

## Influência da classificação sanguínea realizada em lâmina sobre a administração profilática de imunoglobulina anti-D em pacientes obstétricas

*Influence of blood classification performed in glass slide on the administration of prophylactic immunoglobulin anti-D in obstetric patients*

Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra<sup>1</sup>, Fabrício Andrade Martins Esteves<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biomédica da Associação Caruaruense de Ensino Superior. <sup>2</sup>Mestre e Professor Assistente de Imunohematologia da ASCES.

### Resumo

Cerca de 15% das mulheres são Rh negativas e podem ser sensibilizadas por seus filhos Rh positivos. A isoimunização RhD pode ser prevenida pela administração de imunoglobulina anti-D. Por esse motivo, é especialmente na população obstétrica que a classificação Rh não pode deixar dúvidas. Em 0.7% dessas classificações são encontradas hemácias D fraco, que têm uma redução no número de moléculas D na sua superfície. Dessa forma, visamos a determinar a possível presença do antígeno D fraco em gestantes, puérperas e neonatos que foram atendidos por uma maternidade no município de Caruaru (PE) e classificados como RhD negativos. Testes de Coombs indireto e direto também foram realizados para avaliar a presença de anticorpos irregulares nas gestantes e a sensibilização eritrocitária nos neonatos. Este estudo foi do tipo descritivo no qual avaliamos 29 gestantes puérperas e 14 neonatos, que foram classificadas para os sistemas ABO e RhD por meio de teste de aglutinação em lâmina. As amostras foram enviadas ao laboratório da ASCES, onde foi realizada a classificação sanguínea por meio de teste de aglutinação em tubo e pesquisa do antígeno D fraco naqueles casos que foram Rh negativos confirmados. Foram encontradas duas mães que eram D fraco, uma mãe com teste de Coombs indireto positivo e um neonato que é Rh positivo, mas tinha sido classificado como Rh negativo. Para que se possa prevenir a isoimunização RhD, é necessária a realização da classificação sanguínea e pesquisa do antígeno D fraco em gestantes, puérperas e neonatos, de modo que seu resultado seja confiável.

**Palavras-chave:** antígeno D fraco – gestantes – neonatos – isoimunização RhD; imunoprofilaxia Rh.

### Abstract

In 0.7% of blood classifications, there are RhD positive red blood cells that are not agglutinated by IgM anti-D in direct test, however it is agglutinated by the anti human globulin reagent. This variant RhD antigen is called weak D. Blood samples from pregnant and postpartum women and newborns classified as RhD negative through the technique on glass slide were sent to the Laboratory from the Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), where all samples were used to search the weak D in tube using the anti human globulin reagent. We examined 43 sanguine samples: 67.4% were pregnant or postpartum women and 32.6% were neonates. Three sanguine samples were previously classified as RhD negative were tested differently in ASCES. Two of these samples were from pregnant women and two sample from a newborn. While searching the weak D antigen in tube, we found the RhD positive phenotype in these samples. The pregnant women were weak D and the newborn was RhD positive. Pregnant women and mothers who were erroneously classified as RhD negative received endovenous immunoglobulin anti-D unnecessary. We emphasize that the newborn, incorrectly classified as RhD negative, may have caused maternal sensibilization for the D antigen since in those circumstances, the mother did not receive prophylactic endovenous immunoglobulin anti-D and the Perinatal Hemolytic Disease (PHD) may damage the fetal development in a subsequent pregnancy. It was found one maternal sample that showed positive Coombs Indirect Test. In this case, the late administration of prophylactic immunoglobulin anti-D was unable to prevent the maternal isoimmunization. We could observe that there are still serious problems in the blood RhD sanguine classification and the technique in tube, using the anti human globulin reagent, provides greater security and can elucidate the RhD phenotype, a condition that can prevent maternal sensitization, incorrect administration of immunoglobulin anti-D and prevent the PHD.

**Keywords:** D weak antigen - Pregnant woman Newborn - RhD isoimmunization - Rh immunoprophylaxis.

### INTRODUÇÃO

O Sistema Rh é composto por 46 antígenos eritrocitários transmembranares, sendo o antígeno D o de maior antigenicidade (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005; LEWIS; BAIN; BATES, 2006; BAIACHI et al.,

2007). Os antígenos do Sistema Rh começam a ser expressos na 6ª semana de gestação, já estando bem desenvolvidos antes do nascimento (BAIACHI et al., 2007).

