



Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido



Mariza Mota. MD, PhD

Hospital Israelita Albert Einstein – São Paulo, Brasil

06 y 07 / 10 / 2011

Jornada de Hematología y Medicina Transfusional de la Sociedad Chilena de Hematología



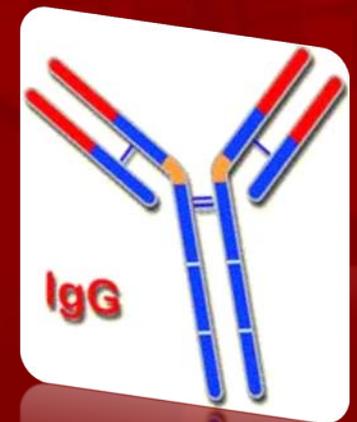
EHRN

- Consiste en la destrucción de los glóbulos rojos del feto y del recién nacido por anticuerpos producidos por la madre.
- Levine e Stetson, en 1932 publicaron un informe de una reacción a una transfusión, debido a la transfusión de sangre del marido a su mujer, después del parto.
- Pensaron que la mujer había sido inmunizada contra el antígeno del padre a través del feto.



EHRN

- Potencialmente puede ocurrir por cualquier antígeno de grupo sanguíneo.
- Cuando esto sucede ?
 - Feto es antígeno positivo e la madre antígeno negativo
 - El anticuerpo de la clase IgG
- Que es lo que determina su gravedad?
 - Subclase IgG: IgG₃ e IgG₁ : asociadas con gran actividad de fagocitosis *in vitro*
 - Presencia de un gran número de sitios antigénicos en los glóbulos rojos fetalís.





EHRN

- Cuales son los sistemas de grupos sanguíneos más usuales involucrados en EHRN ?

EHRN		
COMUN	RARA	NUNCA
Anti- A, Anti-B	Anti-Fy^a	Anti-Le^a
Anti-D	Anti-s	Anti-Le^b
Anti-c	Anti-M	Anti-I
Anti-D + C	Anti-S	Anti-IH
Anti-D + E	Anti-Jk^a	
Anti-C		
Anti-e		
Anti-K		



EHRN- Sistema ABO

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Sangre roja célula				
Anticuerpos	Anti-B	Anti-A	Ningunos	Anti-A y Anti-B
Antígenos	A antígeno	B antígeno	A y B antígeno	No antígenos

- Los antígenos del grupo ABO son los causadores mas frecuentes de EHRN
- Ocurre en la 1ª gestación
- Subclinica a grave
 - Ag ABO no están totalmente desarrollados al nacimiento
 - Antígeno ABO están presentes en las otros celulas fetales, que efetivamente se ligan a los anticuerpos maternos
- Mas frecuente madre grupo O y RN de grupo A, pero mas grave cuando madre grupo O y RN de grupo B
- Aproximadamente 20 % dos RN tienen incompatibilidad ABO con su madre , pero la incidencia EHRN es de 1:150 a 1:3000
- Porcentaje de recurrencia es de 87% y 62% necesitan de fototerapia



EHRN- Sistema Rh

- RhD es importante por 4 razones:
 - Incidencia de individuos RhD- principalmente población caucasiana (12 a 15%)
 - Immunogenicidad
 - Expresión precoz de antígeno D: 7^a semana embarazo
 - Todavía es la principal causa de EHRN

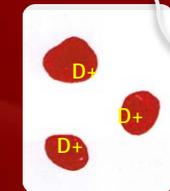


EHRN – Sistema Rh



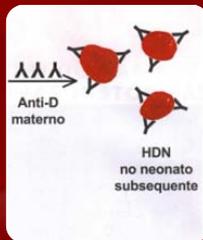
RhD
negativo

RhD
positivo



1º hijo RhD+

anti-D



Anti-D



2º hijo RhD +

EHRN

EHRN – Patogenesia

Hemorragia fetal materna



Ac. maternos formados contra ag heredados del padre



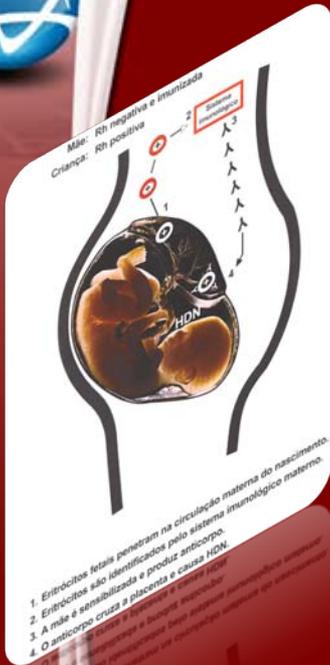
Durante el embarazo posterior, pasaje placentaria de anticuerpos maternos



