

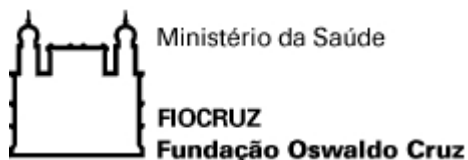


Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Fernandes Figueira  
Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher

Mapeamento das condições necessárias para a  
incorporação da genotipagem *RhD* a partir do DNA fetal  
livre no plasma materno na rotina pré-natal de gestantes  
RhD-negativo acompanhadas no SUS.

**Shirley Lopes de Castilho**

**Rio de Janeiro**



“Mapeamento das condições necessárias para a  
incorporação da genotipagem *RhD* a partir do DNA fetal  
livre no plasma materno na rotina pré-natal de gestantes  
RhD-negativo acompanhadas no SUS”.

por

Shirley Lopes de Castilho

Dissertação apresentada à Pós-  
Graduação em Saúde da Criança e  
da Mulher, como pré-requisito para  
obtenção do título de Mestre em  
Saúde Pública.

*Orientador: Prof. Dr. Saint Clair Gomes*  
*Co-orientador Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Pessoa dos Santos*

*Rio de Janeiro, Outubro de 2011*

**FICHA CATALOGRÁFICA NA FONTE**  
**INSTITUTO DE COMUNICAÇÃO E INFORMAÇÃO**  
**CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA EM SAÚDE**  
**BIBLIOTECA DA SAÚDE DA MULHER E DA CRIANÇA**

C352m Castilho, Shirley Lopes de

Mapeamento das condições necessárias para a incorporação da genotipagem RhD a partir do DNA fetal livre no plasma materno na rotina pré-natal de gestantes RhD-negativo acompanhadas no SUS. Shirley Lopes de Castilho./ Rio de Janeiro, 2011.

66f.; il.: tab.

Dissertação (Mestrado em Saúde da Mulher e da Criança) - Instituto Femandes Figueira, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

Orientador: Saint Clair Gomes.

Co-orientador: Maria Cristina Pessoa dos Santos.

Bibliografia: f.55-63.

1. Anemia hemolítica. 2. Incompatibilidade de grupos sanguíneos. 3. Planejamento estratégico. 4. Cuidado Pré-Natal, 5. Sistema Único de Saúde. I. Título.

CDD 22. ed. 616.152

## DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai que me ensinou a importância de encarar os desafios, superar meus medos e seguir com honestidade e bondade no coração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que me incentivaram e apoiaram durante a realização do mestrado em especial meus colaboradores e amigos do HEMORIO e do Hospital Maternidade Oswaldo Nazareth Maternidade.

Agradeço a todo o grupo do ensino do Instituto Fernandes Figueiras pelo acolhimento e pela oportunidade do fantástico aprendizado.

Agradeço ao departamento de Genética conduzido pelo Dr. Juan Llrena por ter aberto as portas possibilitando a realização do mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. Saint Clair Gomes pela orientação durante todo o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço de coração a minha querida amiga Maria Cristina Pessoa dos Santos por sua orientação e o incentivo constante em minha vida profissional e privada.

Agradeço a minha família mãe, irmão, sobrinhos, filhas e meninos por compreenderem minhas ausências.

Minha eterna gratidão ao meu marido Paulo Roberto Périssé pelo carinho, apoio, força e compreensão.

## RESUMO

O desconhecimento do grupo sanguíneo RhD fetal durante o período gestacional faz com que gestantes RhD-negativo tenham o mesmo acompanhamento pré-natal independente do feto ser RhD-positivo ou RhD-negativo. Assim, gestantes sem risco para o desenvolvimento de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) são mantidas no pré-natal de alto risco aumentando a taxa de ocupação destes serviços e dificultando a oferta para aquelas que realmente necessitariam de assistência especializada. Um método atual, não invasivo, a genotipagem *RhD* a partir do DNA fetal livre no plasma materno permite o conhecimento do grupo sanguíneo fetal antes do nascimento possibilitando excluir do pré-natal de alto risco gestantes com fetos sem risco para a DHPN (fetos RhD-negativos).

Este estudo objetiva mapear o Fluxo da assistência pré-natal, em especial de gestantes RhD-negativo, no Município do Rio de Janeiro visando analisar a viabilidade da incorporação da genotipagem *RhD* a partir do DNA fetal livre no plasma materno na rotina pré-natal de gestantes RhD-negativo acompanhadas no SUS.

Esta análise foi realizada aplicando o método de Planejamento Estratégico Situacional (PES) proposto por Carlos Matus. O método PES prevê quatro momentos para o processamento dos problemas. O Momento explicativo prevê o diagnóstico situacional, O momento normativo formula os objetivos e o prazo para executá-los, o Momento estratégico analisa a viabilidade dos planos e os atores envolvidos no processo e o momento operacional estabelece a execução dos planos e a avaliação das mudanças <sup>96</sup>.

Concluimos que a implantação da genotipagem *RhD* fetal utilizando o DNA livre no plasma materno e a PCR em tempo real, no SUS, é factível. O cenário atual é extremamente favorável. A preocupação das três esferas do governo com a assistência integral à saúde materna e infantil promove um leque de investimentos amplos neste segmento. A possível ação conjunta entre o governo e as instituições públicas, com expertise em desenvolvimento de métodos diagnóstico como Bio-manguinhos, possibilitaria a implantação desta tecnologia para diferentes segmentos da saúde pública no Brasil.

## ABSTRACT

The lack of knowledge about the Rh blood group during the pregnancy period make the D-negative pregnant women have the same prenatal follow-up whether the fetal blood type is D positive or D-negative.

In this way, pregnant women without risk to develop Hemolytic Disease of newborn (HDN) are kept in High Risk Prenatal Care increasing the occupancy rate of the assistance services decreasing the viability for who those really need it. Nowadays a non-invasive method, the *RHD* genotyping using free-fetal DNA from maternal plasma allows the fetal blood group knowledge before the birth. This makes possible to exclude from High Risk Prenatal Care, pregnant women with fetus without HDN risk. This study aims the understanding of prenatal care flow of D-negative pregnant women in Rio de Janeiro city trying to check the viability of the introduction of RHD genotyping test using free-fetal DNA from maternal plasma in the D-negative pregnant women in prenatal care public service. This analysis was made using strategic-situational approach of Carlos Matus. There are four (4) moments of strategic planning, according to Carlos Matus. The analytical moment describes the stage of formulation of initial situation (diagnosis), the Normative Moment designs the aims and defines the strategy of action. The Strategic Moment analyzes the actors enrolled in the process and the viability of plans. The Operational Moment establishes the execution of plans and evaluates the changes.

In conclusion, the introduction of RHD genotyping test in free-fetal DNA from maternal plasma using real-time PCR, in public services, is factual.



Brazil's Health Ministry is working on improving the public health system. The government issues about full assistance to women and children promote wide investments in this health area.

Actions joining both government and public institutions with expertise as Biomanguinhos would make possible the development of different diagnoses methods in health care in Brazil.

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1: Interação entre as diversas fases (momentos) do PES. 34
- Figura 2: Projeção do número de gestantes RhD- negativo que poderiam ser afastadas do pré-natal de alto risco com a realização da genotipagem RhD. 39

**LISTA DE QUADROS E TABELAS**

	Página
Tabela 1: Número de óbitos neonatais ocorrido no ano de 2009 segundo o CID-10 P55 a P57	23
Tabela 2: Acurácia do método utilizando diferentes exons do gene <i>RhD</i> e a técnica PCR em tempo real	29
Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos - Protocolo SAFE	31
Tabela 4: Desempenho dos principais reagentes para a extração do DNA	32
Tabela 5: Comparação da genotipagem e fenotipagem Rh 51	22
Tabela 6: Seguimento obstétrico baseado nos resultados do Coombs Indireto (CI)	36

**LISTA DE SIGLAS**

DO	Densidade ótica
DPACM	Dopperfluxometria da artéria Cerebral Média
IBGRL	International Blood group Reference Laboratory
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IgG	Imunoglobulina G
MOM	Múltiplos da mediana
NAT	Núcleo de Avaliação de Tecnologias em Saúde
PAISC	Programa da Criança
PAISM	Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher
PAISMC	Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher, com o objetivo de reduzir a morbi-mortalidade da mulher e da criança.
PES	Planejamento Estratégico Situacional
PHPN	Programa de Humanização no Pré-Natal e Nascimento
RhIg	Imunoglobulina anti-D
RN	Recém-nato
SAS/MS	Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde
SIM	Sistema de informações sobre mortalidade
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido ().
TMI	Taxa de mortalidade infantil

## SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
2 - Objetivo	3
2.1 – Objetivos Específicos	3
3 – Referencial Teórico	4
3.1 – História da Assistência Pré-Natal no Serviço Público Brasileiro	4
3.2 - Doença Hemolítica Perinatal pelo Sistema RH	6
3.2.1 Fisiopatologia	6
3.2.2 – Diagnóstico	7
3.2.3 - Doença Hemolítica Perinatal no Brasil	10
3.3 - Sistema RH	12
3.3.1 – Antígenos	12
3.3.2 – Anticorpos	13
3.3.3 – Gene <i>RhD</i>	13
3.4 - DNA fetal livre na circulação materna	14
3.5 – Genotipagem RhD fetal por PCR em tempo real	16
3.6 – Protocolo SAFE “ <i>SPECIAL NON-INVASIVE ADVANCES IN FETAL AND NEONATAL EVALUATION NETWORK</i> ”.	20
4 – Método	22
4.1 - Momento explicativo	23
4.1.1 – Impacto da Genotipagem <i>RHD</i> no acesso ao pré-natal de alto risco	26
4.1.3 – A Genotipagem <i>RHD</i> e a utilização da imunoglobulina anti-D	28
4.1.2 - Genotipagem <i>RHD</i> e a prematuridade	30
4.2- Momento normativo	30
4.2.1 – Cenários para a implantação da genotipagem RhD	31
4.2.2 – Ações considerando o Cenário 1	33
4.2.3 – Ações considerando o Cenário 2	36
4.3- Momento estratégico	37
4.3.1 - Atores envolvidos no processo de implantação a tecnologia no SUS	37
4.4 - Momento tático-operacional	39
4.4.1 – Papel dos Hemocentros	39
4.4.2- Disponibilidade de Recursos Públicos	39
4.7 - Manutenção do projeto	40
5– Discussão	41
6– Conclusão	43
7 – Referências	44
8 – Anexos	52

## 1. Introdução

O desconhecimento do grupo sanguíneo RhD fetal durante o período gestacional faz com que gestantes RhD-negativo tenham o mesmo acompanhamento pré-natal independente do feto ser RhD-positivo ou RhD-negativo, essa situação ocorre muitas vezes pela não realização rotineira de exames que determinem o grupo sanguíneo fetal, uma vez que muitos destes métodos são invasivos. Assim, gestantes RhD-negativo sem risco para o desenvolvimento de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) são mantidas no pré-natal de alto risco sendo submetidas a consultas e procedimentos de diagnósticos frequentes, aumentando a taxa de ocupação destes serviços e dificultando a oferta para aquelas que realmente necessitariam de assistência especializada.

O seguimento destas gestantes é complexo. O Manual Técnico do Ministério da Saúde (M.S.) “Gestação de alto risco” de 2010<sup>1</sup> determina que toda gestante RhD-negativo não imunizada deve receber imunoglobulina anti-D (Rhlg) entre a 28<sup>a</sup> a 34<sup>a</sup> semana de gestação, após dar à luz a uma criança RhD-positivo e após a realização de procedimentos invasivos. O mesmo manual determina que todas as gestantes RhD-negativo aloimunizadas e as que desenvolvem anticorpos durante a gestação devem ser encaminhadas ao pré-natal de alto risco onde, dependendo da história obstétrica, terão acompanhamentos diversificados.

Durante o pré-natal de alto risco, o manual determina que a avaliação do risco fetal para o desenvolvimento da Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) seja realizada inicialmente através de métodos diagnósticos indiretos e não invasivos. São eles: a titulação de anticorpos anti-D e a Dopplerfluxometria da

artéria Cerebral Média (DPACM)<sup>1</sup>. Quando estes testes inferem a possibilidade do risco para desenvolvimento da doença, está indicada a realização de procedimentos invasivos, como a cordocentese, que permitam determinar a real gravidade do feto e também esclarecer seu grupo sanguíneo<sup>1</sup>.

Os exames invasivos não são isentos de risco, pois estão associados a perdas fetais e a hemorragia feto-materno. A amniocentese determina uma taxa de perda gestacional de até 0.5%<sup>2</sup>. O monitoramento do título de anticorpos anti-D em gestantes não apresenta valor preditivo para risco fetal<sup>1</sup>, pois sua elevação pode se dar mesmo em mulheres com fetos RhD-negativo devido a um estímulo imunológico inespecífico relacionado à gestação. Um fator importante a ser considerado é que os resultados da DPACM é que norteiam a indicação da cordocentese. Embora este procedimento tenha alta sensibilidade, apresenta falsa-positividade de até 12%<sup>1</sup> o que nos leva a concluir que em muitos casos a cordocentese poderia ser evitada.

