

ENFERMEDAD HEMOLÍTICA PERINATAL CONTROL INMUNOHEMATOLÓGICO Y PROFILAXIS

RECOMENDACIONES PARA EL EQUIPO PERINATAL - 2010

Dirección Nacional de Maternidad e Infancia

Dres. M.A. Frailuna^a y O. Torres^a

1. DEFINICIÓN

La Enfermedad Hemolítica Perinatal (EHP) es una afección que sufre el feto y el recién nacido por pasaje trasplacentario de anticuerpos específicos contra la membrana del glóbulo rojo fetal, provocando anemia hemolítica.

2. INTRODUCCIÓN

La EHP Rh, considerada como un modelo ideal en la medicina perinatal, muestra la integración del mecanismo patológico, etiología, modificaciones fisiopatológicas, medidas de tratamiento y sobre todo, acciones de prevención.

La sensibilización por anti-D es la causa del 80-90% de las enfermedades hemolíticas clínicamente significativas del feto y recién nacido.

En una madre Rh negativo si el feto es Rh positivo y ABO incompatible el riesgo de inmunización por Rh es de un 1,5 a 2%; si tiene un aborto espontáneo es del 2% y entre el 4 y 5% si tiene una interrupción provocada.

Esta patología sigue siendo una preocupación para nuestro país como causante de morbimortalidad fetal y neonatal.

Factores que disminuyen la inmunización

- Respuesta inmunológica deprimida (enfermedades o fármacos).
- Presencia concomitante de incompatibilidad ABO.
- 1/3 de la población Rh(-) **no** responde al antígeno.

Factores de riesgo para inmunización

- Amenaza de aborto.
- Embarazo ectópico.
- Drogadicción endovenosa.
- Procedimientos invasivos: Punción de vellosidad

des coriales/Amniocentesis.

- Parto instrumental y cesárea.
- Placenta previa sangrante.
- Utilización de dosis innecesarias de drogas oclóticas.
- Versiones externas.
- Traumatismo abdominal durante el 3º trimestre
- Masaje uterinos y maniobra de Kristeler.
- Alumbramiento manual.
- Desprendimiento de placenta normoinsera.

3. CONTROL INMUNOHEMATOLÓGICO MATERNO-NEONATAL

Según lo estipulado en el ítem T10 de las Normas Técnicas de la Ley Nacional de Sangre N° 22.990, actualizadas en el año 2006 se deben efectuar:

3.1 Control en gestantes

Si el hospital asiste partos, el Servicio de Hemoterapia está **obligado** a realizar los estudios inmunohematológicos en forma universal a toda la población de embarazadas (*Figura 1*)

Objetivos

- Identificar embarazadas con riesgo de desarrollar EHP.
- Identificar mujeres D-Negativo que necesiten inmunoprofilaxis anti-D.
- Disponer rápidamente de sangre compatible para emergencias obstétricas y neonatales.
- Realizar el seguimiento serológico ante la presencia de Acs anti-eritrocitarios durante el embarazo con el objeto de:
 - Identificar el feto que pueda necesitar tratamiento antenatal.
 - Identificar la aparición de anticuerpos adicionales durante el curso de la gestación y/o indu-

a. Hospital Materno Infantil Ramón Sardá.

cidos por transfusiones intrauterinas.

- Predecir si un recién nacido requerirá tratamiento por EHP.

Por lo tanto, **en todas las pacientes** se deberán efectuar:

Anamnesis

- Antecedentes transfusionales.
- Embarazos, abortos, inseminación artificial, inmunoprofilaxis.
- Antecedentes de fetos o neonatos afectados por EHP.