Anticuerpos materno se adhieren a los eritrocitos fetales



Hemólisis de los eritrocitos fetales





EHRN- Aloinmunización materna

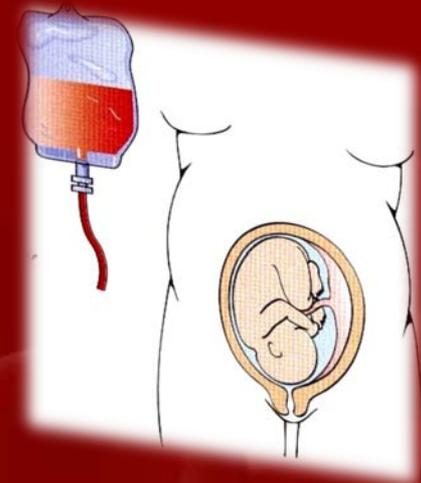
- Hemorragia feto - materna: Ocurre especialmente durante el 3º trimestre e inmediatamente después del parto y el volumen mediano de 0,1ml.

- Otras causas:

- aborto, amniocentesis, cordocentesis
- embarazo ectópico, traumatismo abdominal
- hemorragia antes del parto, muerte del feto
- transfusión de HC con glóbulos rojos RhD+

- Riesgo alo inmunización:

- 16%: madres RhD-/feto RhD+ con compatibilidad ABO
- 2%: madres RhD-/feto RhD + con incompatibilidad ABO
- 13% riesgo global





EHRN

Exposición antigénica:

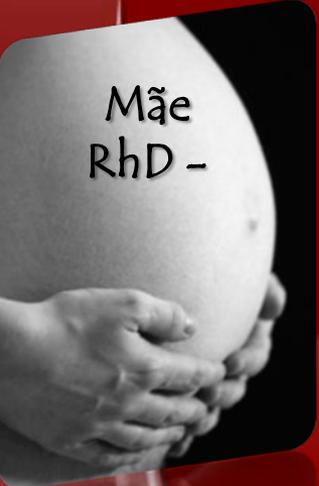
- Em 70% de las embarazadas ocurre hemorragia transplacentaria durante el embarazo.

Em el nacimiento la incidencia $>50\%$.

Hemorragia feto materno es pequeña, pero el $\leq 0,1\text{mL}$ de los glóbulos rojos fetales puede inmunizar a la madre.

La severidad de la EHRN aumenta a cada embarazo y puede sobrevenir más precozmente.

- História prévia de EHRN por anti-D, la probabilidad es $> 90\%$ de los feto subsiguiente también presentar EHRN
- Alrededor de 1:10 gestaciones de madres RhD- el concepto es RhD+



Mãe
RhD -



EHRN- PATOGENESIS

Hemólisis, anemia fetal e eritropoyesis :

• IgG materna + glóbulos rojos fetais \Rightarrow macrófagos bazo \Rightarrow anemia
estímulo de la M.O. \Rightarrow Eritropoyesis acelerada \Rightarrow eritroblastos sangre
periférica, eritropoyesis extramedular \Rightarrow hepatoesplenomegalia
hipertensión portal \Rightarrow anemia + hipoproteinemia \Rightarrow insuficiencia
cardíaca \Rightarrow edema generalizado \Rightarrow muerte del feto.

• La vida media de IgG es de aproximadamente 25 días : Sensibilización y hemólisis de glóbulos rojos persiste varios días o semanas después del parto.

• Clínica : letargia, hipotonía, \downarrow reflejo de succión, hipertonia, espasticidad, irritabilidad, retardo mental y pérdida de la audición, parálisis cerebral.