O protocolo de seguimento pré-natal de gestantes RhD-negativo, em especial aloimunizadas, vem sofrendo mudanças em vários países a partir do desenvolvimento de uma nova técnica para genotipagem *RhD*. Esta técnica que associa o PCR em tempo real e DNA fetal livre no plasma materno. A introdução desta técnica permite a determinação do grupo sanguíneo fetal durante a gestação e é uma alternativa aos processos invasivos. Trata-se de um procedimento que apresenta uma sensibilidade superior aos métodos indiretos de acompanhamento de gestantes RhD-negativo. A DPACM apresenta uma sensibilidade de 88%<sup>3</sup> enquanto que a genotipagem RhD é >98,5%<sup>4</sup>. O método apresenta eficácia comprovada e prevê o polimorfismo genético das populações. A diferença de efetividade do procedimento está

relacionada às condições locais de infraestrutura do sistema de saúde que vão influenciar na disponibilidade do procedimento, no acesso ao pré-natal de alto risco, na qualificação profissional e nas questões econômicas, políticas e sociais. Assim, observa-se que o processo de gestão de uma tecnologia em saúde requer estudos não só de eficácia, mas também uma avaliação do cenário como um todo, que tem início a partir do mapeamento das condições de implementação desta tecnologia.

## **2 - Objetivo**

Este estudo objetiva realizar um mapeamento das condições necessárias para a incorporação da genotipagem *RhD* a partir do DNA fetal livre no plasma materno na rotina pré-natal de gestantes RhD-negativo acompanhadas no SUS.

### **2.1 – Objetivos Específicos**

- Descrever o Protocolo SAFE;
- Descrever o Fluxo da assistência pré-natal no Município do Rio de Janeiro;
- Identificar os cenários para a implantação da metodologia;
- Determinar os atores envolvidos no processo de implantação da tecnologia no SUS;
- Descrever o perfil da Infraestrutura e dos Recursos Humanos e
- Analisar os Recursos Públicos necessários.



### **3 – Referencial Teórico**

#### **3.1 – História da Assistência Pré-Natal no Serviço Público Brasileiro**

No Brasil, a saúde da mulher foi incorporada às políticas nacionais de saúde nas primeiras décadas do século XX. Em 1983, o Ministério da Saúde através da Divisão Nacional de Saúde Materno Infantil (DINSAMI) elaborou o Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher, com o objetivo de reduzir a morbi-mortalidade da mulher e da criança (PAISMC). Em 1991 houve a separação do Programa da Criança (PAISC) do PAISM (Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher) cujas diretrizes e ações programáticas estão condensadas no texto “Assistência Integral à Saúde: bases de ação programática”, editado pelo Ministério da Saúde em 1984. A política de saúde definida pelo PAISM orienta para uma assistência que iria dos níveis mais simples aos mais complexos, contemplando as diversas etapas do ciclo vital da mulher e os aspectos da prevenção e da atenção curativa, englobando ações de planejamento familiar e ações educativas em saúde e sexualidade.

Em 2003 teve início a construção da Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher - Princípios e Diretrizes, quando a equipe técnica de saúde da mulher avaliou os avanços e retrocessos alcançados na gestão anterior. Em maio de 2004 o Ministério da Saúde lançou a - Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher - Princípios e Diretrizes, construída a partir da proposição do SUS, respeitando as características da nova política de saúde. Em julho de 2005, foram operacionalizadas as ações previstas no Plano de Ação construído e legitimado por diversos setores da sociedade e pelas instâncias de controle social do Sistema Único de Saúde (SUS). O Programa de Humanização no Pré-Natal e Nascimento (PHPN) implantando em 2000

pelo MS tem por objetivo promover à redução da morbi-mortalidade materna e perinatal, através da humanização do atendimento<sup>26</sup>. Esta ação contribuiu para a redução da mortalidade infantil. De 1990 a 2007 a taxa de mortalidade infantil (TMI) no Brasil apresentou uma redução média anual da taxa de 4,8%. O componente pós-neonatal (28 dias a um ano de vida incompleto) apresentou queda de 7,3% ao ano, no entanto o componente neonatal precoce (0 a 6 dias de vida) apresentou queda de apenas 3,1% ao ano. A mortalidade neonatal (entre 0 e 27 dias de vida) representa cerca de 60 a 70% da mortalidade infantil. O relatório de avaliação do programa Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher (PNAISM) de 2009 descreve que apesar da ampliação do número de consultas de pré-natal em 125% (Anexo 1)<sup>27</sup>, a qualidade dessa assistência ainda é precária.

O Projeto Rede Cegonha que foi anunciado pelo governo federal em 28 de março de 2011, é composto por um conjunto de medidas que abrangem a assistência obstétrica com foco na gravidez, no parto e pós-parto como também a assistência infantil. O projeto conta com R\$ 9,397 bilhões do orçamento do Ministério da Saúde para investimentos até 2014. O projeto se soma a diversos projetos vigentes visando à garantia de saúde materna-infantil.

A alta taxa de mortalidade neonatal demonstra que as ações para melhor assistência pré-natal de alto risco precisam ser consolidadas. É fundamental o aumento na oferta de serviços de saúde, o acesso a exames laboratoriais e a existência de mecanismos formais de referência e contra referência entre os níveis de atenção. Portanto todas as ações que possibilitem um melhor diagnóstico na identificação de gestantes em risco levarão a um

encaminhamento mais adequado ao pré-natal de alto risco e por consequência melhoria no acesso e assistência.

## **3.2 - Doença Hemolítica Perinatal pelo Sistema RH**

### **3.2.1- Fisiopatologia**

A DHPN é causada pela destruição de hemácias fetais, provocada por anticorpos maternos dirigidos contra antígenos de origem paterna presentes nas hemácias do feto<sup>5</sup>.<sup>5</sup>. Esta hemólise causa anemia progressiva e pode levar ao óbito fetal ou neonatal.

Os anticorpos anti-D não são naturais, eles são formados a partir de um estímulo imunológico. A passagem de hemácias fetais para a circulação materna durante a 1ª gestação ou após o parto (1ª exposição) estimula o sistema imune materno a produzir anticorpos anti-D que nesta 1ª exposição são do tipo IgM. Quando ocorre uma 2ª gestação e o feto é RhD-positivo (2ª exposição) é desencadeada uma produção rápida e maciça de anticorpos anti-D do tipo IgG. Os anticorpos IgG, que são os únicos capazes de atravessar a barreira placentária, irão se fixar nos eritrócitos fetais (sensibilização das hemácias fetais) provocando hemólise. A variação na produção destes anticorpos (grau de aloimunização) está diretamente relacionada à intensidade da hemorragia feto-materna. Em todos os casos onde há possibilidade de sangramento feto-materno como placenta prévia, aborto espontâneo ou provocado, gravidez ectópica e traumatismo abdominal há um risco aumentado de aloimunização. Certas técnicas diagnósticas invasivas, como a amniocentese ou cordocentese, também estão associadas ao maior risco de

aloimunização<sup>6</sup>. Se a hemólise é prolongada surge uma anemia grave no feto, o que estimula a produção de eritropoietina fetal com conseqüente aumento da eritropoiese medular e extramedular (fígado, baço, medula óssea). A eritropoiese hepática aumentada determina insuficiência hepática, hipoalbuminemia e por conseqüência hidropisia fetal<sup>7</sup>. O grupo heme libertado devido à hemólise eritrocitária é degradado enzimaticamente, produzindo bilirrubina, que vai posteriormente ser conjugada na placenta. Após o nascimento, devido à imaturidade hepática do recém-nato, existe uma acumulação de bilirrubina não conjugada, surgindo icterícia e, nos casos mais graves, a impregnação do cérebro por este pigmento levando ao quadro de Kernicterus. A hidropisia fetal é uma importante causa de morbidade e mortalidade perinatal<sup>8</sup>.

### **3.2.2 – Diagnóstico**

Há menos de uma década, o acompanhamento de gestantes aloimunizadas consistia na anamnese materna e paterna, exames imunohematológicos e a realização de amniocentese seriada a cada duas a três semanas. A decisão para iniciar a amniocentese baseava-se nos títulos de anticorpos maternos, obtidos pelo teste de Coombs indireto. A amniocentese permite a análise dos desvios da densidade óptica do líquido amniótico a 450 nm através da avaliação da quantidade de bilirrubina no líquido amniótico que está diretamente relacionada à intensidade da hemólise<sup>9</sup>. A partir da década de 1980, a ultrassonografia foi introduzida no acompanhamento das gestantes com fetos sensibilizados, por viabilizar o diagnóstico e orientar a realização da cordocentese<sup>10</sup>.

Um exame não invasivo, a dopplervelocimetria da artéria cerebral média (DPACM), tem sido empregado no diagnóstico de anemia fetal desde 1987<sup>11</sup>. A cerebral média é a artéria fetal escolhida por sua localização anatômica possibilitar uma análise dos parâmetros dopplervelocimétricos de forma mais fidedigna<sup>12</sup>.

A DPACM detecta a anemia fetal nos estágios iniciais através da medida do pico de velocidade sistólica na artéria cerebral, quando o feto apresenta melhor prognóstico e as alterações ultrassonográficas são menos evidentes. Na detecção de anemia fetal grave, a DPACM apresenta sensibilidade de 88% e especificidade de 82% enquanto que o estudo do líquido amniótico na densidade de 450nm apresenta sensibilidade de 76% e especificidade de 77%<sup>13</sup>. Além disso, por ser método não invasivo, a realização da DPACM no diagnóstico da DHPN minimiza os riscos fetais que podem ocorrer com a realização da amniocentese e cordocentese<sup>13</sup>. Apesar dos resultados promissores do acompanhamento das gestantes aloimunizadas com essa avaliação dopplervelocimétrica, a maioria dos serviços especializados ainda utiliza a análise do líquido amniótico como indicador indireto da hemólise fetal.

O monitoramento do título de anticorpos anti-D em gestantes aloimunizadas não apresenta valor preditivo para risco fetal<sup>1</sup>, pois sua elevação pode se dar em mulheres com fetos RhD-negativo devido a um estímulo imunológico inespecífico relacionado à gestação. A DPACM e a espectrofotometria do líquido amniótico apresentam falhas. A DPACM é apontada por alguns autores como controversa. Um estudo demonstrou alteração no resultado da DPACM em 37 gestantes aloimunizadas. No entanto, após o nascimento foi observado que das 37 gestantes, 7 haviam dado à luz a

crianças RhD-negativo<sup>14</sup>. Isto demonstra que neste estudo houve 19% de resultados falso-positivos o que aponta para uma baixa especificidade do procedimento. Também tem sido demonstrado que a espectrofotometria de líquido amniótico através da amniocentese apresenta baixa sensibilidade em gestações abaixo de 27 semanas<sup>15</sup>. Também não há consenso quanto ao número e intervalo de procedimentos necessários o que pode levar a um número de punções excessivas com aumento do risco da sensibilização materna devido a possibilidade de hemorragia feto-materna<sup>16</sup>. Quando a DPACM apresenta alteração em seus resultados ( $>1.5$  MOM) ou quando a densidade ótica (DO) do líquido amniótico está alterada, é indicada a realização da cordocentese. Esta permite determinar de forma direta o grupo sanguíneo e o nível de hemoglobina fetal esclarecendo o real grau de anemia fetal. A cordocentese é um procedimento invasivo, não isento de risco e requer profissionais capacitados e deve ser realizado em ambiente hospitalar devido aos riscos envolvidos. Neste procedimento, a hemorragia feto-maternal acontece em até 17% dos casos aumentando a incidência de imunização nestas gestantes<sup>17</sup> e as perdas fetais se apresentam com frequência variável de 1,5 até 5%<sup>18</sup>. Como a indicação da cordocentese esta condicionada aos resultados alterados da DPACM e espectrofotometria do líquido amniótico e os resultados apontam para uma baixa especificidade destes testes, em muitos casos a indicação da cordocentese é equivocada levando a um risco desnecessário.

Uma importante ferramenta para análise do risco fetal é a determinação do grupo sanguíneo fetal. Na incompatibilidade materno fetal no sistema Rh, apenas fetos RhD-positivo estão sob risco, portanto o conhecimento precoce

do grupo sanguíneo fetal é decisivo no acompanhamento de gestantes RhD-negativo aloimunizadas no pré-natal de alto-risco. A determinação do grupo sanguíneo fetal por testes sorológicos convencionais só é possível através da coleta de sangue fetal através da cordocentese. Como este procedimento é invasivo, esta determinação não é realizada rotineiramente e o seguimento de gestantes RhD-negativo aloimunizadas ainda se baseia em métodos diagnósticos indiretos. Assim, gestantes sem risco para o desenvolvimento da DHPN são mantidas desnecessariamente no pré-natal de alto risco.