Cerca de 15% das mulheres são Rh negativas e podem ser sensibilizadas por seus filhos que forem Rh positivos (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005). Elas, quando sensibilizadas, produzem anticorpos IgG anti-D que podem ultrapassar a barreira placentária promovendo a opsonização das hemácias fetais (HARMENING, 2006; BAIACHI et al., 2007). A isoimu-

Recebido em 07 de outubro de 2009; revisado em 05 de dezembro de 2010.

Correspondência / Correspondence: Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra. Av. Marcionilo Francisco da Silva, 315/301 - Maurício de Nassau. 55016-620, Caruaru - Pernambuco - Brasil. Tel: (81) 3721-0929. E-mail: katarinamoraes@hotmail.com

nização RhD pode ser prevenida pela administração de imunoglobulina anti-Rh (RhIg), impedindo a sensibilização materna (SACHER ; MCPHERSON, 2002). Apenas as gestantes puérperas Rh negativas que tiveram abortamento precoce ou filhos Rh positivos devem receber a RhIg.

Devido à isoimunização e à possibilidade de neutralizá-la, é especialmente na população obstétrica que a classificação Rh não pode deixar dúvidas. Em 0.7% dessas classificações são encontradas hemácias com antígeno D fraco (*Du* ou *D weak*), que são expressos em déficit qualitativo ou quantitativo na membrana eritrocitária (LEWIS; BAIN; BATES, 2006; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Nosso objetivo foi determinar a possível presença do antígeno D fraco em puérperas e neonatos que foram atendidos por uma maternidade no município de Caruaru (PE) e classificados como RhD negativo pelo teste em lâmina, rotineiramente executado pelo serviço em questão. Testes de Coombs indireto e direto também foram realizados para avaliar a presença de anticorpos irregulares nas gestantes puérperas e (ou) uma possível sensibilização eritrocitária nos neonatos, respectivamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética da Associação Caruaruense de Ensino Superior e ocorreu entre agosto de 2007 e agosto de 2008. Participaram dele 43 pacientes, sendo 29 (67.4%) gestantes puérperas e 14 (32.6%) neonatos. Todos foram atendidos por uma maternidade no município de Caruaru.

A coleta sanguínea dos pacientes foi feita na maternidade, por profissional devidamente capacitado. Para a realização da classificação sanguínea e do Teste de Coombs direto, foram colhidos 3ml de sangue periférico em tubo com o anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA); para Coombs indireto, foram colhidos, em tubo seco, 3 ml de sangue por meio de punção venosa. A maternidade encaminhou as amostras para o laboratório de um hospital local da rede pública, sendo ele o responsável pela classificação sanguínea e pelo teste de Coombs. As amostras classificadas como Rh negativas pelo laboratório da rede pública, através da técnica direta em lâmina, foram encaminhadas ao Laboratório de Imunohematologia da ASCES e preservadas sob refrigeração a 4°C até seu processamento por meio da técnica em tubo.

Todas as amostras tiveram sua classificação sanguínea repetida. A determinação do grupo sanguíneo ABO foi realizada pela técnica direta em tubo, com o emprego de soros monoclonais anti-A, anti-B e anti-AB. A tipagem RhD foi realizada inicialmente com soro monoclonal anti-D (fase salina à temperatura ambiente). Quando a aglutinação do tubo com anti-D foi muito fraca, ou não ocorreu, prosseguiu-se a pesquisa do antígeno D fraco com leitura na fase a 37°C e na fase de

Antiglobulina Humana (AGH), quando foi utilizado o soro de Coombs monoespecífico, destinado à detecção da fração gamaglobulina do soro humano.

Em amostras de soro materno foi feito o teste de Coombs indireto, utilizando-se a albumina bovina a 22%, o que reduz o potencial zeta entre as hemácias, e a AGH poliespecífica, que detecta fração gamaglobulina e não-gamaglobulina (proteínas do sistema complemento). Em amostras de neonatos, foi realizado o teste de Coombs direto, utilizando-se a AGH poliespecífica.

A pesquisa do antígeno D fraco e o teste de Coombs indireto (pesquisa de anticorpos irregulares) foi realizada segundo preconiza a Portaria nº 1376 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993). Todos os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (SBHH).

## RESULTADOS

Dos 14 neonatos avaliados, 01 (7.14%) apresentou RhD positivo na classificação sanguínea direta. Das 29 gestantes puérperas classificadas pela técnica em lâmina como Rh negativas, 02 (6.9%) demonstram-se antígeno-positivas na fase a 37°C quando da realização da pesquisa de antígeno D fraco pela técnica em tubo. O teste de Coombs direto foi realizado em 10 (71.4%) neonatos e demonstrou positividade. O teste Indireto de Coombs foi realizado em 08 gestantes puérperas (27.6%). Dentre elas, 01 (12.5%) foi positivo na fase salina, à temperatura ambiente, demonstrando que a puérpera em questão encontrava-se em fase de sensibilização recente.