EHRN

Manifestaciones clínicas y laboratoriales:

- Solamente prueba directa antiglobulina (TAD) positiva
- TAD positivo con ligera ictericia en el 1° o 2° día de vida con ligera disminución de la hemoglobina hasta el 10° día
- Ictericia grave caminando para Kernicterus
- Anemia severa a las 18^a semanas de gestación
- La gravedad de la enfermedad tiende a ser mayor en el 2° RN de que en el 1° hijo acometido
- TDA + del RN hasta por 3 meses
- Tasa de incidencia de muerte fetal :
 - 1° hijo afectado : 6%
 - 2° hijo afectado : 29%



EHRN: Pruebas de rutina

De acuerdo con ACOG :

- Análisis ABO/RhD e investigación de anticuerpos irregulares (PAI)
- Fenotipo Rh :
 - RhD débil : RhD+ o RhD-
 - RhD parcial : RhD+, sin embargo tratados como RhD-
- Madre RhD- y PAI negativo :
 - Repetir 28^a antes de administrar inmunoglobulina anti – D (RhIG)
 - Diferenciación de anti-D pasivo / inmune (?)
- Repetir el PAI si madre RhD+ con antecedentes de alo inmunización por anticuerpos de importancia clínica asociada a EHRN
- Si recibió transfusión de sangre
- Madres RhD- con el riesgo de eventos de alo inmunización
- Casos PAI + :
 - Especificidad del Ac y el título (1^a consulta, 16^a , 22^a y cada 2 semanas)
 - Glóbulos rojos con el mismo fenotipo y técnica estandarizada.



EHRN: Investigación

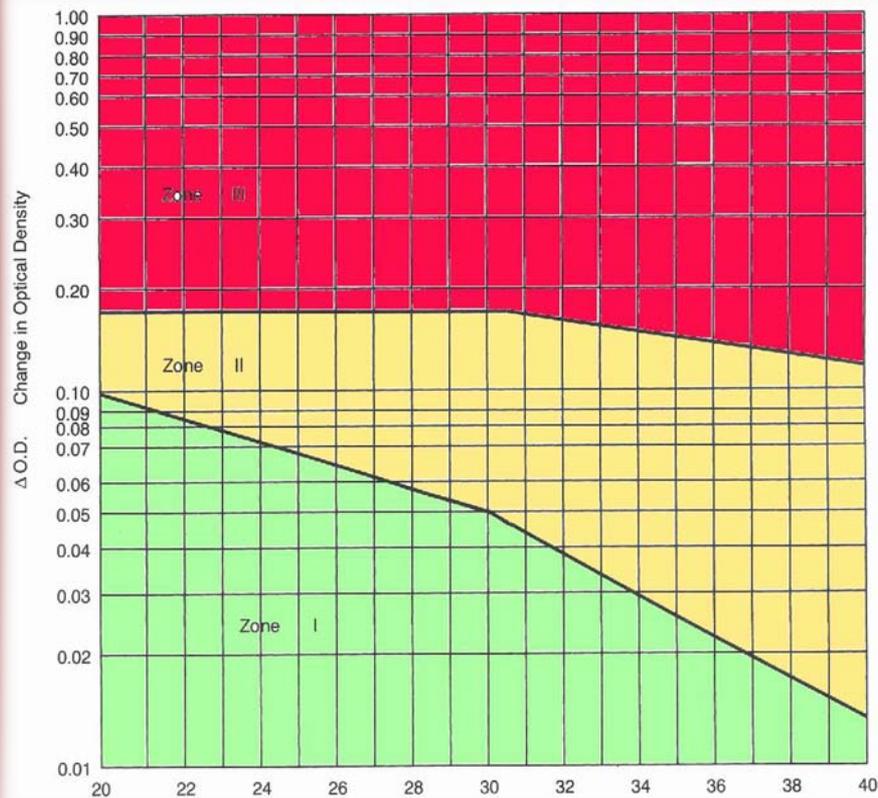
Evaluación prenatal de la gravedad de la enfermedad

- Titulación de anticuerpos : indicación indirecta del riesgo de EHRN
 - Si el título > 32 se considera crítico
 - Aumento > 2 títulos entre 2 pruebas consecutivas
 - Anti-K : não refletja la gravedad de la hemólisis . Crítico > 8
- Determinación de subclase de IgG
- Amniocentesis para evaluar la BR fetal
- Cordocentesis para evaluar BR y anemia fetal
- Ultrasonido para evaluar hidropesía fetal
- Determinação del flujo de la arteria cerebral média para evaluar anemia fetal
- Genotipo fetal a partir del plasma materno : riesgo de EHRN