### **3.2.3 - Doença Hemolítica Perinatal no Brasil**

A Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) contribui de forma significativa para as taxas de morbidade e mortalidade perinatal no Brasil embora ainda exista subnotificação. A doença afeta cinco crianças em cada 1000 nascimentos<sup>1</sup>. O total de nascidos vivos divulgados pelo SINASC, para o país em 2009 foi de 2.881.581<sup>19</sup>. Considerando 3.000.000 de nascimentos por ano, teríamos cerca de 15.000 recém-natos afetados por ano. Os anticorpos anti-D estão relacionados a 98% dos casos de DHPN<sup>20</sup>. Na população brasileira, a prevalência do fenótipo RhD-negativo, é variável e heterogênea nas várias regiões do país. Estudos realizados na Fundação Pró-sangue demonstraram que 87,5% a 91,8% dos doadores de sangue em São Paulo são RhD-positivo<sup>21</sup>. No Rio de Janeiro a frequência de doadores de sangue RhD-positivo é de 90.2%<sup>22</sup>. Considerando uma média nacional de 10% de mulheres RhD-negativo e 3.000.000 nascimentos por ano, seriam cerca de 300.000 gestantes RhD-negativo em acompanhamento pré-natal diferenciado.

Lobato et al compararam o número de casos de DHPN diagnosticados no Serviço Neonatal do Instituto Fernandes Figueira no período de 1998 a 2003 e comparou com o número de casos existente na base SIH-SUS e observou que dos 194 casos da doença diagnosticados apenas 122 (62,8%) constavam no banco de dados. Segundo o mesmo autor, a subnotificação provavelmente está associada à inexistência de um sistema de notificação compulsória da doença sendo esta notificada apenas na base SIH-SUS que é um sistema destinado à cobrança de procedimentos hospitalares e, portanto, em muitos casos, outras causas que demandam cobrança maior como a prematuridade, são lançadas como diagnóstico.

A mortalidade da doença é variável. Um estudo realizado na Universidade de Minas Gerais, em 128 gestantes aloimunizadas, a taxa de mortalidade perinatal foi de 18,1%<sup>23</sup>. O óbito e a hidropisia observados em pacientes do IFF foram de 7%<sup>24</sup>. Se considerarmos que a doença afeta 5 a cada 1000 nascimento<sup>1</sup> e considerando o óbito em 7%, o número provável de óbitos por ano seria 1050. No entanto, ao consultarmos o Sistema de informações sobre mortalidade (SIM), os dados referentes à causa de óbitos relacionados à DHPN (CID-10 categorias P55 a P57) no ano de 2009, o número de óbitos observados foi 150<sup>25</sup> (Tabela 1).



Tabela 1: Número de óbitos neonatais ocorrido no ano de 2009 segundo o CID-10 P55 a P57

Categoria CID-10	N
P55 Doença hemolítica do feto e do recém-nascido	72
P56 Hidropsia fetal devido a doença hemolítica	22
P57 Kernicterus	56
Total	150

Fonte: MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM -

Dados preliminares Situação da base nacional em 17/01/2011.

Considerando os óbitos perinatais em 2009 (31.575) e a taxa de mortalidade específica por DHPN (0,47%) neste mesmo ano, estima-se que mortalidade por esta doença seja em torno de 148 casos/ano. Estes resultados apontam que a mortalidade registrada nos sistemas oficiais é algo de 10% do valor estimado. O sub-registro contribui para a diferença observada. Entretanto, são necessários estudos adicionais para verificar qual a real situação do óbito por DHPN no sistema de saúde brasileiro.

### 3.3 - Sistemas RH

#### 3.3.1 – Antígenos

O sistema Rh foi descoberto em 1939 por Stetson devido a um caso de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN). Após a descoberta do antígeno D, vários outros antígenos foram sendo revelados e hoje o sistema possui cerca de 50 antígenos conhecidos. Os principais antígenos do sistema RH são D ( $R_0$ ), C ( $R_1$ ), E ( $R_2$ ) c ( $r'$ ) e e ( $r''$ ). O antígeno D é considerado o mais imunogênico dos antígenos eritrocitários<sup>28</sup> e sua frequência varia nas diferentes raças. Em

caucasianos sua frequência é 15%, em Africanos 3 a 7% e em asiáticos 0,5 a 1%<sup>29</sup>. A presença do antígeno D na população brasileira é variável e heterogênea nas diferentes regiões do país. Estudos realizados na Fundação Pró-sangue demonstraram que 87,5% a 91,8% dos doadores de sangue em São Paulo são RhD-positivo<sup>30</sup>. No Rio de Janeiro e a frequência de doadores de sangue RhD-positivo é de 90.2% e a prevalência de doadoras RhD- com anti-D é de 3.98%<sup>31</sup>.

### 3.3.2 – Anticorpos

Os anticorpos do sistema Rh não são naturais. Eles são deflagrados após um estímulo imunológico, transfusional ou gestacional. O antígeno Rh1 ou D é o mais imunogênico dos antígenos eritrocitários. Os anticorpos anti-D desenvolvidos, por serem IgG, em especial IgG1 e IgG3 atravessam a barreira placentária e podem levar à destruição de hemácias fetais RhD-positivo determinando a doença ainda intraútero ou logo após o nascimento<sup>32</sup>.

### 3.3.3 – Gene *RhD*

As bases moleculares do sistema RH vêm sendo exaustivamente estudadas. Os antígenos do sistema RH são codificados por 2 genes, *RHD* e *RHCE* localizados no cromossoma 1. Estes genes codificam a produção de 2 polipeptídios de 417 aminoácidos RhD e RhCcEe. Os genes *RHD* e *RHCE* compartilham 93,8% de homologia nos introns e nas regiões codificadoras. Ambos os genes possuem 10 exons<sup>33</sup>. Indivíduos RhD-negativo apresentam ausência da proteína RhD. Em caucasianos, o fenótipo RhD-negativo é resultado de uma deleção do gene *RhD* correspondendo a 1463-pb na caixa

*RHD*. Indivíduos RhD-positivo apresentam o gene *RHD* em homo ou heterozigose, Em negros, o fenótipo RhD-negativo é consequência de uma situação mais complexa. Nesta população, a ausência de *RHD* ocorre em 18% dos casos, no entanto em 67% dos casos está associada a um gene *RhD* que não produz nenhum antígeno D. A ausência do antígeno D pode estar associada a presença de um pseudogene (*RHD $\Psi$* ) que é o resultado da inserção de 37 pares de base no exon 4 do gene *RHD* e por consequência a introdução de um códon de terminação (*stop codon*) na posição 210 do exon 6<sup>34</sup>. Em 15% dos casos também está relacionado a presença de um gene híbrido (*RHD-RHCE-D<sup>S</sup>*) onde a terminação 3`do exon 3 e exons 4 - 8 do gene *RHD* são derivados do Gene *RHCE*.

Embora exista um grande polimorfismo alélico relacionado principalmente a fatores raciais, o conhecimento das bases moleculares do sistema Rh trouxe grandes avanços no acompanhamento de gestantes RhD-negativo pois a possibilidade da determinação antenatal do grupo sanguíneo e da zigosidade paterna apresenta um alto valor preditivo não desenvolvimento da DHPN.

### **3.4 - DNA fetal livre na circulação materna**

A presença de ácidos nucléicos livres no plasma humano foi estabelecida em 1948 antes da elucidação da estrutura do DNA<sup>36</sup>. Lo *et al.*, ampliou as possibilidades de diagnóstico pré-natal não invasivo. Através da utilização da técnica de PCR em tempo real quantitativa, Lo analisou as sequências dos genes *SRY* e  *$\beta$ -globina* em gestantes com fetos masculinos para demonstrar que o DNA fetal representa aproximadamente 3% (25

equivalentes genômicos /ml; variação de 3–69) do DNA livre no plasma materno durante o 1º trimestre de gestação, aumentando para 6% (292 equivalentes genômicos /ml; variação de 77–769) no 3º trimestre<sup>37</sup>. O DNA fetal livre no soro materno é muito mais curto do que o materno, apresentam comprimento < 0.3 kb<sup>38</sup>. A concentração de DNA fetal no plasma materno é anormalmente alta em gestações onde existem alterações placentárias<sup>39</sup>. Embora exista uma maior quantidade de DNA livre no soro em relação ao plasma, o nível de DNA fetal é similar em ambos<sup>37</sup>. A origem do DNA fetal livre na circulação materna é incerta. Sua origem pode ser as células hematopoiéticas fetais nucleadas que ao atravessarem a barreira placentária sofreriam apoptose liberando o DNA no sangue materno<sup>40 41</sup>. No entanto, este mecanismo não justifica a quantidade de DNA fetal detectado no plasma materno. Outra provável origem do DNA fetal é a apoptose *in situ* dos trofoblastos das vilosidades coriônicas que também levaria a liberação de DNA fetal na circulação materna<sup>42</sup>. A passagem do DNA através da placenta é bidirecional, porém estudos demonstram o predomínio da transferência do feto para a mãe<sup>43</sup>. O DNA fetal é rapidamente eliminado do plasma materno após o parto: meia vida de 16 minutos (variação de 4-30 minutos) após uma cesariana<sup>44</sup>, mas geralmente entre 10 a 100 h após o parto vaginal<sup>45</sup>. A presença de DNA fetal livre no sangue materno vem sendo apontada como uma poderosa ferramenta diagnóstica não invasiva para determinação antenatal de doenças que acometem o feto.

### 3.5 – Genotipagem RhD fetal por PCR em tempo real

A genotipagem *RhD* fetal inicialmente era realizada tendo como fonte o DNA proveniente de amniócitos, células trofoblásticas ou células fetais<sup>46</sup> obtidos através de procedimentos invasivos como a amniocentese ou cordocentese. A técnica inicialmente empregada era a reação da cadeia da polimerase (PCR) convencional utilizando diferentes sequências do gene *RhD*. Diversos estudos foram publicados e os resultados quanto à sensibilidade, especificidade e acurácia estão relacionados com a sensibilidade da técnica, mas também com as sequências do gene *RhD* selecionadas. No Brasil, em 2006, Machado *et al.* publicaram um estudo realizado em 81 gestantes. Neste estudo foram analisados o exon 10 e o intron 4 do gene *RHD*. A sensibilidade do teste foi 98,3%, a especificidade 93,8% e a acurácia 97,3%<sup>46</sup>.

O desenvolvimento da técnica PCR em tempo real revolucionou o processo de detecção e quantificação de fragmentos de DNA e RNA principalmente na identificação antenatal do gene RhD fetal. A PCR em tempo real pode ser realizada basicamente por três métodos: Sondas hibridizáveis, sondas hidrolisáveis e ligantes ao DNA. Na genotipagem RhD, por PCR em tempo real a metodologia frequentemente utilizada é a baseada na atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase que cliva uma sonda de hibridização fluorogênica duplamente marcada durante a fase de extensão da PCR. A amplificação e extensão do gene alvo é detectada e quantificada em tempo real (à medida que acontece) através da emissão da fluorescência que aumenta a cada ciclo de PCR devido ao acúmulo exponencial de fluoróforos<sup>47</sup>.

Pouco depois da descoberta da circulação de DNA fetal livre no sangue materno, Lo e Fass demonstraram quase simultaneamente que uma sequência

do gene *RhD* poderia ser amplificada a partir do plasma de mulheres grávidas com boa sensibilidade e especificidade<sup>37, 48</sup>. A acurácia da genotipagem *RhD* é dependente da escolha dos exons e a sequência alvo dos diferentes exons do gene *RhD*. O gene *RhD* é altamente polimórfico então para evitar falso-resultado, na escolha das sequências de oligonucleotídeos a serem utilizadas devem ser consideradas a alta homologia que existe entre os genes *RHD* e o gene *RHCE* e<sup>49</sup>.

Devido ao alto polimorfismo deste gene, na realização da genotipagem *RhD*, tem sido recomendada a utilização de sequências contra pelo menos duas regiões distintas do gene *RHD*. A possibilidade da presença do gene pseudogene *RHD* (*RHD $\Psi$* ), que não expressa produto e que é prevalente na população afrodescendente, levou alguns autores recomendar a inclusão do exon 4 ou 5, combinado com um exon alternativo (7 ou 10). Esta combinação evita a incorreta interpretação de fetos *RHD $\Psi$*  ou RHD-CE-D<sub>s</sub> como RhD-positivo<sup>50, 51</sup>. Para melhor acurácia dos resultados vários autores recomendam a realização dos testes em duplicata e até em quadruplicata<sup>52, 53, 54, 55</sup>. A tabela 2 demonstra os dados da acurácia de 23 estudos publicados considerando a escolha dos exons do gene *RhD* e a idade gestacional<sup>56</sup>.

Podemos observar a utilização de sequências contra diferentes exons em amostras coletadas em gestantes com idade gestacional que variou entre 8 a 41 semanas. Observamos que em 7 dos 23 estudos a acurácia foi de 100%. Nestes trabalhos, foram utilizados de uma até 5 diferentes iniciadores, O menor valor de acurácia, 90%, foi observado em 2 estudos. Cada autor utilizou apenas 1 iniciador (7 e 9). Os estudos mais representativos foram realizados por Finning e Muller (número de amostras >1000). Finning utilizou sequências

complementares aos exons 4, 5 e 10 e observou acurácia de 95,7%. Muller utilizou sequências complementares aos exons 5 e 7 e observou acurácia de 99,8%. Provavelmente, a menor acurácia obtida por Finning estava relacionada a utilização de sequência complementar ao exon 10. A inclusão de sequência dirigida para o exon 10 pode levar a resultados falsos-positivos<sup>33</sup>, pois indivíduos portadores do haplótipo Cde são detectados como RhD-positivo<sup>50</sup>.