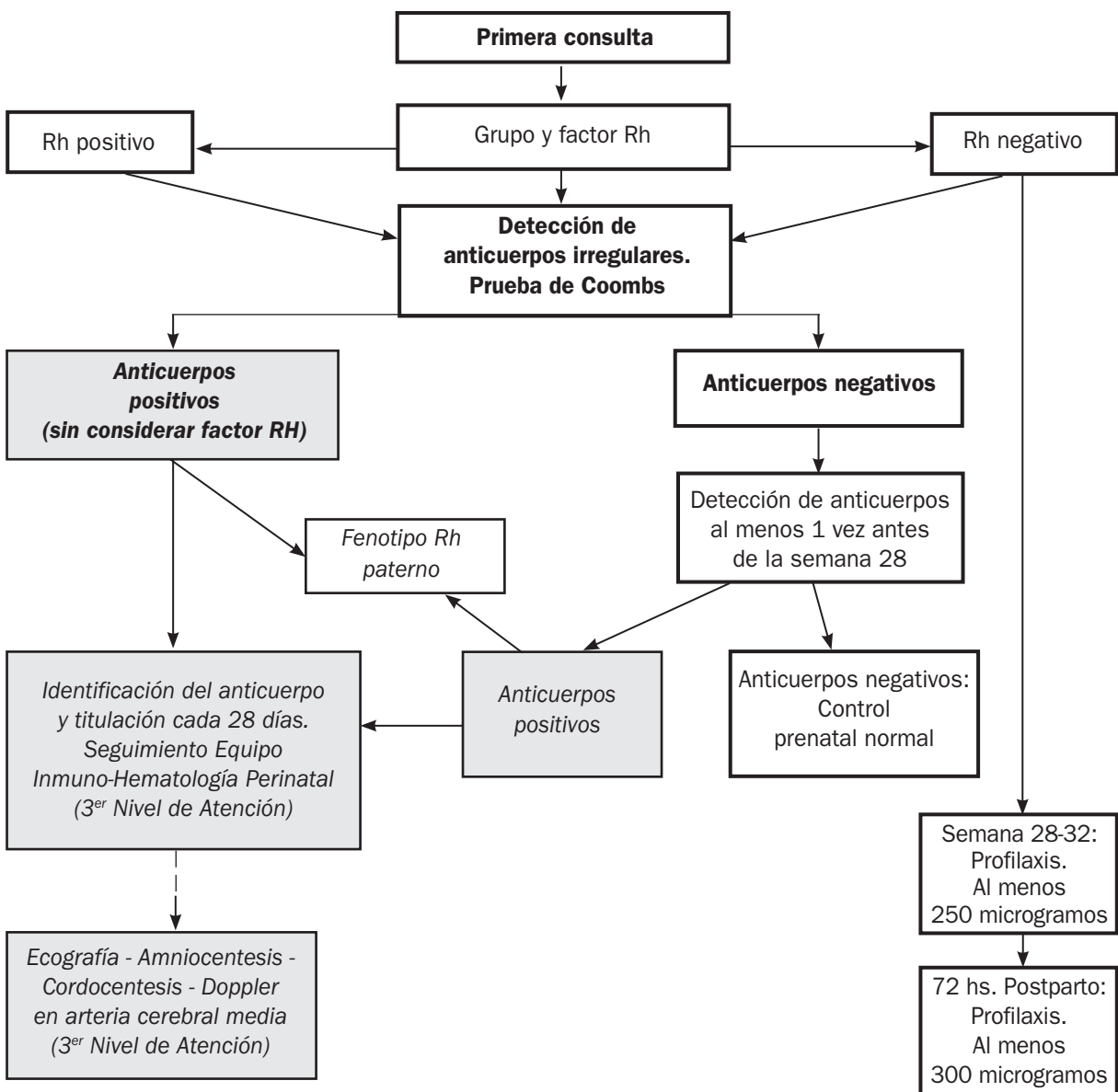
Controles inmunohematológicos

- Gestante: ABO, Rh (no investigar D débil o D^u), fenotipo Rh.
- Investigación de anticuerpos irregulares (Prueba de Coombs Indirecta)
- Pareja: ABO, Rh (D débil, cigocidad del fenotipo Rh).

Si la investigación de anticuerpos es positiva:

- Identificación del anticuerpo.
- Titulación de anticuerpo.

Figura 1. Algoritmo diagnóstico para embarazo único



Estos controles deberían ser efectuados inmediatamente después de la primera consulta obstétrica a los efectos de conocer en forma temprana posibles sensibilizaciones.

3.1.1 En gestantes con trabajo de parto y sin controles inmunohematológicos previos:

Antes o inmediatamente después del parto efectuar:

- Anamnesis según lo indicado anteriormente
- Control inmunohematológico:
 - ABO, Rh.
 - Investigación de anticuerpos irregulares (Coombs Indirecta)
 - Negativa:* Indicación de inmunoprofilaxis dentro de las 72 hs a excepción de madres con recién nacido Rh negativo.
 - Positiva:* Identificación del anticuerpo.