EHRN: Avaliar la Gravedad

Curva de LILEY



De acuerdo con ACOG :

- Análisis del líquido amniótico:
 - La concentración de BR en el líquido amniótico se correlaciona con la severidad de la EFRN
 - Modalidad estándar de diagnóstico para evaluar la condición del feto > 27^a semanas de embarazo
 - Curva de Liley : Espectrofotometría (pico de absorbancia BR es 450nm)
 - Es un gráfico utilizado durante décadas y se divide en 3 áreas:
 - Zona 3 : Hemólisis grave, óbito entre 7 a 10 días
 - Zona 1 : Sin enfermedad o leve
 - Zona 2 : Repetir la prueba para establecer la tendencia



EHRN: Avaliar la Gravedad

De acuerdo con ACOG :

- Doppler fetal (18^a semana) :
 - Método no invasivo para avaliar la dinámica del feto
 - ↑ flujo de la arteria cerebral media – anemia fetal (1,5 veces arriba de lo normal): de moderada a severa anemia fetal- 100% sensibilidad y puede tener 10% resultados falso positivo
- Muestra de sangre umbilical percutáneo o cordocentesis (PUBS):
 - Puede determinar el hematocrito del feto y la evaluación del líquido amniótico
 - Hay varios esquemas de tratamiento propuesto con la cordocentesis, aunque es de alto riesgo, con una tasa de mortalidad fetal del 1,2%.



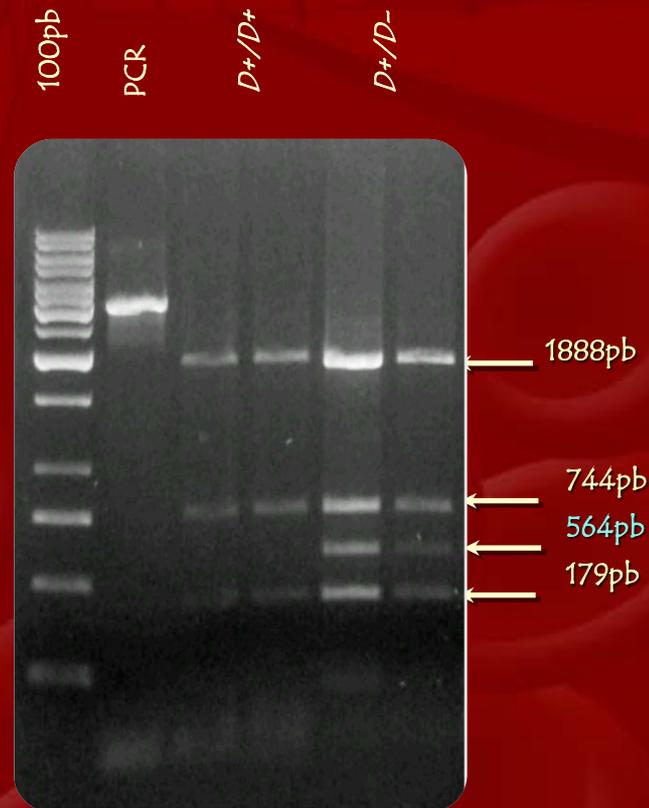
Evaluación del riesgo de causar EHRN

Medicina materno-fetal

Zigotidate del gene *RHD* paterno

- PCR – RFLP
- Enzima de restricción : Pst I
- Producto : 3100pb
- Heterocigoto : 1888pb, 744 pb, 564pb y 179pb
- Población brasileña: 50% RhD heterocigoto

3100pb

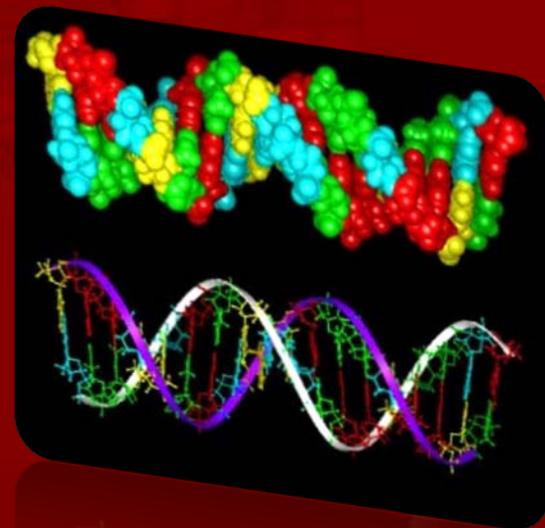




Evaluación del riesgo de causar EHRN

Medicina materno-fetal

- Detección y análisis de ADN fetal en plasma materno para determinar la presencia o ausencia del gen así :
 - Evita procedimientos invasivos como la amniocentesis y la biopsia de vellosidades coriónicas
 - Evita la inmunoprofilaxis para fetos RhD-