Tabela 2: Acurácia do método utilizando diferentes exons do gene RhD e a técnica PCR em tempo real

Autor	Referência	Exons do gene <i>RhD</i>	Acurácia	Número de amostras	Idade gestacional
Lo <i>et al.</i>	37	10	96	57	7–41
Faas <i>et al.</i>	48	7	100	31	16–17
Finning <i>et al.</i>	51	4, 5, 10	95,7	1997	28
Gautier <i>et al.</i>	52	10	99	285	8–35
Muller <i>et al.</i>	54	5, 7	99,8	1113	6–32
Minon <i>et al.</i>	55	4, 5, 10	99,8	563	>10
Turner <i>et al.</i>	57	10	90	31	<20
Gonzalez-Gonzalez <i>et al.</i>	58	7	90	20	11–16
Randen <i>et al.</i>	59	7	92	114	6–38
Zhou <i>et al.</i>	60	4,5,10	94	98	NI
Legler <i>et al.</i>	61	4, 7	96	27	11–38
Zhang <i>et al.</i>	62	7	98	58	10–21
Clausen <i>et al.</i>	63	7, 10	98	56	15–36
Rijnders <i>et al.</i>	64	7	99	72	11–19
Rouillac-Le Sciellar <i>et al.</i>	65	7, 10	99	300	10–34
Finning <i>et al.</i>	66	K, C, c, E	99,4	173	10–36
Rouillac-Le Sciellar <i>et al.</i>	67	7, 10	99,5	893	NI
Finning <i>et al.</i>	68	4, 5, 6, 10	100	137	8–42
Costa <i>et al.</i>	69	10	100	102	8–14
Harper <i>et al.</i>	70	4, 5, 10	100	2	13–16
Finning <i>et al.</i>	71	4, 5, 10	100	283	8–42
Hromanikova <i>et al.</i>	72	7, 10	100	28	11–38
Hromanikova <i>et al.</i>	73	7,10, <i>RHCE</i> , E, C	100	45	11–40

Adaptado de Maddocks 2009 56

No Brasil existem poucos estudos publicados que utilizem a metodologia de PCR em tempo real. Chinen utilizou sequências para amplificação dos exons 7 e 10 e como critério para considerar o resultado positivo a amplificação isolada de um ou outro exon<sup>74</sup>. Este critério pode levar a falso-positivos, pois a presença do pseudogene ou outros genótipos parciais são interpretados como RhD-positivo. Schmidt utilizou sequências complementares aos exons 5 e 7. Apenas as sequências utilizadas para o exon 5 são semelhantes aquelas preconizadas pelo grupo SAFE. O critério para avaliar o resultado como positivo considerou a amplificação de ambos os exons. Em 43 amostras analisadas houve concordância em 42 (97,7%) com o fenótipo do recém-nato. Quando realizada a genotipagem do recém-nato (RN) a partir de células da mucosa bucal do RN houve concordância. A causa da discordância foi atribuída a um erro na tipagem RhD do recém-nascido<sup>49</sup>.

Na genotipagem *RhD* utilizando o DNA fetal livre no plasma materno e a PCR em tempo real, faz-se necessária a inclusão de controles e marcadores para verificar se há presença de DNA (controle da amplificação) e, especificamente, de DNA fetal pois sua quantidade no plasma materno é pequena. Vários genes podem ser utilizados como controle interno da amplificação de DNA: o gene CCR5 o GAPDH (gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase) e o gene da  $\beta$ -globina. Quando não há amplificação do gene controle, os testes não serão validados. Nesse caso, é necessária nova extração de DNA e um novo teste.

A genotipagem *RhD* fetal é complexa e a acurácia dos resultados está relacionada à qualidade da amostra, à idade gestacional, à realização dos testes em duplicata e à escolha dos exons a serem amplificados.



### 3.6 – Protocolo SAFE “*SPECIAL NON-INVASIVE ADVANCES IN FETAL AND NEONATAL EVALUATION NETWORK*”.

Com o objetivo de analisar o custo e a efetividade da introdução de um procedimento não invasivo para o diagnóstico de patologias que acometem o feto, entre elas a DHPN, 50 cientistas de 19 países europeus foram reunidos e durante 5 anos (2004 – 2009) testaram diversos protocolos de extração de DNA fetal livre no sangue materno e em especial em relação a DHPN, diversos protocolos de amplificação do gene RhD. Foram gerados neste período diversos trabalhos científicos, relatórios e workshops. O protocolo preconiza a utilização do kit de extração de DNA QIAamp DSP Virus Kit QIAGEN, Hilden, Germany e a para amplificação do gene *RhD* adota a co-amplificação de pequenos fragmentos dos exons 5 e 7. Esta combinação possibilita uma melhor detecção das variantes genéticas do gene D possibilitando uma interpretação mais acurada. Preconiza a inclusão de controles utilizando sequências específicas do gene Y (*DYS14*) ou da  $\beta$ -globina entre outros. As sequências complementares aos exons 5 e 7 preconizados pelo protocolo SAFE estão descritas na tabela 4<sup>85</sup>.

Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos - Protocolo SAFE

Nome do primer	Sequência	Exon do gene RhD
RHD 940S	GGGTGTTGTAACCGAGTGCTG	7
RHD 1064R	CCGGCTCCGACGGTATC	7
RHD 968T	CCCACAGCTCCATCATGGGCTACAA	7
RHD ex5F	CGCCCTCTTCTTGTGGATG	5
RHD ex5R	GAACACGGCATTCTTCCTTTC	5
RHD ex5T	TCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCTGCT	5

Estudos observaram que o desempenho do ensaio variava com o tipo de reagente de extração utilizado. Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia estão descritos na tabela 5<sup>85</sup>.

Tabela 4: Desempenho dos principais reagentes para a extração do DNA

Semanas de gestação	Kit de extração de DNA	Nº de amostras	Exons do gene RhD	Sensibilidade %	Especificidade %	Acurácia %
6 - 32	Chemagem	1022	5, 7	99,8	98.1	99.2
8 - 38	MDx	1869	5, 7	99.7	94	95.7
6 - 32	DSP vírus	1022	5, 7	99.7	99.2	99.5
28 - 30	Magna Pure	45	5, 7	96.3	95	97.8

Ao analisarmos os resultados observamos que o kit DSP vírus apresentou melhor acurácia (99,5%) e por isto foi o escolhido para o protocolo de genotipagem *RhD*.

A maior experiência clínica na genotipagem *RhD* fetal não-invasiva é do International Blood group Reference Laboratory (IBGRL) in Bristol, Inglaterra. Em 2008, Finning realizou a genotipagem *RhD* fetal em 1869 amostras de plasmas de gestantes RhD-negativo coletados no 1º trimestre da gestação. Posteriormente comparou os resultados da genotipagem *RhD* com os resultados obtidos na classificação RhD das amostras de cordão umbilical. Os resultados de concordância entre os testes estão demonstrados na tabela de número 6. Nela observamos que os resultados foram concordantes em 95,7% e discordantes em 0,8% dos casos. Em 2,4% dos casos a genotipagem não foi conclusiva. Se considerarmos estes resultados como critério para a aplicação da Rhlg, haveria falha na aplicação em 3 das 1869 gestantes. Portanto se a Rhlg fosse aplicada considerando apenas os resultados positivos, a sensibilidade do teste seria 96,6% (IC = 95.5% - 97.6%) e a especificidade 98%

(IC = 96.7% - 98.8%). Se fosse aplicada considerando também os casos inconclusivos, a sensibilidade seria 99.7% (99.2% - 99.9%) e a especificidade 94% (92.0% - 95.5%)<sup>51</sup>.

Tabela 5: Comparação da genotipagem e fenotipagem Rh <sup>51</sup>

Genotipagem RhD	Classificação RhD do sangue do cordão	Número De amostras	%	Conclusão
<i>RhD</i> -positivo	RhD-postivo	1118	59.8	Correto
<i>RhD</i> -negativo	RhD-negativo	670	35.9	Correto
<i>RhD</i> -positivo	RhD-negativo	14	0.8	Falso positivo
<i>RhD</i> -negativo	RhD postivo	3	0.2	Falso negativo
<i>RHD</i> - variante	4 RhD positivo / 4 RhD negativo	8	0.4	Inconclusivo
Inconclusivo	13 RhD postivo / 18 RhD negativo	31	1.7	Inconclusivo
Inconclusivo‡	18 RhD postivo / 7 RhD negativo	25	1.3	Inconclusivo

#### 4 – Método

Para o mapeamento das condições para a implantação da genotipagem RhD fetal no SUS foram utilizados os conceitos do método de Planejamento Estratégico Situacional (PES) propostos por Carlos Matus. . Embora este método tenha sido desenhado para ser aplicado no nível central de governabilidade, seu formato flexível também possibilita sua aplicação a níveis regionais e setoriais. O método PES prevê quatro momentos para o processamento dos problemas: Momento explicativo, Momento normativo, Momento estratégico e Momento tático-operacional. O conceito “momento” vem para substituir a ideia de “etapas” visando uma ação mais dinâmica e interativa no processo de planejamento (Figura 1)<sup>96</sup>. O Momento explicativo prevê o diagnóstico situacional, a identificação dos problemas e o estabelecimento

das prioridades. O momento normativo formula os objetivos e o prazo para executá-los, o Momento estratégico analisa a viabilidade dos planos e os atores envolvidos no processo e o momento operacional estabelece a execução dos planos e a avaliação das mudanças <sup>96</sup>.



Figura 1: Interação entre as diversas fases (momentos) do PES <sup>96</sup>

#### 4.1 - Momento explicativo

Todas as diretrizes para o acompanhamento pré-natal a gestantes de baixo e alto risco estão estabelecidas respectivamente nos manuais: Manual Técnico de Pré-Natal e Puerpério – Atenção Qualificada e Humanizada, edição 2005<sup>84</sup> e Manual Técnico do Ministério sobre Gestação de Alto Risco, edição 2010<sup>1</sup>. Segundo estes manuais, depois de estabelecido o diagnóstico da gravidade, o acompanhamento da mulher, no ciclo grávido-puerperal, deve ser iniciado o mais precocemente possível através de consultas de pré-natal realizadas na unidade de saúde ou durante visitas domiciliares. O acompanhamento só se encerra após o 42º dia de puerpério, período em que deverá ter sido realizada a consulta de puerpério. O calendário de atendimento pré-natal deve ser programado em função dos períodos gestacionais que

determinam maior risco materno e perinatal. Deve ser iniciado precocemente (primeiro trimestre) e deve ser regular e completo (garantindo-se que todas as avaliações propostas sejam realizadas e preenchendo-se o cartão da gestante e a ficha de pré-natal). O número mínimo de consultas de pré-natal deverá ser de seis consultas, preferencialmente, uma no primeiro trimestre, duas no segundo trimestre e três no último trimestre.

Na 1ª consulta devem ser solicitados diversos exames laboratoriais e entre eles a classificação sanguínea ABO e RhD.

Se a gestante for RhD-negativo, deve ser verificado o grupo sanguíneo do pai da criança. Se este for RhD-positivo, deve ser solicitado para a gestante, o teste indireto da antiglobulina humana (Coombs indireto) para investigar a presença de anticorpos anti-D. Se este for positivo a gestante deverá ser encaminhada ao pré-natal de alto risco<sup>1</sup> onde o seguimento dependerá do título de anticorpos anti-D e da história obstétrica de antecedente de acometimento fetal ou neonatal. Os algoritmos 1 (Anexo 1) e 2 (Anexo 2) do manual de gestação de alto-risco resumem a proposta de seguimento pré-natal. Nos centros onde não há disponibilidade de acesso a dopplervelocimetria com ultrassonografista experiente, pode-se utilizar a amniocentese seriada com espectrofotometria de líquido amniótico e análise da variação da densidade óptica da concentração de bilirrubina fetal no comprimento de onda de 450nm ( $\Delta DO_{450}$ ) plotada no gráfico de Liley. O número de consultas e procedimentos efetuados durante o pré-natal de gestantes RhD-negativo depende do risco da DHPN, do resultado do teste de Coombs indireto e da história obstétrica.

A tabela 3 resume o número de procedimentos efetuados nas gestantes durante o acompanhamento pré-natal considerando os resultados do teste de Coombs indireto (CI).