Os fenótipos dos grupos sanguíneos tiveram sua frequência determinada e expressa em porcentagem relativa ao total de indivíduos avaliados. A Tabela 1 demonstra a distribuição dos fenótipos dos sistemas ABO e Rh nas gestantes puérperas avaliadas. A Tabela 2 demonstra a distribuição dos fenótipos dos sistemas ABO e Rh nos neonatos.

Todos os resultados foram processados por meio do programa *Microsoft Office Excel* versão 2003.

## DISCUSSÃO

Por ser o imunógeno de ocorrência do sistema Rh mais potente, a determinação do antígeno D em pacientes obstétricas e de seus respectivos neonatos é crítica, pois, durante a gestação ou o parto, as mães Rh negativas podem ser sensibilizadas por antígenos eritrocitários de seus filhos Rh positivos (HARMENING, 2006). As gestantes podem ser sensibilizadas especialmente durante o terceiro trimestre da gestação, e 8% a 10% desenvolvem anticorpos anti-D após a primeira gestação (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005). Nenhum outro grupo sanguíneo tem um potencial imunizante comparável (SACHER; MCPHERSON, 2002).

A entrada em circulação materna de eritrócitos fetais Rh positivos desencadeia a resposta imune primária. Ela desenvolve-se ao longo de semanas e é predominantemente constituída por grande produção de

IgM, anticorpo aglutinante que não atravessa a placenta. A resposta secundária desencadeia-se após uma nova exposição de antígeno (mínima), desenvolve-se em dias, e é constituída por aumento da produção de IgG que, por sua vez, atravessa a placenta (VICENTE et al., 2003). As principais subclasses de IgG para os antígenos do sistema Rh são a IgG1 e a IgG3, pois o sistema reticulo-endotelial elimina rapidamente da circulação as hemácias revestidas por essas imunoglobulinas. A Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN), em sua forma grave, tem estado mais frequentemente associada a anticorpos da classe IgG1 (HARMENING, 2006).

O efeito biológico mais comum desses anticorpos é a opsonização das células circulantes contendo o antígeno correspondente, o que facilita a destruição dessas células pelo sistema reticuloendotelial (SACHER; MCPHERSON, 2002). As consequências, exclusivamente fetais, devem-se à hemólise extravascular por ação hepática ou esplênica. Além da DHRN, os recém-nascidos podem apresentar anemia, hiperbilirrubinemia, hidropisia e morte (VICENTE et al., 2003).

Em 1960, Lilley (apud VICENTE et al., 2003) demonstrou que a imunização RhD podia ser prevenida pela administração passiva de imunoglobulina anti-D (Rhlg), tendo seu efeito máximo se aplicada à parturiente em até 72 horas após o parto. A imunoglobulina usada na Rhlg é da classe IgG, e o seu receptor Fc reveste as células fetais Rh positivas circulantes e aparentemente induz uma destruição esplênica acelerada, impedindo, dessa forma, a sensibilização do indivíduo em face da supressão das células B especificamente produtoras

de anti-D (VICENTE et al., 2003; SACHER; MCPHERSON, 2002). Atualmente, sabe-se que essa administração apenas suprime a resposta imunológica primária, não tendo qualquer efeito nos indivíduos em que a imunização já está estabelecida (VICENTE et al., 2003). A imunização materna e a sensibilização fetal são determinadas pelo teste de Coombs indireto e direto, respectivamente.

O teste de Coombs indireto (TCI) é realizado para detectar anticorpos clinicamente significantes direcionados aos antígenos de grupos sanguíneos, excluindo-se o sistema ABO, que possam estar presentes no soro (ALMEIDA NETO et al., 2001). No nosso estudo, o TCI foi realizado em apenas 27.6% das gestantes puérperas estudadas. Esse número reduzido ocorreu devido à falta de coleta de um tubo seco para realização desse teste. Das pacientes analisadas, uma apresentou TCI positivo na fase salina, à temperatura ambiente. Isso nos leva a crer que essa gestante puérpera possui anticorpos da classe IgM e, provavelmente, foi imunizada na hora do parto. Nesse caso, o neonato não foi acometido pelas consequências de uma incompatibilidade materno-fetal, porque essa classe de imunoglobulina é incapaz de ultrapassar a barreira placentária.