3.2 Control en neonatos

En todo neonato y dentro de las 6 hs postparto deben efectuarse en sangre de cordón los siguientes estudios:

- Grupo ABO, D (incluida la prueba para D débil), fenotipo Rh.
- Prueba antiglobulínica directa (prueba de Coombs directa).
- Si ésta es positiva, identificación del anticuerpo en eluido globular o suero de cordón. Seguimiento hematológico neonatal estricto.

4. INMUNOPROFILAXIS

Se ha estimado que en el 5% de las parejas existe incompatibilidad Rh; sin embargo, la aplicación masiva de la inmunoprofilaxis (IP) con globulina anti-D ha conducido a una significativa reducción del número de casos de esta enfermedad.

El Ítem T11 de las Normas Técnicas de la Ley Nacional de Sangre Nº 22.990, actualizadas en el año 2006 considera que:

Toda mujer D negativo no sensibilizada al Ag D deberá recibir gammaglobulina hiperinmune Anti-D, por lo tanto recomendamos hacerlo en cualquiera de las siguientes circunstancias:

- Puerperio dentro de las 72 horas (parto espontáneo o quirúrgico).

- Hemorragias del embarazo:
 - Amenaza de aborto.
 - Post aborto completo ó incompleto seguido ó no de evacuación uterina.
 - Embarazo ectópico.
 - Enfermedad trofoblástica gestacional.
 - Placenta previa sangrante.
- Manipulaciones durante intentos de versión externa.
- Trauma abdominal.
- Procedimientos invasivos: punción de vellosidades coriales, amniocentesis.

Esquema de Administración/Dosis

Preparto

- Cualquier episodio sospechoso de un evento sensibilizante (incluido el post aborto) teniendo en cuenta el tiempo de la gestación se utilizarán las siguientes dosis:

1° Trimestre:

1 dosis **no menor** a 100 microgramos por vía IM o IV.

2° Trimestre:

1 dosis **no menor** a 250 microgramos por vía IM o IV.

3° Trimestre:

1 dosis **no menor** a 250 microgramos por vía IM o IV.

- Profilaxis en todas las gestantes Rh negativas no sensibilizadas (semana 28-32 de gestación):

1 dosis no menor a 250 microgramos por vía IM o IV.

Postparto: dentro de las 72 hs.

- **Sin cuantificación** de la hemorragia feto-materna.

1 dosis no menor a 300 µg por vía IV o IM

- **Con cuantificación** de la hemorragia feto-materna, la dosis se calculará de acuerdo a la magnitud del sangrado.

1 dosis no menor a 250 µg por vía IV o IM

Recordar que 300 ug neutralizan hasta 30 ml de sangre fetal o 15 ml de GR.

Importante: como todo derivado plasmático, la gammaglobulina hiperinmune anti-D debe ser conservada a 4 ± 2°C (no debe congelarse).

Productos disponibles en la Argentina:

- Gamma Anti-Rho (Universidad Nacional de Córdoba) 250 ug.
- Partoben (Purissimus) 250, 300 y 330ug IM O IV.
- Partogamma SDF (Baxter Immuno) 250, 330 ug.
- Igantid (Grifols) 300 µg.
- Rhesogamma P (Aventis Behring) 300 ug.

5. CUANTIFICACIÓN DE LA HEMORRAGIA FETOMATERNA

Es recomendable que en el momento del parto de las mujeres Rh negativo, se tome una muestra de sangre materna, para realizar una prueba que permita determinar la magnitud de la hemorragia feto-materna (HFM). En estas pacientes se podrá indicar una dosis adicional de gammaglobulina hiperinmune anti-D cuando sea requerida, según resultado de la prueba de cuantificación de Hemorragia feto-materna. (*Ver anexo I*).

CONCLUSIONES

No existen dudas sobre la impronta de la EHP por Rh en la salud feto-neonatal en Argentina. Si bien la inmunoprofilaxis con IgG Rh ha permitido una disminución de la incidencia, lejos estamos de los logros alcanzados en los países desarrollados.

Si bien existen normas para la prevención, su cumplimiento es parcial o no son lo suficientemente claras como para ser efectivas.

RECOMENDACIONES

Los controles inmunohematológicos de todas las gestantes y los neonatos, así como para la administración de IgG Rh son obligatorios.

El aborto ilegal es otra de las situaciones que condiciona el cumplimiento de medidas preventivas.