Tabela 6: Seguimento obstétrico baseado nos resultados do Coombs Indireto (CI)

Idade gestacional	Conduta frente ao resultado do 1º teste de Coombs Indireto realizado na 12ª semana de gestação		
	CI Negativo	CI Positivo < 32	CI Positivo ≥ 32
13ª semana			
14ª semana			CI + DPACM
16ª semana		CI	CI + DPACM
18ª semana			CI + DPACM
20ª semana		CI	CI + DPACM
22ª semana			CI + DPACM
24ª semana		CI	CI + DPACM
26ª semana		CI	CI + DPACM
28ª semana		CI	CI + DPACM
29ª semana			CI + DPACM
30ª semana	CI	CI	CI + DPACM
31ª semana			CI + DPACM
32ª semana	*	CI	CI + DPACM
33ª semana			CI + DPACM
34ª semana		CI	CI + DPACM
35ª semana			CI + DPACM
36ª semana		CI	CI + DPACM
37ª semana			CI + DPACM
38ª semana		CI	CI + DPACM
39ª semana			
40ª semana			
Número de procedimentos a serem realizados	2	11	19 + 18

\* Aplicar a Rhlg

Na tabela observamos que segundo orientações do manual técnico do M.S. de 2010<sup>1</sup>, gestantes RhD negativo devem realizar o teste de Coombs direto em torno da 12ª semana de gestação e se este for negativo deverá ser

repetido na 30<sup>a</sup> semana. Quando o resultado do 1<sup>o</sup> teste de CI é positivo, o seguimento pré-natal dependerá título de anticorpos. Se o título for  $\leq 32$  o número de testes de CI realizados é 11. Se  $\geq 32$  o número de testes de CI realizados é 11 e paralelamente deverá ser realizada a DPACM num total de 18 testes.

Na prevenção da sensibilização materna, o mesmo Manual determina que em toda gestante RhD-negativo não aloimunizada com risco para a DHPN deva ser aplicada a Rhlg após o parto ou aborto pois a principal causa da aloimunização Rh é a passagem de hemácias fetais RhD-positivo para a circulação materna durante o parto. Embora durante a gestação, o transito de células fetais para a circulação da mãe seja pequeno, o Manual também determina que a Rhlg deva ser administrada entre a 28<sup>a</sup> e 34<sup>a</sup> semana de gestação e após qualquer evento clínico ou procedimento com possibilidade de sangramento feto-materno e portanto aumento da chance de imunização. Devido a estes riscos, O exato mecanismo de ação da imunoglobulina não é bem conhecido<sup>91, 92</sup>. Porém vários estudos demonstram que a prática da aplicação da Rhlg entre a 28<sup>a</sup> e 34<sup>a</sup> semana de gestação diminuiu o risco de imunização anti-D na 1<sup>a</sup> gestação de 1% para 0,2%<sup>93</sup>.

#### **4.1.1 – Impacto da Genotipagem *RHD* no acesso ao pré-natal de alto risco**

A genotipagem RhD a partir do DNA fetal livre no plasma materno não é vital para o acompanhamento de gestantes RhD-negativo. No entanto, sua introdução na rotina pré-natal destas gestantes terá um efeito positivo sobre diferentes aspectos assistências da saúde materno-fetal. São eles:

- Dificuldade de acesso ao pré-natal de alto-risco;

- Carência de Imunoglobulina anti-D (RhIg)
- Número elevado de exames para avaliação de risco fetal
- Indicação equivocada de procedimentos invasivos
- Indicação de parto precoce contribuindo para a alta taxa de óbito relacionado à prematuridade
- Carência de leitos em UTI pediátrica

O grupo sanguíneo RhD de recém-natos filhos de mulheres RhD-negativo depende do grupo sanguíneo paterno e em especial da zigosidade deste gene nos indivíduos RhD-positivo. Num relatório publicado em 2006 pelo grupo que compõe a Safenetwork, a frequência de nascimentos de RN RhD-negativo em mulheres RhD-negativo variou de 17,8% a 50%. Isto demonstra o grande polimorfismo genético que está diretamente relacionado à herança racial. No Brasil, Baiocchi e colaboradores estudaram durante um ano os fenótipos de puérperas e neonatos em duas maternidades de São Paulo e observaram que a prevalência de recém-natos RhD-negativo filhos de mulheres RhD-negativo foi de 27%<sup>86</sup>. Estes estudos demonstram que o conhecimento precoce do grupo sanguíneo fetal poderia afastar do pré-natal de alto risco um número considerável de gestantes RhD-negativo com fetos RhD-negativo e portanto sem risco para a DHPN.

Podemos estimar este número. O número anual de nascidos vivos no Brasil é de cerca de 3.000.000 (2.881.581) segundo dados do DATASUS de 2009<sup>87</sup>. Considerando que a frequência média de mulheres RhD-negativo no Brasil é em torno de 10%<sup>21</sup>, o número de gestantes RhD-negativo seria de 300.000. Considerando ainda as frequências antigênicas, aproximadamente 90% destas mulheres teriam parceiros RhD-positivo. Segundo a literatura,



entre os indivíduos RhD-positivo, 42% são homozigotos para o gene *RHD* e 48% apresentam o gene em dose única<sup>88</sup>. Sendo assim, dentre estas, teríamos a possibilidade de 72.000 (24%) mulheres darem a luz a recém-nato RhD-negativo e poderiam ser afastadas do pré-natal de alto risco. (Figura 2).

Considerando 3.000.000 partos ao ano e que em grande parte dos casos o grupo sanguíneo do parceiro é desconhecido, a realização da genotipagem RhD fetal teria o potencial de afastar do pré-natal de alto risco 34% das gestantes RhD-negativo. Estas mulheres poderiam retornar ao pré-natal de baixo risco aumentando a disponibilidade do acesso ao pré-natal de alto risco para as demais gestantes.

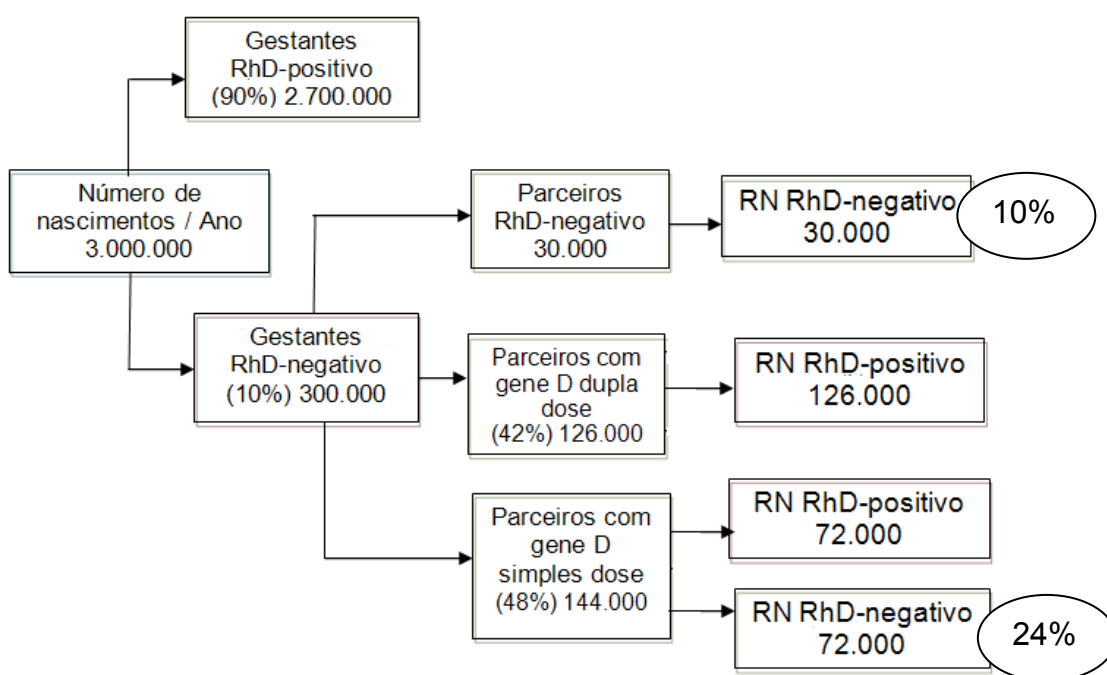


Figura 2: Projeção do número de gestantes RhD- negativo que poderiam ser afastadas do pré-natal de alto risco com a realização da genotipagem RhD.

#### 4.1.3 – A Genotipagem RHD e a utilização da imunoglobulina anti-D

Devemos, no entanto, levar em consideração que esta política de profilaxia agrega o custo da assistência pré-natal a gestantes RhD-negativo de maneira considerável. A Rhlg é um hemoderivado de origem humana de alto custo não produzida no país. A Rhlg não é isenta de riscos e há possibilidade de efeitos colaterais. Em um *workshop*, o grupo SAFE apresentou os resultados de um estudo sobre os efeitos da utilização da Rhlg. No período de Janeiro de 2005 e Julho de 2007 foram aplicados 580.000 frascos (250 µg) de Rhlg e foram relatadas 28 reações adversas: 8 *rashes* cutâneos, 3 inflamações no local da aplicação, 3 pacientes apresentaram vômitos, 1 reação anafilática e 13 outras reações não específicas. O risco de encontrar uma partícula de vírus HBV, HCV e HIV em uma dose foi estimado usando um modelo probabilístico cobrindo todo o processo do doador ao produto acabado. Esta probabilidade foi de 1 em  $2,5 \times 10^{13}$  para HBV, 1 em  $2 \times 10^{10}$  para HCV e 1 em  $5 \times 10^{11}$  para HIV<sup>94</sup>.

Outro ponto fundamental é que embora o Manual de gestação de alto-risco indique a aplicação da Rhlg, não existe um programa nacional que aborde a questão da imunização RhD de maneira mais ampliada garantindo a compra e distribuição regular da Rhlg para todas as unidades do SUS. A falha na sua administração acontece mesmo considerando a situação como um evento sentinela.

A possibilidade do conhecimento do grupo sanguíneo fetal durante a gestação levaria a uma melhor indicação na aplicação da Rhlg durante a gestação, aumentando sua disponibilidade para as mulheres que realmente estão em risco.

#### **4.1.2 - Genotipagem *RHD* e a prematuridade**

Na DHPN, a antecipação do parto tem por finalidade eliminar a causa da doença, ou seja, a passagem ativa dos anticorpos maternos<sup>1</sup> através da placenta que leva a destruição das hemácias e ao quadro de anemia. No entanto o parto precoce expõe o neonato a afecções perinatais relacionadas à prematuridade como o desconforto respiratório do recém-nascido, a enterocolite necrotizante e as infecções. A prematuridade é uma causa importante de morbidade e mortalidade neonatal<sup>90</sup>. O número de óbitos relacionados à prematuridade no Brasil vem crescendo. Em 1997 esse número era de 2.774 passando para 3.675 em 2006<sup>89</sup>. Por consequência, frente a indicação do parto precoce se faz necessário reserva de leito em Unidades de tratamento Intensivo (UTI neonatal). No Brasil há carência de leitos em UTI neonatal principalmente destinado à população SUS-dependente. A possibilidade da genotipagem RhD fetal e o conhecimento antenatal do grupo sanguíneo fetal levaria a redução do número de indicações de parto prematuro disponibilizando leitos de UTI neonatal para outras afecções que acometem o neonato.

#### **4.2- Momento normativo**

A introdução da genotipagem RhD a partir do DNA fetal livre no plasma materno em gestantes RhD-negativo é uma ferramenta eficaz na análise de risco fetal para o desenvolvimento da DHPN. Esta tecnologia não é utilizada na rotina pré-natal de gestantes RhD-negativo que são acompanhadas no SUS. Neste estudo, sua implantação é analisada tendo por base a realidade do município do Rio de Janeiro. Isto ocorreu em função de uma parceria que

existe entre o Instituto Fernandes Figueira e o HEMORIO intitulado “Determinação antenatal da genotipagem RhD fetal a partir do plasma materno como uma ferramenta de acompanhamento de gestantes RhD-negativo”, aprovado e registrado no CEP/IFF sob número CAAE 003400800011, que visa realizar a genotipagem RhD fetal em amostras de plasma de 100 gestantes RhD-negativo aloimunizadas e cujos resultados complementarão as informações necessárias para sua implantação.

#### **4.2.1 – Cenários para a implantação da genotipagem RhD**

Os fatores para a implantação da genotipagem RHD fetal contemplam dois diferentes cenários, que devem ser analisados distintamente. São estes:

- Cenário 1: gestantes RHD negativo não aloimunizadas;
- Cenário 2: gestantes RHD negativo aloimunizadas;

No cenário 1, como as gestantes não estão aloimunizadas, elas permanecem no pré-natal de baixo risco, realizam pelo menos dois testes de Coombs indireto e devem receber uma dose de Rhlg entre a 28<sup>a</sup> e 34<sup>a</sup> semana. A introdução da genotipagem RHD fetal neste grupo apresenta como vantagem a identificação precoce das gestantes com real risco para aloimunização e DHPN (aquelas com fetos RhD-positivo), melhorando a indicação Rhlg e como consequência uma racionalização no uso deste hemoterápico e dos recursos da assistência pré-natal.