Além de identificar anticorpos irregulares, o TCI também é muito importante antes da administração da Rhlg. A administração de imunoglobulina anti-D em mulheres previamente sensibilizadas aumenta a gravidade da isoimunização (aumenta o número de anticorpos que, atravessando a placenta, produzem hemólise dos eritrócitos fetais). Uma mulher RhD negativa que não tenha anti-D, mas que seja positiva para outros anticorpos, continua a ser candidata à profilaxia com imunoglobulina (VICENTE et al., 2003).

O teste de Coombs direto (TCD) é realizado para demonstrar a sensibilização de hemácias *in vitro*, indicando a presença do eritrócito revestido por imunoglobulina ou proteínas do sistema complemento em sua superfície (BRAGA et al., 1998; CIANCARULLO; CECCON; VAZ, 2003). No nosso estudo, o TCD foi realizado em 71.4% dos neonatos. Não foi possível a realização desse teste em todos os neonatos, porque alguns possuíam difícil acesso venoso, sendo a quantidade de sangue coletada destinada e suficiente apenas para os ensaios laboratoriais essenciais para a avaliação clínica de rotina e pesquisa de antígeno D fraco pela técnica em tubo.

A prevenção adequada da isoimunização materna e de uma consequente DHRN deve-se também a uma classificação sanguínea correta. Em 0.7% das classificações sanguíneas são encontradas hemácias Rh positivas que não são aglutinadas por IgM anti-D em teste direto, mas são aglutinadas por IgG anti-D em teste de antiglobulina. Esse antígeno é denominado D fraco, e as hemácias que o possuem têm uma redução no número de moléculas D na sua superfície. (LEWIS; BAIN; BA-

**Tabela 1** – Frequências fenotípicas (FF) dos sistemas sanguíneos ABO/RhD em Gestantes puérperas do município de Caruaru (PE) (agosto /2007 – agosto/2008)

| ABO   | N  | FF(%) | RhD(+) | FF(%) | RhD(-) | FF(%) |
|-------|----|-------|--------|-------|--------|-------|
| O     | 12 | 42.3% | 02*    | 16.6% | 10     | 83.4% |
| A     | 09 | 23%   | 0      | 0     | 09     | 100%  |
| B     | 07 | 30.8% | 0      | 0     | 07     | 100%  |
| AB    | 01 | 3.9%  | 0      | 0     | 01     | 100%  |
| Total | 29 | 100%  | 02     | 6.9%  | 27     | 93.1% |

Nota: \* = duas gestante puérperas D fraco

**Tabela 2** – Frequências fenotípicas (FF) dos sistemas sanguíneos ABO/RhD em neonatos do município de Caruaru (PE) (agosto /2007 – agosto/2008)

| ABO   | N  | FF (%) | RhD(+) | FF(%) | RhD(-) | FF(%) |
|-------|----|--------|--------|-------|--------|-------|
| O     | 05 | 35.7%  | 0      | 0     | 04     | 100%  |
| A     | 06 | 42.9%  | 0      | 16.6% | 05     | 83.3% |
| B     | 02 | 14.3%  | 0      | 0     | 02     | 100%  |
| AB    | 01 | 7.1%   | 01*    | 50%   | 01     | 50%   |
| Total | 14 | 100%   | 01     | 35.7% | 12     | 85.7% |

Nota: \* = classificado como Rh negativo sendo Rh positivo

TES, 2006; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004). Foram encontradas duas gestantes puérperas que possuíam a variante fenotípica do D fraco. Nenhum neonato foi D fraco, mas um foi erroneamente classificado como Rh negativo quando da realização da técnica em lâmina, sendo este, portanto, Rh positivo quando da realização posterior da tipagem sanguínea em tubo. Assim sendo, a mãe do neonato em questão deixou de receber a imunoglobulina anti-D (RhIg) profilática para a DHRN.

O resultado da classificação sanguínea do recém-nascido realizada em lâmina mascarou a possibilidade de uma sensibilização materna. Em gestação posterior, sendo o próximo filho RhD positivo, ele poderá ser acometido pela DHRN, pois a mãe já estará desenvolvendo a resposta imune secundária.

As gestantes puérperas que demonstraram a presença de D fraco pela posterior realização da técnica da classificação em tubo tinham sido classificadas como RhD negativas pela técnica de tipagem em lâmina. Em gestações posteriores, elas poderão receber desnecessariamente a RhIg caso sejam acometidas por aborto precoce ou caso seus filhos posteriores sejam RhD positivo.