Los estudios inmunohematológicos deben ser efectuados en Servicios de Medicina Transfusional, y éstos deben garantizar calidad de los resultados.

Es fundamental para esta patología la integración de un equipo médico formado por el obstetra, neonatólogo y especialista en Medicina Transfusional.

Debe existir una red de derivación regional con centros de referencia para los casos de pacientes sensibilizadas que requieran los procedimientos y tratamientos adecuados para la EHP.

Los Servicios de Medicina Transfusional no deben utilizar la entrega de los resultados de los estu-

dios inmunohematológicos como una herramienta para el envío de donantes de sangre.

Está científicamente comprobado que la prevención de la aloinmunización tiene un costo muy inferior a de los tratamientos pre y postnatales de la EHP por Rh.

SEGUIMIENTO DE LA PACIENTE SENSIBILIZADA

Debe ser realizado por un equipo especializado en Inmuno-Hematología Perinatal.

Hospitales de referencia:

- *Región Centro:*
 - Hospital Materno Provincial, Ciudad de Córdoba.
 - Hospital San Martín, La Plata, Pcia. de Buenos Aires.
 - Hospital Nacional Posadas, Haedo, Pcia. de Buenos Aires.
- *Ciudad Autónoma de Buenos Aires:*
 - Hospital Fernández.
 - Maternidad Ramón Sardá.
 - Hospital de Clínicas de Buenos Aires.
- *Región Cuyo:*
 - Hospital Lagomaggiore de la Ciudad de Mendoza.
- *Región Noreste:*
 - Hospital Vidal, Ciudad de Corrientes.
 - Hospital Perrando, Resistencia - Chaco.
- *Región Noroeste:*
 - Hospital Materno-Infantil Ntra. Sra. de La Merced de Tucumán.

Bibliografía

1. Spinelli SL, Frailuna MA. Enfermedad hemolítica isoimmune feto-neonatal. Guía de Práctica Clínica del Hospital Materno-Infantil Ramón Sardá. Año 2005.
2. Bowman JM. Immune hemolytic disease. En: Nathan DG, Orkin SH, ed. Hematology of infancy and childhood. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1998:53-78.
3. Anhel S, Torrado ML. Profilaxis Rh: revisión y actualización. Rev Arg Transf Vol. XXVI N° 1. 2000: 45-52.
4. Lee D, Contreras M, Robson SC, Rodeck CH, Whittle MJ. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. Transf Med 1999;9:93-7.
5. Crowther CA. Administración de inmunoglobulina anti-D en el embarazo para la prevención de la aloinmunización Rh (Revisión Cochrane traducida). En: La