No cenário 2, como as gestantes são aloimunizadas, elas são acompanhadas em pré-natal de alto risco em centro de referência para DHPN onde são submetidas a consultas constantes e a realização de exames de alta complexidade incluindo aqueles invasivos como amniocentese ou

cordocentese. A introdução da genotipagem RhD permitiria a identificação das gestantes com real risco para DHPN e as demais gestantes seriam encaminhadas para o pré-natal de baixo de risco. Como consequência levaria ao aumento da oferta de pré-natal de alto risco e otimização de recursos do pré-natal de alto risco.

A implantação da genotipagem RhD fetal em ambos os cenários apresenta certas particularidades que necessitam ser analisadas. Um ponto crítico para este ensaio é a qualidade das amostras coletadas. Amostras coletadas inadequadamente ou mal conservadas podem acarretar falso resultado. Assim ao considerarmos o cenário 1, como o pré-natal de baixo risco se dá em unidades de saúde descentralizadas e espalhadas nos diversos municípios do estado, a padronização da coleta e envio de amostras para a realização dos testes seria bem complexa. Se optássemos pelo encaminhamento das gestantes para o centro de referência para coleta e realização dos testes, da mesma forma, como estas gestantes residem em áreas próximas das unidades de assistência pré-natal, o deslocamento das mesmas agregaria complexidade ao processo. Ao considerarmos o cenário 2, como as gestantes são acompanhadas em um centro de referência específico, a padronização da coleta e envio de amostra demandaria menor complexidade, no entanto haveria necessidade de profissionais habilitados para coleta e manipulação de amostras destinadas a ensaios moleculares. Outro aspecto que envolve ambos os cenários diz respeito aos profissionais que teriam que solicitar os exames, esclarecer as gestantes sobre a potencialidade da genotipagem RhD fetal, solicitar a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e posteriormente, documentar os resultados e deflagrar as ações

pertinentes de acordo com o resultado recebido (contraindicar a aplicação da Rhlg em gestantes não aloimunizadas com fetos RhD-negativo ou encaminhar ao pré-natal de baixo risco as aloimunizadas).

A atual demanda nacional de hemoderivados importados no Brasil, entre eles a Rhlg, representa um custo anual estimado de R\$ 500.000.000,00. Buscando a autossuficiência no setor de derivados do sangue, em 2 de dezembro de 2004 foi criada a Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás). A empresa teve seu estatuto aprovado em 28 de março de 2005. A HEMOBRÁS é uma estatal vinculada ao Ministério da Saúde e embora a empresa já tenha iniciado suas atividades e dentre seus objetivos esteja, a produção de Rhlg, a matéria prima para sua produção é humana (plasma de doadores apresentando anticorpos anti-D) e cada vez mais escassa. Portanto, todas as medidas que possam levar a redução de seu consumo são importantes. Neste contexto, a realização da genotipagem RhD fetal teria um potencial significativo pois identificaria as gestantes RhD-negativo com fetos RhD-negativo reduzindo a utilização da Rhlg em aproximadamente 25%.

#### **4.2.2 – Ações considerando o Cenário 1**

Neste cenário os dois principais atores são:

- Rede municipal de assistência pré-natal do Rio de Janeiro e
- HEMORIO

A SMS do Rio de Janeiro é responsável pela assistência pré-natal da maior parte das gestantes da cidade. O Município conta hoje com cinco Áreas de Planejamento (AP's), 33 Regiões Administrativas e 160 bairros. A

assistência pré-natal é realizada de forma descentralizada em postos de saúde e maternidades distribuídas nas cinco AP's. As gestantes são encaminhadas preferencialmente às unidades de saúde próximas de sua residência. Cada unidade básica de atendimento se relaciona a uma maternidade de referência.

As principais maternidades municipais do Rio de Janeiro são:

- Hospital Maternidade Oswaldo Nazareth,
- Hospital Maternidade Fernando Magalhães,
- Hospital Municipal Miguel Couto,
- Hospital Maternidade Carmela Dutra,
- Hospital Maternidade Herculano Pinheiro,
- Hospital Maternidade Alexander Fleming e
- Maternidade Leila Diniz.

Todas estas unidades estão aptas para realização do pré-natal de baixo risco. O grupo sanguíneo materno é solicitado na 1ª consulta de pré-natal. Caso a gestante seja RhD-negativo, é solicitado o teste indireto da antiglobulina humana (Teste de Coombs Indireto). Quando o teste de Coombs indireto é positivo, a gestante deve ser encaminhada ao pré-natal de alto risco onde o seguimento obstétrico dependerá do título de anticorpos anti-D.

Neste cenário, as gestantes deverão ser encaminhadas ao HEMORIO para coleta e realização dos ensaios, pois as maiorias das unidades assistenciais não realizam coleta de amostras e também porque, devido a uma particularidade da técnica de genotipagem RhD, as amostras coletadas devem ser centrifugadas na 1ª hora após a coleta.

As unidades assistenciais municipais seriam os responsáveis pela identificação das gestantes em risco para a DHPN, solicitação e

encaminhamento das gestantes ao HEMORIO e posteriormente recebimento dos resultados. O fluxo de atendimento, portanto seria:

- Atendimento da gestante na unidade
- Esclarecimento sobre a potencialidade da genotipagem RhD fetal
- Encaminhamento da gestante ao HEMORIO
- Recebimento do resultado
- Novo esclarecimento à gestante do grupo sanguíneo RhD do feto.

Nas unidades básicas, o atendimento pré-natal de baixo risco é realizado por enfermeiros. Neste caso tais profissionais necessitariam ser capacitados para encaminhamento e recebimento dos resultados dos exames.

Neste cenário, o HEMORIO seria o responsável por todo o processo. Desta forma o fluxo de atendimento das gestantes seria:

- Recepção e cadastro das gestantes,
- Realização de cadastro,
- Coleta de amostra,
- Armazenamento da amostra,
- Realização do exame,
- Emissão e envio dos resultados.

A recepção, o cadastro e a coleta de amostras se dão em uma área própria para atendimento de pacientes externos. O atendimento a estes pacientes se dá de 2<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> feira no horário de 10.00 as 12.00h. Durante o cadastro também seria solicitada a assinatura do Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). Para a realização da genotipagem *RhD* fetal não há necessidade de jejum e portanto não há prejuízos a saúde da gestante. Como o quantitativo previsto de gestantes é pequeno (cerca de 180 por mês), a



logística de atendimento poderia considerar a distribuição diária de pacientes de acordo com as AP's de origem.

As amostras acompanhadas dos termos de consentimento livre esclarecido seriam posteriormente enviadas para o laboratório. As amostras seriam centrifugadas na 1ª hora após a coleta e acondicionadas para realização dos testes uma vez por semana. Os TCLE seriam arquivados.

Os resultados poderiam ser disponibilizados através de envio por fax, e-mail ou acesso direto através da internet. Esta logística poupa a gestante do deslocamento para o recebimento do resultado do exame.

#### **4.2.3 – Ações considerando o Cenário 2**

Neste cenário os dois principais atores são:

- Instituto Fernandes Figueira (IFF)
- HEMORIO

O Instituto Fernandes Figueira é um órgão federal de referência para o risco fetal e desempenha um papel fundamental na assistência a gestantes aloimunizadas em risco para a DHPN. Como centro de pesquisa, realiza avaliações para o desenvolvimento de tecnologias em Saúde através de seu Núcleo de Avaliação de Tecnologias em Saúde do IFF (NATS/IFF) e elabora pareceres para o Ministério da Saúde para o desenvolvimento de projetos de pesquisa sobre tecnologias para saúde da mulher, da criança e do adolescente.

- Atendimento da gestante no IFF
- Esclarecimento sobre a potencialidade da genotipagem RhD fetal
- Solicitação do teste

- Entrevista com a gestante na Unidade transfusional do IFF:
- Coleta das amostras.
- Centrifugação da amostra
- Armazenamento das amostras no IFF
- Transporte das amostras para o HEMORIO

Neste cenário as amostras seriam coletadas na Agência transfusional do IFF após a entrevista com a gestante onde além do cadastro também seria solicitada a assinatura do Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). As amostras seriam acondicionadas em freezer a  $-30^{\circ}\text{C}$  até o momento do transporte para o HEMORIO acompanhadas dos TCLE.

O HEMORIO receberia as amostras, acondicionaria até a realização dos testes, arquivaria os TCLE e, após a realização dos testes, disponibilizaria os resultados através de envio por fax, e-mail ou acesso direto através da internet.

### **4.3- Momento estratégico**

#### **4.3.1 - Atores envolvidos no processo de implantação a tecnologia no SUS**

As ações para implantação desta nova tecnologia na assistência pré-natal envolvem diversos atores. Os principais são:

- Ministério da Saúde: Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) Secretaria de Assistência a Saúde (SAS) e hospitais de referência,
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),
- Governos Municipais: Secretaria Municipal de Saúde e
- Governos Estaduais: Secretaria Estadual de Saúde.

O Ministério da Saúde desempenha importante papel na regulação, liberação de recursos e na assistência. Os principais órgãos do MS envolvidos são: Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) e Secretaria de Assistência a Saúde (SAS). A DECIT, através da Comissão de Incorporação de Tecnologias do Ministério da Saúde (Citec) é responsável por receber as propostas de incorporação ou exclusão de tecnologias no SUS, revisão de diretrizes clínicas, protocolos terapêuticos e assistenciais.

A Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde (SAS/MS) agrega informações necessárias ao registro informação relacionadas ao perfil epidemiológico da população a ser beneficiada pela tecnologia, à infraestrutura necessária para uma adequada assistência, à estimativa de custo e à cobertura a ser oferecida.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem a missão de regular as tecnologias, normatizando a entrada no mercado brasileiro. A ANVISA, através dos Hospitais Sentinelas, uma rede de mais de cem hospitais, é responsável pelo monitoramento de ocorrência de eventos adversos relativos ao uso de medicamentos e produtos para a saúde em todo o país.

Os governos estaduais e municipais desempenham importante papel na incorporação de novas tecnologias. Neste projeto as Secretarias Municipal (SMS) e Estadual (SES) de Saúde tem um importante papel.

As **SMS** são responsáveis por grande parte das unidades de atendimento pré-natal e, portanto desempenha um importante papel assistencial, estando diretamente envolvida na liberação de recursos, na logística de encaminhamento das amostras, na comunicação de resultados, na

identificação das gestantes em risco e no encaminhamento das mesmas ao centro de referência.

As **SES** através dos Hemocentros coordenadores, que são as instituições identificadas como tendo potencial para a realização dos ensaios, desempenham um importante papel através da disponibilização de recursos.

#### **4.4- Momento tático-operacional**

##### **4.4.1 – Papel dos Hemocentros**

Os Hemocentros das principais capitais do país já contribuem para o suporte à saúde da família, em especial saúde materno-infantil participando da triagem neonatal através da realização da pesquisa de hemoglobina S ao nascimento. No Rio de Janeiro, o HEMORIO comemorou, em 2010, 10 anos de participação no programa de Triagem neonatal o que lhe confere importante experiência na logística de recebimento de amostras externas e no envio dos resultados.

Está concentrada também nos Hemocentros a realização de testes sorológicos para doenças infectocontagiosas em amostras de doadores oriundos dos diversos Hemonúcleos do Estado o que amplia a capacidade destas instituições na realização de exames para a rede pública brasileira.

##### **4.4.2- Disponibilidade de Recursos Públicos**

Os gastos para a implantação do piloto estão relacionados à:

- Compra de insumos,
- Capacitação técnica,

— Compra ou desenvolvimento de um software de gerenciamento.

A possibilidade de utilização da estrutura já existente nos Hemocentros, ou seja, infraestrutura e recursos humanos reduzem, em muito, o custo da implantação. As unidades de assistenciais poderiam contar com as equipes já instaladas. O custo principal do projeto estaria relacionado a compra de insumos, capacitação técnica e a aquisição do software. Considerando estas estimativas o investimento inicial seria da ordem de R\$30.000,00 e o valor aproximado do teste seria R\$80,00.

#### **4.7 - Manutenção do projeto**

Uma vez estabelecida e formalizada as parcerias entre as unidades de assistência e os Hemocentros, identificados como instituição com maior capacidade em abraçar o projeto, tendo em vista os investimentos efetuados pelo MS na implantação dos laboratórios do NAT, a manutenção do projeto está relacionada:

- Garantia de insumos,
- Fluxo de coleta de amostras,
- Realização dos ensaios e
- Análise e envio dos resultados.

A realização dos testes está condicionada a aquisição de insumos e manutenção da compra. Uma eventual falta de material não impacta o andamento do projeto, pois as amostras poderão ser mantidas congeladas a  $\leq 30^{\circ}\text{C}$  e processadas posteriormente. Da mesma forma a possibilidade do congelamento das amostras contornaria eventuais falhas de equipamentos embora os laboratórios estejam equipados com equipamentos de backup. O

único insumo cuja falta determinaria a parada do projeto é a falta dos tubos de coleta. Esta possibilidade é remota, pois os tubos utilizados no projeto são os mesmos utilizados na rotina da coleta de amostras de doadores de sangue.