EHRN – Tratamiento antes del parto

- Enfermedad em curso :
 - IVIG materno : 2g/kg durante 5 días
 - Plasmaféresis de la madre : anti-K (mantener título < 1:32)
 - Transfusión intrauterina:
 - Glóbulos rojos, irradiados e deleucocitado hasta 72 horas de la tomada de muestra
 - TS : O, RhD-,K- es compatible con el suero materno
 - Resuspendidas en plasma AB



EHRN: Tratamiento

Bilirubina (mg/dL)	Peso	< 24h	24-48h	49-72h	>72h
<5					
5-9	Todos	Fototerapia si hemólisis			
10-14	<2500g	Exanguineo transfusión si hemolisis	Fototerapia		
10-14	>2500g			Investigación si BR > 12mg;dL	
15-19	<2500g	Exanguineo transfusión	Evaluar si Exanguineo transfusión		
15-19	>2500g		Fototerapia		
>20	Todos	Exanguineo transfusión			

Observación

Fototerapia

No es suficiente si BR I:

> 0,5 - 2,0mg/dL/h

Exanguineotransfusión :

Br > 20mg/dl.

Tasa de mortalidad <1%.

OBSERVACIÓN INVESTIGACIÓN



EHRN: Tratameinto

- Recién nacidos con enfermedad hemolítica
 - Anemia (Hto 45%), TDA +, \uparrow BR $>0,5\text{mg/dL/h}$
 - Incompatibilidad ABO \uparrow BR $>1.0\text{mg/dL/h}$
 - Conc. BR $\geq 20\text{mg/dL}$ no relacionado con la edad
 - Conc. BR $\geq 15\text{mg/dL}$ $>36\text{h}$
- Recién nacidos con o sin hemólisis
 - Conc. BR $\geq 20\text{mg/dL}$
 - Factores clínicos que pueden sugerir la exsanguinotransfusión a pesar de la baja concentración de BR :
 - Precocidad
 - Septicemia
 - Hipoxia y acidosis
 - Hipoproteinemia o uso de drogas que compiten con los sitios de unión de la BR
 - Conc. BR cerca del nivel en el que es indicado la exsanguinotransfusión por $> 36\text{ h}$.



EHRN: Tratamiento

Early intravenous immunoglobulin (two-dose regimen) in the management of severe Rh hemolytic disease of newborn—a prospective randomized controlled trial

- 90 recién nacidos con EHRN admitieron a la unidad , no elegible para ET* en primera vida 12h
 - Del grupo control: apenas FT - 40 neonatos
 - Del grupo intervención: FT+ Ig- 50 neonatos
 - IIa: 23 neonatos: 0, 5 g/Kg IgRhD en 3h
 - IIb: 22 neonatos: 1 g/Kg en 6h

*ET- Esanguineotransfusión

*FT- Fototerapia



EHRN: Tratameinto

Early intravenous immunoglobulin (two-dose regimen) in the management of severe Rh hemolytic disease of newborn—a prospective randomized controlled trial

Table 1 Comparison between the three studied groups according to demographic, clinical, and biochemical characteristics of neonates with Rh HDN ($n=90$)

	Conventional ($n=50$)	Intervention ($n=40$)		<i>p</i> value
		IIa ($n=25$)	IIb ($n=15$)	
Birth weight (g), mean \pm SD ^a	3,064.00 \pm 383.20	3,100.00 \pm 387.30	3,073.33 \pm 490.58	0.94
Gestational age (weeks), mean \pm SD ^a	38.70 \pm 0.86	38.48 \pm 0.71	38.53 \pm 0.74	0.5
Male, <i>n</i> (%) ^b	26 (52%)	13 (52%)	8 (53%)	0.99
Delivery mode, <i>n</i> (%) ^b , cesarean section	32 (64%)	16 (64%)	10 (66%)	0.98
History of maternal diabetes(+ve) ^b	4 (8%)	3 (12%)	2 (13%)	0.37
Hgb (g/dL, median, IQ range) ^c	12.5 (11.00–13.40)	12.5 (12.00–13.90)	12.5 (11.5–13.15)	0.97
Reticulocytic count (% , IQ range) ^c	9.15 (5.50–12.00)	8.3 (5.90–11.750)	11.6 (9.5–12.9)	0.08