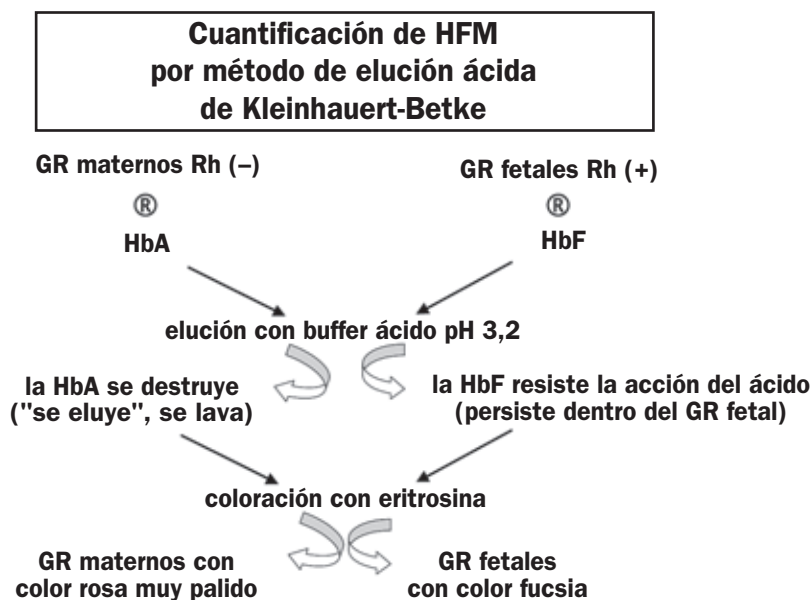
- Biblioteca Cochrane Plus, número 4, 2006.
6. Normas y Estándares en Epidemiología. Nueva Lista OPS 6/67 para la tabulación de datos de mortalidad CIE-10. OPS-Boletín Epidemiológico, Vol. 20 N° 3. Septiembre 1999.
 7. Guía para la Práctica del Cuidado Preconcepcional y del Control Prenatal. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina; 2003. Pág.19.
 8. Guía para el Mejoramiento de la Atención Post-aborto. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina; 2005. Pág.20.
 9. Guía para la Atención del Parto Normal en Maternidades Centradas en la Familia. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina; 2004. Pág.72.
 10. Ley Provincial de Hemoterapia N° 11.725/95, Decreto Reglamentario 3716/97. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.
 11. Ley Nacional de Sangre N° 22.990. Decreto Reglamentario N° 1338 30/09/04. Ministerio de salud y Ambiente de la Nación. República Argentina.
 12. Normas Técnicas y Administrativas. Resoluc. 58/2005- Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina; 21 de enero de 2005.
 13. Normas de Medicina Transfusional. 5º Ed. Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología que regían en ése momento. 1997.
 14. Lomuto C. ¿De qué se mueren los recién nacidos en la Argentina 1995? Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá 1998;17:31-35.
 15. Illia R. Epidemiología y causalidad de la mortalidad fetal intermedia y tardía. Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá 2002;21:155-163
 16. Torres OW, Oliveto F, Direne M. Importance of Immunoprophylaxis for Hemolytic Disease of the Newborn. P-259. Vox Sanguinis 2006;91(suppl 3):135.
 17. Frailuna MA, Barrere MB, Rey PL. Guía de Práctica Clínica. Enfermedad Hemolítica Perinatal. Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá 2002;21(4):175-9.
 18. Torres OW, Di Pangrazio M, Direne M. "Frequency of RBC antibodies in pregnant women" Abstract N° 295. Aceptado para póster. XVIIth Regional Congress of the ISBT Madrid. 2007.

Anexo 1

EVALUACIÓN DE LA MAGNITUD DE LA HEMORRAGIA FETO-MATERNA

Tipo de muestra:

Sangre total materna anticoagulada.



Tiempo para obtención de la muestra:

Dentro de las 2 horas posparto (puede extenderse hasta 6 hs).

Tiempo para realizar técnica de cuantificación:

Lo antes posible.

Técnicas para cuantificación:

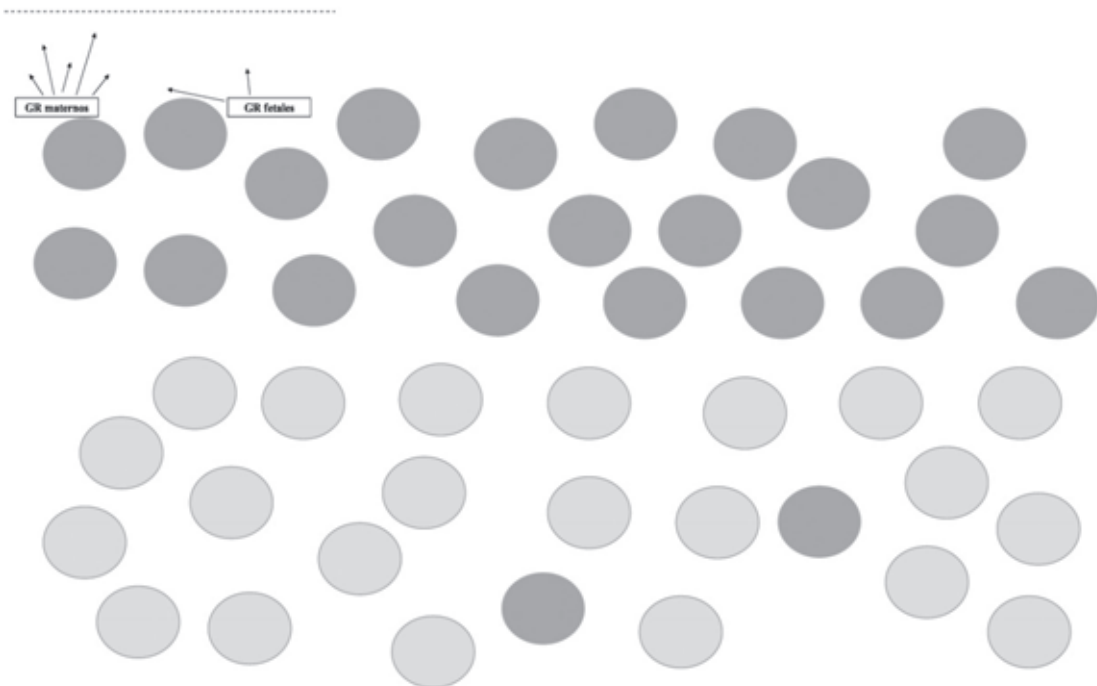
- **Métodos directos:** detectan el **Ag D** de los GR fetales presentes en la sangre materna.
 - Citometría de flujo (Ac anti D-fluoresceína).
 - Microscopía de fluorescencia (idem anterior).
 - Técnica en gel (Ac anti-D).
- **Métodos indirectos:** detectan los GR fetales en la sangre materna a través de la medición de la **Hb F** que ellos contienen (los GR maternos poseen Hb A)
 - Técnica de elución ácida de Kleihauer-Betke.
 - Citometría de flujo (Ac anti Hb F-fluoresceína).