## 5– Discussão

A genotipagem *RhD* utilizando o DNA livre no plasma materno mostra-se como uma técnica segura e eficaz apresentando vantagens e desvantagens. As principais desvantagens do método está relacionada à necessidade de uma estrutura prévia para o desenvolvimento do método e capacitação de pessoal em biologia molecular . Como vantagens, é um método não invasivo que permite o diagnóstico precoce do risco fetal o que pode levar a uma melhora na assistência pre-natal em especial aumentar a oferta do pré-natal de alto risco.

A introdução da genotipagem *RhD* fetal poderá promover um melhor acompanhamento de gestantes não só aquelas com risco para a DHPN por incompatibilidade Rh, apresenta também um grande potencial para ser utilizada na investigação da DHPN por outros sistemas eritrocitários.

Esta metodologia não invasiva também apresenta um grande potencial para o diagnóstico antenatal de diversas patologias que acometem o feto sobretudo as doenças genéticas.

A implantação da genotipagem *RhD* nos laboratórios que executam o NAT nos Hemocentros Brasileiros pode abrir novos horizontes para a genotipagem de grupos sanguíneos em doadores de sangue. A escassez dos soros raros limita a identificação de doadores com grupos sanguíneos especiais. A introdução da genotipagem utilizando a PCR em tempo real poderia promover a realização de um banco de doadores genotipados para os

diversos sistemas de grupos sanguíneos possibilitando um melhor suporte transfusional a pacientes aloimunizados. Também promoveria a possibilidade de um estoque estratégico de bolsas de sangue genotipadas e congeladas.

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é a unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, reativos e biofármacos voltados para atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional. Fundado em 1976, Bio-Manguinhos tem atuação destacada no cenário internacional. O investimento contínuo em desenvolvimento tecnológico e inovação é outra marca do Instituto, assim como o domínio de tecnologias de ponta e avançados processos de produção. Bio-Manguinhos em parceria técnico-científica com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) e com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) é o responsável pela produção do NAT brasileiro para HIV e HCV e, além da responsabilidade da produção, foi o responsável por todo planejamento de implantação dos laboratórios nos Hemocentros, através da avaliação das suas condições para o recebimento dos equipamentos necessários, orientações para eventuais adequações do local, instalação e validação das máquinas, realização de treinamento dos profissionais, e acompanhamento das rotinas. Bio-Manguinhos participa de uma contínua monitoração dos testes.

A missão de Bio-manguinhos é “Contribuir para a melhoria dos padrões de saúde pública brasileira, por meio de inovação, desenvolvimento tecnológico e produção de imunobiológicos e prestação de serviços para atender prioritariamente às demandas de saúde do país”. Portanto, Bio-manguinhos pode contribuir de maneira importante no processo de implantação da

genotipagem *RhD* fetal através da padronização dos testes nos laboratórios NAT já existentes nos diversos Hemocentros do Brasil. Uma das metas de Bio-manguinhos é o desenvolvimento de novas tecnologias, assim a produção de um kit de genotipagem *RhD* fetal brasileiro em muito reduziria os custos da desta metodologia nos serviços públicos.

## **6– Conclusão**

Concluimos que a implantação da genotipagem *RhD* fetal utilizando o DNA livre no plasma materno e a PCR em tempo real, no SUS, é factível. O cenário atual é extremamente favorável. A preocupação das três esferas do governo com a assistência integral à saúde materna e infantil promove um leque de investimentos amplos neste segmento. As possíveis ações conjuntas entre governo e instituições com expertise como Bio-manguinhos e Hemobrás, com o apoio de das diversas áreas assistenciais, da REBRATS e dos Núcleos de Avaliação de Tecnologias em Saúde possibilitariam a implantação desta tecnologia promovendo um melhor suporte diagnóstico para diferentes segmentos da saúde pública no Brasil.



## 7 – Referências:

- 1 Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Gestação de alto risco: manual técnico 5<sup>a</sup> Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- 2 Skupski DW. Fetal transfusion therapy. *Obstetrical and Gynecological Survey* 51: 181 (1996) PMID 8677057
- 3 Matthews C. *Obstetrics and gynecology recall* - 3rd ed.
- 4 Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--a meta-analysis. *Am J Obstet. Gynecol* 2007 Jul; 197(1):116-7; author reply 117-8.
- 5 Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10th ed. United Kingdom: Blackwell Science; 1997.
- 6 Bowman, JM. Fetomaternal hemorrhage following funipuncture: increase in severity of maternal red cell alloimmunization. *Obstrt Gynecol*, v.84, n. 5, p.839-43, 1994.
- 7 Machado I, Barini R. Doença Hemolítica Perinatal: Aspectos Atuais *Rev. Ci nc. M d.*, Campinas, 15(1): 69-74, jan./fev., 2006.
- 8 Joshi DD, Nickerson HJ, McManus MJ. Hydrops fetalis caused by homozygous alpha-thalassemia and Rh antigen alloimmunization: report of a survivor and literature review. *Clin Med Res* 2004; 2:228-32.
- 9 MOISE, K. J. J. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, v. 112, n. 1, p. 164-176, Jul. 2008.
- 10 Harman CR. Specialized applications of obstetric ultrasound: management of the alloimmunized pregnancy. *Semin Perinatol* 1985;9:184-97.
- 11 Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ Jr, Dorman KF, Ludomirsky A, Gonzalez R, Gomez R, Oz U, Detti L, Copel JA, Bahado-Singh R, Berry S, Martinez-Poyer J, Blackwell SC. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 2000; 342:9-14.
- 12 Zimmerman R, Carpenter RJJ, Durig P, Mari G. Longitudinal measurement of peak systolic velocity in the fetal middle cerebral artery for monitoring pregnancies complicated by red cell alloimmunisation: a prospective multicentre trial with intention-to-treat. *BJOG* 2002; 109:746-52.

- 13 Oepkes D, Seaward PG, Vandenbussche FP, Windrim R, Kingdom J, Beyene J, et al. Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia - *N Engl J Med* 2006;355:156–64.
- 14 Rezende J, Junqueira PC, Rezende Filho J. Doença Hemolítica Perinatal. In Rezende, J. *Obstetrícia*. 9ª Ed. Rio de Janeiro, 2002.
- 15 Nicolaides KH, Rodeck CH, Mibashan RS, Kemp JR. Have Liley charts outlived their usefulness? *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:90-4.
- 16 Cabral, AC et al. Isoimunização materna pelo fator Rh: Histórico e perspectiva. *Femina*, v. 28, n. 4, p. 205-207, maio 2000.
- 17 Murray JC, Karp LE, Williamson RA, Cheng EY, Luthy DA. Rh isoimmunization related to amniocentesis. *Am J Med Genet* 1983;16:527–34.
- 18 Skupski DW. Fetal transfusion therapy. *Obstetrical and Gynecological Survey* 51: 181 (1996) PMID 8677057
- 19 Brasil, Ministério da Saúde, DATASUS, Sistema de Informação de Nascidos Vivos SISNAC. Nascidos vivos em 2008. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def> Acessado em 10 de Fevereiro de 2011.
- 20 Nardoza LM, Lobo GR, Moron AF, Camano L, Araujo E Jr, Guimarães Filho HA. Anti-Lewis alloimmunization: report of seven cases. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008;35(4):311-2.
- 21 Novaretti MCZ, Dorlhiac PE, Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasoides e negroides na cidade de São Paulo - *Rev.bras.hematol. hemoter* 2000; 22(1):23-32
- 22 Amorim L, Ximenes GV, Susana TC, Mello SM, Castilho SL, Lopes MED. Reasons for anti-D alloimmunization in Brazilian blood donors – *Transfusion*, 2003; 43:96A.
- 23 Osanan, GC - Análise multivariada dos fatores determinantes da mortalidade perinatal de fetos submetidos a transfusão intraútero por anemia decorrente da isoimunização materna - Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Medicina, 2010.
- 24 Sá, CAM - Doença hemolítica perinatal pelo fator RhD: experiência de 10 anos do Instituto Fernandes Figueira - dissertação de mestrado apresentada como pré-requisito final para obtenção de título de mestre na Pós-graduação em Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

- 25 Brasil, Ministério da Saúde, DATASUS, Sistema de informações sobre mortalidade Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br> acessado em 10 de Fevereiro de 2011.
- 26 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Área Técnica de Saúde da Mulher. Parto, aborto e puerpério: assistência humanizada à mulher/ Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Área Técnica da Mulher. – Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- 27 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Política nacional de atenção integral à saúde da mulher: princípios e diretrizes / Ministério da Saúde, Estratégicas. Política nacional de atenção integral à saúde da mulher : princípios e diretrizes / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009.
- 28- Levine P, Celano MJ, Wallace J, Sanger R. A human 'D-like' antibody - Nature. 1963; 198:596-597.
- 29- Westhoff, CM., Wylie DE. Investigation of the human Rh blood group system in nonhuman primates and other species with serologic and Southern blot analysis - J.Mol. Evol 1994; 39:87–92
- 30- Novaretti MCZ, Dorlhiac PE, Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasoides e negroides na cidade de São Paulo - Rev.bras.hematol.hemoter 2000; 22(1):23-32
- 31- Amorim L, Ximenes GV, Susana TC, Mello SM, Castilho SL, Lopes MED. Reasons for anti-D alloimmunization in Brazilian blood donors – Transfusion, 2003; 43:96A
- 32- Klein HG., Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11th Edition February 2006.
- 33 Avent, N.D.; Reid, M.E. The Rh blood group system: a review. Blood, New York, v. 95, n.02, p. 375-387, Jan. 2000
- 34 Singleton, B.K. et al.. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. Blood, Bristol, v. 95, n. 1, p. 12-18, Jan. 2000 58
- 35 Daniels GL, Faas BHW, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, von Zondervan HA, dem Borne AEGK, van der Schoot CE: The Rh VS and V blood group polymorphisms in Africans. a serological and molecular analysis - Transfusion 1998; 38:951–958.

- 36 Mandel P, Métais P: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme - C R Acad Sci Paris 1948; 42:241–243
- 37 Lo, Y.M., Hjelm, N.M., Fidler, C., Sargent, I.L., Murphy, M.F., Chamberlain, P.F., Poon, P.M., Redman, C.W. and Wainscoat, J.S. (1998) Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N. Engl. J. Med. 339, 1734–1738
- 38 Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms - Clin Chem 2004; 50:1002–1011
- 39 Shimada K, Murakami K, Shozu M, Segawa T, Sumitani H, Inoue M. Sex-determining region Y levels in maternal plasma: evaluation in abnormal pregnancy- J Obstet Gynaecol Res 2004;30:148–154
- 40 Van Wijk IJ, de Hoon AC, Jurhawan R, Tjoa ML, Griffioen S, Mulders MAM, van Vugt JMG, Oudejans CBM. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. - Clin Chem 2000; 46:729–731
- 41 Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential – a review. Placenta 2004; 25 (Trophoblast Res): S93– S101.
- 42 Levy R, Nelson DM: To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast - Placenta 2000; 21:1–13.
- 43 Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K, Saito H, Okai T. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta - Hum Genet 2003; 113:307– 310
- 44 Lo YMD, Zhanf J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma - Am J Hum Genet 1999; 64:218–224.
- 45 Nelson DM, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kroneberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma - Vox Sang 2001; 80:112–116
- 46 Machado, I.N. et al.. Fetal RHD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. Rev. Assoc. Med. Bras., Campinas, v.52, n.4, p.232-235, Aug, 2006.
- 47 Novais, CM e Alves, MP - PCR em tempo real, Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - Edição nº 33 - julho/dezembro 2004

- 48 Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of foetal RHD-specific sequences in maternal plasma - *Lancet*. 1998 Oct 10;352(9135):1196
- 49 Schmidt, LC - Genotipagem RHD fetal no plasma materno como ferramenta não invasiva na predição do risco da doença hemolítica perinatal em gestantes RhD negativo - Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito básico para obtenção do grau de Mestre em Genética, 2010.
- 50 Legler, T.J. et al.. Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion Apheres Sci*, Göttingen, v.40, n.3, p.153-157, Jun., 2009
- 51 Finning, K. et al.. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ*, Bristol, v. 336, p. 816-18, April. 2008
- 52 Gautier et al.. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Neuilly, v. 192, n. 3, p. 666-669, Mar., 2005
- 53 Brojer, E. et al.. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion*, Warsaw, v. 45, n.9, p. 1473-1480, Sept., 2005.
- 54 Müller, S.P. et al.. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*, Göttingen, v.48, n.11, p.2292-2301, Nov., 2008
- 55 Minon, J.M. et al.. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion*, Liège, v. 48, n.2, p. 373-381, Feb., 2008
- 56 Maddocks, DG et al - The SAFE project: towards non-invasive prenatal Diagnosis *Biochemical Society Transactions* volume 37, part 2, 2009.
- 57 Turner, M.J., Martin, C.M. and O'Leary, J.J. (2003) Detection of fetal rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 108, 29-32

