E JR, GUIMARÃES FILHO HA. Anti-Lewis alloimmunization: report of seven cases. **Clin Exp Obstet Gynecol.** v.35, n. 4, p. 311-12, 2008.

NARDOZZA LMM, CAMANO L, MORON AF, PARES DBS, CHINEM PA, LOBO GAR. Alterações ultrassonográficas na gravidez Rh negativo sensibilizada avaliada pela esctrofotometria do líquido amniótico e pela depplervelocimetria da artéria cerebral média. **Radiol Bras.** v. 39, n. 1. p.11-13, 2016.

SÁ CAM, SANTOS MCP, CARVALHO M, MOREIRA MEL. Eventos adversos associados a exsanguíneotransusão na doença hemolítica perinatal: experiência de dez anos. **Rev Paul Pediatr.** v.27, n. 2, p.168-72, 2009.

SADLER TW. LANGMAN: **Embriologia Médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2005.

SCHUMACHER B, MOISE KJ JR. Fetal transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. **Obstet Gynecol.**, v. 88,n.1, p. 137-50, 1996

SILVA JLP, CECATTI JG, SERRUYA SJ. A qualidade do pré-natal no Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 27, n. 1, p. 103-105, 2005.