Modificación de la técnica clásica: sólo se realiza la elución ácida de la mitad inferior del preparado "A modified Kleihauer technique for the quantification of foetomaternal haemorrhage".

Transfusion Medicine 2002;12:373-378.

Ventajas:

- La parte superior se puede utilizar como control positivo (control de la coloración).
- Facilita el recuento de GR totales (son todos fucsias); en la parte superior se colorean todos los GR porque no se realizó elución y todos los GR mantienen su Hb (aunque sea diferente tipo de Hb).
- Método de elución ácida de Kleinhauert-Betke.
- Técnica modificada: elución inferior.



GR totales/campo (mitad superior)	500	500	500
	↓	↓	↓
GR fetales/campo (mitad inferior)	1,5	3	12
	↓ 1,5/500	↓ 3/500	↓ 12/500
% GR fetales	0,3	0,6	2,4
	↓ x 24	↓ x 24	↓ x 24
ml GR fetales	7,2	14,4	57,6
	↓	↓	↓
Dosis total Ig	250	300	750
	↓	↓	↓
Dosis suplementaria	—	—	450

Materiales:

1. Solución fisiológica.
2. Portaobjetos.
3. Timer.
4. Jarra de Coplin (horizontal).
5. Alcohol 96°.
6. Agua destilada.
7. Solución de ácido cítrico 0,1M.
8. Solución de fosfato de sodio 0,2M.
9. Solución de HONa 0,1N.
10. Solución de HCl 0,1N.
11. Tira reactiva para control de pH (rango: 2-5 aprox).
12. Solución de eritrosina 0,5%.
13. Solución de hematoxilina de Harris.
14. Agua corriente.
15. Microscopio óptico con objetivo 40x.

REACTIVOS:

Alcohol etílico (Etanol)

Preparar 120 ml de solución al 80° (ver cc del etanol de partida):

96 ml etanol absoluto + 24 ml de agua destilada

100 ml de alcohol 96° + 20 ml de agua destilada.

Solución de ácido cítrico 0,1 M (ver PM de droga de partida)

21,0 g droga PM: 210 (1H₂O) + agua destilada csp 1 litro

19,2 g droga PM: 192 (anhidra) + agua destilada csp 1 litro

Conservar en heladera.

Solución de fosfato de sodio 0,2 M (ver PM de droga de partida)

14,2 g droga PM: 142 (anhidra) + agua destilada csp 500ml

17,8 g droga PM: 178 (2 H₂O) + agua destilada csp 500ml

Conservar en heladera.

Buffer de Mc ILVAINE (buffer de elución)

Para 100 ml = 73,4 ml de Solución N° 2 + 26,6 ml de Solución N° 3

Para 50 ml = 36,7 ml de Solución N° 2 + 13,3 ml de Solución N° 3

Método rápido = 3 partes de Solución N° 2 + 1 parte de Solución N° 3

Preparar antes de cada ensayo.

Mezclar bien y chequear pH (debe ser 3,2). Ajustar de ser necesario.

Hematoxilina de Harris

100 ml de Hematoxilina + 4 ml de ácido acético glacial

o utilizar colorante comercial ya preparado con acético incorporado

Filtrar la solución con papel de filtro cada vez que sea necesario.

Eritrosina 0,5%

0,5 g eritrosina + agua destilada csp 100ml

Filtrar la solución con papel de filtro cada vez que sea necesario.