- 58 Gonzalez-Gonzalez, C., Garcia-Hovos, M., Trujillo-Tiebas, M.J., Lorda-Sanchez, I., de Alba, M.R., Infantes, F., Gallego, J., Diaz-Recasens, J., Ayuso, C. and Ramos, C. (2005) Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 307–314
- 59 Randen, I., Hauge, R., Kjeldsen-Kragh, J. and Fagerhol, M.K. (2003) Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang.* 85, 300–306
- 60 Zhou, L., Thorson, J.A., Nugent, C., Davenport, R.D., Butch, S.H. and Judd, W.J. (2005) Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193, 1966–1971
- 61 Legler, T.J., Lynen, R., Maas, J.H., Pindur, G., Kulenkampff, D., Suren, A., Osmers, R. and Kohler, M. (2002) Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus. Apher. Sci.* 27, 217–223
- 62 Zhang, J., Fidler, C., Murphy, M.F., Chamberlain, P.F., Sargent, I.L., Redman, C.W., Hjelm, N.M., Wainscoat, J.S. and Lo, Y.M. (2000) Determination of fetal RhD status by maternal plasma DNA analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 906, 153–155
- 63 Clausen, F.B., Krog, G.R., Rieneck, K., Nielsen, L.K., Lundquist, R., Finning, K., Dickmeiss, E., Hedegaard, M. and Dziegiel, M.H. (2005) Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat. Diagn.* 25, 1040–1044
- 64 Rijnders, R.J.P., Christiaens, G.C.M.L., Bossers, B., van der Smagt, J.J., van der Schoot, C.E. and de Haas, M. (2004) Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet. Gynecol.* 103, 157–164
- 65 Rouillac-Le Sciellar, C., Serazin, V., Brossard, Y., Oudin, O., Le Van Kim, C., Colin, Y., Guidicelli, Y., Menu, M. and Cartron, J.P. (2007) Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed free DNA fetal kit RhD. *Trans. Clin. Biol.* 14, 72–577
- 66 Finning, K., Martin, P., Summers, J. and Daniels, G. (2007) Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, C and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion* 47, 2126–2133
- 67 Rouillac-Le Sciellour, C., Pullandre, P., Gillot, R., Baulard, C., Metral, S., Le Van Kim, C., Cartron, J.P. and Brossard, Y. (2004) Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma from RhD-negative pregnant women. *Mol. Diagn.* 8, 23–31

- 68 Finning, K.M., Martin, P.G., Soothill, P.W. and Avent, N.D. (2002) Prediction of fetal Rh D status from maternal plasma: introduction of a new non-invasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 42,
- 69 Costa, J.M., Giovangrandi, Y., Ernault, P., Lohmann, L., Nataf, V., El Halali, N. and Gautier, E. (2002) Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br. J. Haematol.* 119, 255–260
- 70 Harper, T.C., Finning, K.M., Martin, P. and Moise, Jr, K.J. (2004) Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191, 1730–1732
- 71 Finning, K., Martin, P. and Daniels, G. (2004) A clinical service in the UK to predict fetal Rh (rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1022, 119–123
- 72 Hromadnikova, I., Vechetova, L., Vesela, K., Benesova, B., Doucha, J., Kulovany, E. and Vlk, R. (2005) Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn. Ther.* 20, 275–280
- 73 Hromadnikova, I., Vechetova, L., Vesela, K., Benesova, B., Doucha, J. and Vlk, R. (2005) Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 301–305
- 74 Chinen, P.A. et al. Noninvasive Determination of fetal Rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: Experience in a Brazilian population. *Am. J. Perinatol., New York, Am J Perinatol*, v.20, Apr, 2010
- 75 Portaria nº 723/GM - disponível em [portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cgrh\\_portaria\\_723\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cgrh_portaria_723_2010.pdf) acessado em 07 de agosto de 2011.
- 76 Portaria GM/MS 3.223 disponível no portal. [saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria\\_3323.pdf](http://saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_3323.pdf) acessado em 05 de agosto de 2011
- 77 Portaria Nº 2.587 disponível no [portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/port\\_gm2587.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/port_gm2587.pdf) acessado em 01 de agosto de 2011.
- 84 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada – manual técnico/Ministério da Saúde, Secretaria, 2005.

- 85 Legler, T.J., Liu, Z., Mavrou, A., Finning, K., Hromadnikova, I., Galbiati, S., Meaney, C., Hulten, Crea, F., Olsson, M.L., Maddocks, D.G. et al. (2007) Workshop report on the extraction of fetal DNA from maternal plasma.
- 86 2. Baiocchi E, Camano L, SASS N, Colas OR. Frequências dos grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO e RHD em puérperas e seus recém-nascidos - Rev Assoc Med Bras 2007; 53(1): 44-6
- 87 Número de nascidos vivos no ano de 2009, disponível no portal <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def> acessado em 07 de setembro de 2011
- 88 Santos, MCP – Uso da imunoglobulina humana em recém-nascidos com anemia hemolítica por aloimunização Rh (D): ensaio clínico, duplo cego, randomizado – tese apresentada para a Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.
- 89 “Mortes evitáveis em menores de 1 ano”, publicada na revista Cadernos de Saúde Pública, da Fundação Oswaldo Cruz, 2010
- 90 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas. Saúde da Criança e Aleitamento Materno. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Coordenação Geral de Informação e Análise Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009
- 91 Clarke CA, Donohoe WTA, Durkin CM, Lehane D, McConnell RB, Sheppard PM, et al. Prevention of Rh-haemolytic disease: results of the clinical trial. A combined study from center in England and Baltimore. BMJ 1966; 2:907-14.
- 92 Pollack W. Recent understanding for the mechanism by which passively administered Rh antibody suppresses the immune response to Rh antigen in unimmunized Rh negative women. Clin Obstet Gynecol 1982; 25:255-65.
- 93 Crowther CA, Middleton P. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation (Cochrane Review). - The Cochrane Library. Issue 1. Oxford:Update Software;2006).
- 94 Legler TJ, Muller SP, Haverkamp A, Grill S, Hahn S. 2009. Prenatal RhD testing: a review of studies published from 2006 to 2008. Transfus Med Hemother 36: 189–198
- 95 Portal. saude.gov.br/portal/.../pdf/complexo\_industrial\_da\_saude.pdf acessado em 07 de Julho de 2010



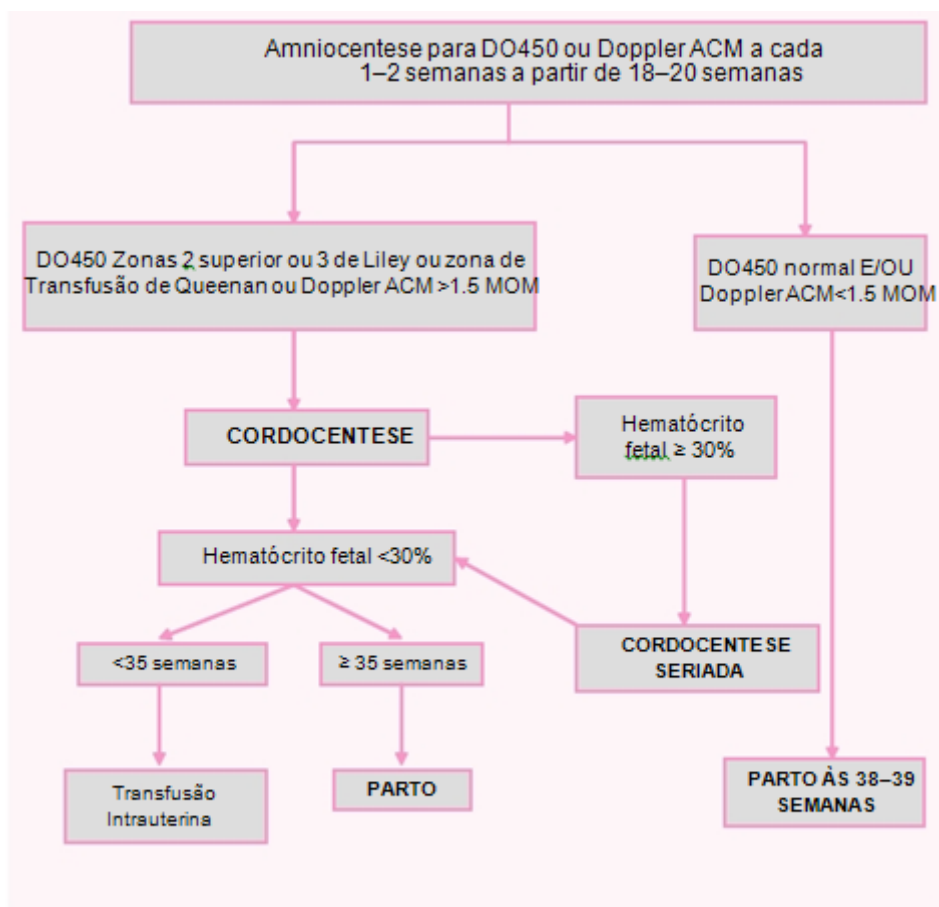
- 96 Tancredi, Francisco Bernadini, Planejamento em Saúde, volume 2 / Francisco Bernadini Tancredi, Susana Rosa Lopez Barrios, José Henrique Germann Ferreira. – – São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998. – – (Série Saúde & Cidadania)

## 8 – Anexos

- Anexo 1- Fluxograma de seguimento de isoimunização RH com antecedente de acometimento
- Anexo 2- Fluxograma de seguimento de isoimunização RH com primeira gestação afetada

## Anexo 1

## Fluxograma de seguimento de isoimunização RH com antecedente de acometimento



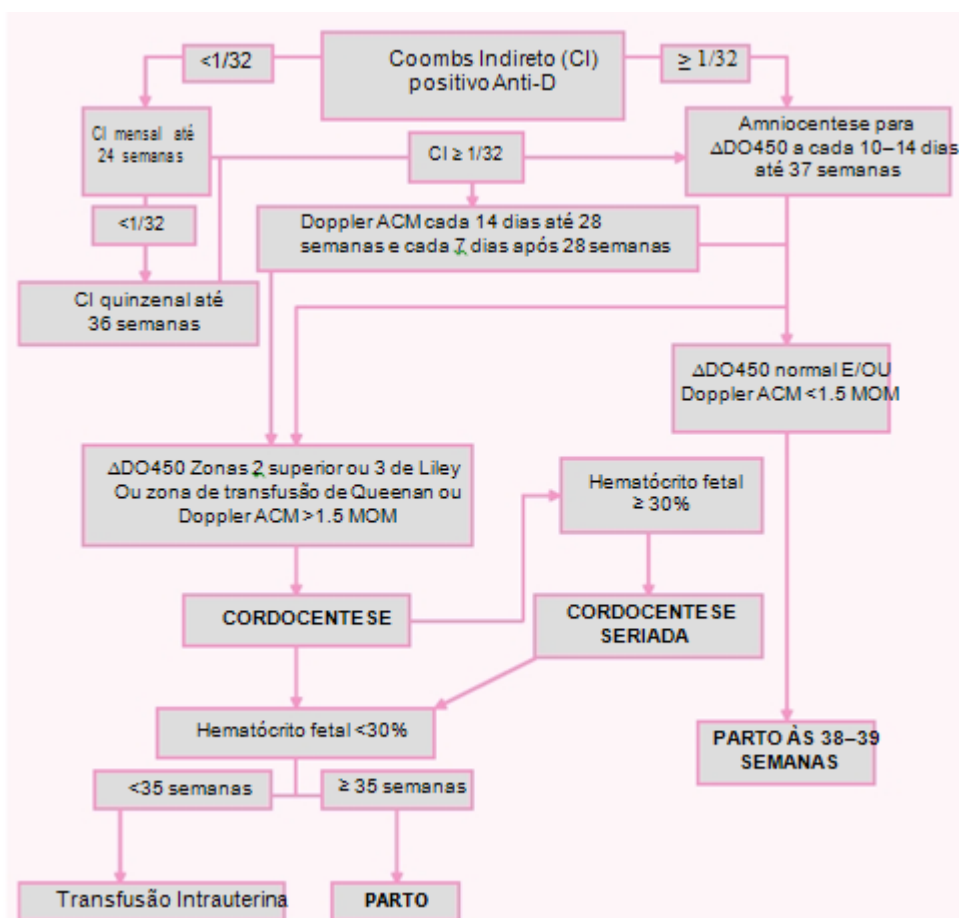
MOM = Múltiplos da mediana

ACM = Artéria cerebral média fetal

ACOMETIMENTO = história de perda perinatal associada à doença hemolítica do recém-nascido, antecedente de transfusão intrauterina ou de exsanguíneotransfusão neonatal. O título de CI não é preditivo do grau de anemia fetal. Observação: se o método de vigilância fetal escolhido for o Doppler da ACM, pelo menos uma amniocentese deve ser realizada ao redor de 35 semanas para a  $\Delta$ DO450, e, a partir de 37 semanas, para avaliar a maturidade fetal.

## Anexo 2

Fluxograma de seguimento de isoimunização RH com primeira gestação afetada



ACM = Arteria cerebral media fetal

MOM = Múltiplos da mediana

Observação: se o método de vigilância fetal escolhido for o Doppler da ACM, pelo menos uma amniocentese deve ser realizada ao redor de 35 semanas para a  $\Delta DO450$ , e, a partir de 37 semanas, para avaliar a maturidade fetal.

Fonte: Modificado de Moise, 2002.