IQ interquartile range

^a Anova test was used

^b The chi-square test was used

^c Kruskal–Wallis test (using Mann–Whitney test with Bonferroni corrections)



EHRN: Tratameinto

Early intravenous immunoglobulin (two-dose regimen) in the management of severe Rh hemolytic disease of newborn—a prospective randomized controlled trial

- **Fototerapia - en 96h**
 - 92% grupo IIa y 100% grupo IIb estavam fuera de FT versus 50% grupo control
- **Días de hospitalización**
 - 3,2 días versus 4,7 días ($p < 0,001$) en el grupo de intervención y control, respectivamente
- **Exsanguinotransfusión**
 - 11 pac (22%) grupo control
 - 2 pac (5%) grupo intervención



EHRN: Tratameinto

Early intravenous immunoglobulin (two-dose regimen) in the management of severe Rh hemolytic disease of newborn—a prospective randomized controlled trial

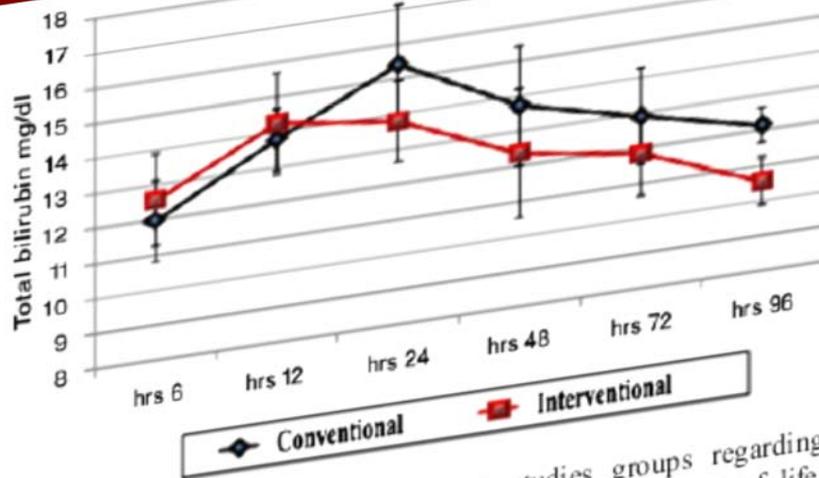


Fig. 1 Comparison between the two studies groups regarding bilirubin level initially and subsequent post-neonatal hours of life. Mean serum bilirubin level was significantly lower comparing the intervention groups with the conventional group, especially at 24, 48, and 96 h ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.03$, respectively)

- Todavía es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo
- Alta dosis Ig llevó a una menor necesidad de ET y disminución del tiempo de FT por lo menos 30 h
- Tasa de mortalidad de ET es de 0,3 a 1,2% con morbilidad de 5%
- Se escoger por baja dosis es preferible administrar antes de 12 h y repetir si necesario



EHRN

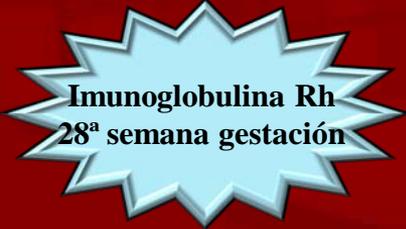
Características	ABO	Rh
El primer embarazo	Sí	Rara
Importancia del título Ac	No	Sí
Ac IgG	Sí (anti A,B)	Sí (anti-D, etc)
Bilirrubina al nacer	Normal	Alta
Anemia en nacimiento	No	Si
Fototerapia	Si	Si
Exsanguinotransfusión	Rara	Común
Transfusión intra uterina	No	As veces