PROCEDIMIENTO:

1. Sacar de la heladera los buffers (ácido cítrico y fosfato de sodio) y **dejarlos tomar temperatura ambiente** (muy importante).
2. Preparar 44 ml de buffer de elución.
3. Controlar el pH del buffer con tira reactiva y ajustarlo de ser necesario.
 - Si es menor a 3,2 = ajustar mediante agregado de NaOH 0,1 N.
 - Si es mayor a 3,2 = ajustar mediante agregado de ClH 0,1 N.
4. Diluir las muestras de sangre materna al ½ con solución fisiológica (mezclar 1 gota de cada uno).
5. Confeccionar **frotis muy finos** (2-3 por muestra) con una pequeña gota de la mezcla (no más de 5 uL por c/u), dejar secar al aire. Rotular los frotis con lápiz.
6. Preparar 120 ml de alcohol 80%.
7. Colocar los frotis en la jarra de Coplin (conviene seguir siempre un mismo orden; por ejemplo: colocar los frotis con el preparado hacia el frente dejando la cabeza del frotis hacia la derecha).
8. Agregar el alcohol 80%.
9. Dejar en reposo por 5 minutos para fijar los extendidos.
10. Descartar el alcohol y lavar los extendidos con agua destilada.
11. Colocar lentamente el buffer de elución dentro de la jarra agregándolo por alguna de las esquinas (por ejemplo: por el ángulo posterior derecho). El buffer sólo cubrirá la mitad inferior de los frotis.
12. Dejar en reposo durante 11 minutos para permitir la elución de la hemoglobina adulta.
13. Descartar el buffer inclinando la jarra cuidadosamente hacia la derecha.
14. Lavar con agua destilada (llenar la jarra con agua y descartarla).
15. Realizar un segundo lavado con agua destilada durante 1 minuto (agitar ligeramente la jarra).
16. Colocar eritrosina al 0,5% cubriendo la totalidad de los extendidos y dejar en reposo durante 5 minutos para permitir la coloración.
17. Recuperar la eritrosina en su envase.
18. Lavar con agua destilada (ídem punto 14).
19. Realizar un segundo lavado con agua destilada durante 1 minuto (ídem punto 15).
20. Colocar hematoxilina de Harris cubriendo la totalidad de los extendidos y dejar en reposo durante 5 minutos para permitir la coloración (contracolor).
21. Recuperar la hematoxilina en su envase.
22. Lavar con **agua de canilla** durante 1 minuto.
23. Dejar secar los frotis al aire.
24. Observar los frotis al microscopio óptico en 40x (o, si se desea en 100x).
 - Los glóbulos rojos fetales se observan como cuerpos refractarios de color rosa púrpura brillante (fucsia).
 - Los glóbulos rojos adultos aparecen sin color, como células “fantasmas” muy pálidas o descoloridas.
 - Los núcleos de los leucocitos se tiñen en la gama del azul-violeta.
 - Observar la **zona superior (no eluída)** >> contar la cantidad total de glóbulos rojos por campo >> promediar varios campos.
 - Observar la **zona inferior (eluída)** >> contar la cantidad de glóbulos rojos fetales (coloreados) por campo >> promediar varios campos.

25. Calcular:

- $\% \text{ células fetales} = \frac{\text{promedio células fetales/campo} \times 100}{\text{promedio glóbulos rojos totales/campo}}$
- Volúmen de GR fetales transferidos (ml) = % células fetales x 24
- Dosis de IgG anti-D que cubre la HFM hallada = ver tabla.
- Dosis de IgG anti-D suplementaria a administrar = dosis antes calculada – dosis ya administrada en forma basal.

TABLA: Cantidad total de Ig antiD a administrar en relación a la magnitud de la HFM

HFM (ml de GR)	Dosis (mg)	HFM (ml de GR)	Dosis (mg)
hasta	no inferior a	hasta	no inferior a
12,50	250	82,50	990
15,00	300	87,50	1000
16,50	330	105,00	1200
37,50	500	112,50	1250
45,00	600	115,50	1320
49,50	660	135,00	1500
62,50	750	148,50	1650
75,00	900		

Si se emplean presentaciones comerciales de uso IM, se podrán inyectar hasta 5 dosis de 300 ug en cada glúteo.

Si se necesitan más de 10 dosis podrán espaciarse cada 72 horas, aunque la secuencia de tiempo óptimo no ha sido determinada aún.