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio de seu manual técnico para Gestação de Alto Risco (BRASIL, 2000), define normas para prevenção da sensibilização pelo fator Rh(D), porém não faz qualquer menção sobre a dose de imunoglobulina anti-D a ser aplicada nas diversas situações clínicas. Aproximadamente metade das administrações de anti-D são feitas em pacientes com gestações de até 12 semanas, preconizando-se o emprego de 50 µg de anti-D (BAIOCHI et al., 2004). Essa pequena dose de imunoglobulina é capaz de neutralizar até 5 mL de sangue fetal Rh positivo e é suficiente para a reduzida volemia feto-placentária nessa época da gestação, na qual transferências feto-maternas acima de 3 mL são altamente improváveis (BAIOCHI et al., 2004; VICENTE et al., 2003). O Brasil disponibiliza apresentações farmacêuticas de doses de 300 µg de imunoglobulina anti-D. Chamamos a atenção para o fato de que, em nosso país, empregam-se doses seis vezes maiores que a dose necessária (BAIOCHI et al., 2004).

Toda imunoglobulina anti-D hoje produzida é obtida somente a partir de plasma humano, sendo, portanto, um hemoderivado, o que exige que se evite ao máximo o desperdício. Os doadores, em sua maioria, são mulheres pós-menopausadas imunizadas por gestações, bem como homens imunizados voluntariamente, mantidos em estado hiperimune por reaplicações constantes de pequenas doses de hemácias Rh positivas (BAIOCHI et al., 2004).

Como foi visto, no Brasil já há um grande desperdício de imunoglobulina anti-D. Se não for realizada uma classificação sanguínea bastante criteriosa nas gestantes e puérperas e elas continuarem a ser erroneamente classificadas como RhD negativas pela técnica de

tipagem em lâmina, a RhIg será aplicada desnecessariamente nessas pacientes, sendo ainda maior o desperdício dessa imunoglobulina. Além disso, deve-se registrar que se trata da manipulação e aplicação de um produto hemoderivado, que necessita de doadores, cada vez mais relutantes em submeter-se a algum desconforto e possíveis efeitos adversos. Para as pacientes obstétricas que recebem esse hemoderivado, também há um risco: o de adquirir uma doença infecto-contagiosa, como hepatites, chagas, sífilis, HIV. Essas pacientes também correm o risco de serem imunizadas por outros antígenos sanguíneos.

## CONCLUSÃO

A isoimunização RhD é uma das principais causas de mortalidade fetal. A eficácia da imunoprofilaxia na prevenção da isoimunização materna está comprovada, mas seu efeito correto só se dá em mães que ainda não foram imunizadas. Daí a importância da realização da classificação sanguínea, pesquisa do antígeno D fraco, teste de Coombs indireto e direto em gestantes puérperas e neonatos sem que se deixem dúvidas com relação ao seu resultado.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA NETO, C. et al. **Aplicação do método gel LISS/COOMBS na rotina de pesquisa e identificação de anticorpos irregulares de pacientes.** São Paulo: Serviços de Hemoterapia 9 de Julho, 2001. Disponível em: <[http://www.hemoterapia9dejulho.com.br/info\\_trab04.htm](http://www.hemoterapia9dejulho.com.br/info_trab04.htm)> Acesso em: 20 out. 2008.
- BAIOCHI, E. et al. Frequências dos grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO e RhD em puérperas e seus recém-nascidos. **R. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.53, n.1, p.44-46, 2007.
- BAIOCHI, E. et al. Por que usamos imunoglobulina anti-D em excesso no abortamento precoce? **R. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro**, v.26, n.5, p.363-367, 2004.
- BRAGA, G.W. et al. Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: características do teste manual direto do Polybrene. **R. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.44, n.1, p.16-20, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Gestação de alto risco: manual técnico: 3.ed.** Brasília, DF, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria nº 721/GM, de 09.08.89, que aprova Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 dez. 1993.
- CIANCARULLO, M.A.; CECCON, M.E.J.; VAZ, F.A.C. Prevalência de marcadores imuno-hematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo. **R. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.49, n.1, p.45-53, 2003.
- HARMENING, D.M. **Técnicas modernas em banco de sangue.** 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.
- LEWIS, S.M.; BAIN, B.J.; BATES, I. **Hematologia prática de Dacie e Lewis.** 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- SACHER, R.A.; MCPHERSON, R.A. **Interpretação clínica dos exames.** 11.ed. São Paulo: Manole, 2002.

12. VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e hemoterapia**. São Paulo: Atheneu, 2005.
13. VICENTE, L.F. et al. **Profilaxia da isoimunização RhD**: uma proposta de protocolo. **Acta Med. Port.**, Lisboa, v.16, p.255-260, 2003.
14. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.