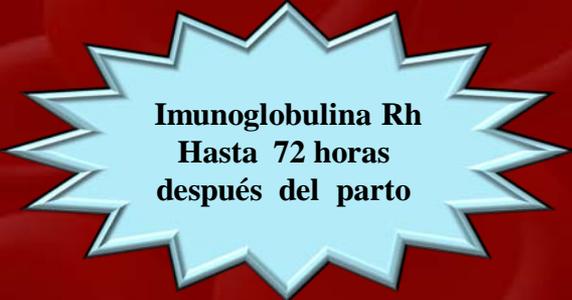
Prevención EHRN - inmunoglobulina anti- D

Datos usuales:

- Después de la introducción profilaxia IgRh ocurrió la queda de 10.3 casos para 1.3 casos/ 1.000 nacimientos.
- Hoy EHRN origina 4 a 5 óbitos / 100.000 nacimientos.
- Suministrala IgRh en la 28^a semana y después del parto la incidencia de isoenminización para disminuir de 0,2% en los embarazos de alto riesgo.
- Si ninguna providencia fuera tomada 0,7 a 1,8% sufren aloinminización antes del parto , 8-17% en el parto, 3-6% después del parto y 2-5% después de amniocentesis.
- Otras causas:
 - Dosis insuficientes IgRh
 - Error de tipificación de la madre
 - Sensibilización por la transfusión



**Inmunoglobulina Rh
28^a semana gestación**



**Inmunoglobulina Rh
Hasta 72 horas
después del parto**

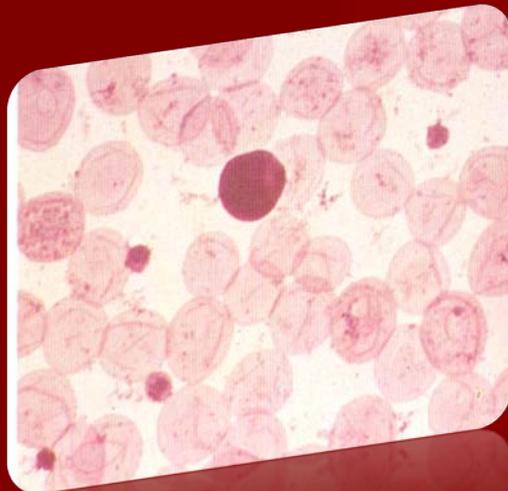


Prevención EHRN - inmunoglobulina anti- D

- Dosis estándar en Brasil : 300 μ g , IM o IV
- Incidência hemorragia feto materna > 30mL:
 - 0,1-0,7% en mujeres embarazadas RhD -
 - 1,7- 2,5% después del parto vaginal complicado y cesariana
 - 4,5% muerte del feto
- Efecto negativo :
 - TDA+ en RN
 - Bajo riesgo de hemolisis
- Suministrar hasta 72 horas después del parto
 - Y si fue en fracaso? Menos eficaz , pero tiene un efecto protector de hasta 2 semanas después del parto
 - Anti-D pasivo se puede detectar hasta 6 semanas después de la administración y desaparece entre los 9- 12 meses



Evaluación Hemorragia Feto Materna



Técnica de elución ácida: basado en las diferentes propiedades de hemoglobina fetal (HbF) de RN y HbA (materna). Glóbulos rojos que contiene HbF son resistente y Hb es de color, mientras que HbA es denaturada y eluida y glóbulos rojos parecen fantasmas.

Método de clasificación: HbF-AF, HPFH, etc.



Citometría de flujo: método de referencia para confirmar el volumen de HFM después de método de tamizaje positiva.

Para cuantificar las pequeñas poblaciones de células D + en la sangre materna

Indicada cuando HFM es $> 2\text{ml}$ célula fetal



Pruebas recomendadas a los recién nacidos

- ✓ **La determinación ABO/Rh:**
 - ✓ RNs de madres RhD-negativo
 - ✓ RNs de madres con ac clínicamente significantes
- ✓ **Coombs Directo y eluído:**
 - ✓ RNs de madres con ac clínicamente significantes
 - ✓ RNs con señales clínicos de EHRN

- ✓ **HIAE:** Todas las madres O y RN A ou B : eluato independientemente de los resultados de TDA.



Eficiencia de la TDA en la incompatibilidad ABO

		Eluato		
		Positivo	Negativo	Total
Coombs	Positivo	127(P)	1(FP)	128
Directa	Negativo	551(FN)	326(N)	877
Total		678	327	1005

P: positivo

FP: falso positivo

N: negativo

FN: falso negativo



Eficiencia de la TDA en la incompatibilidad ABO

- Sensibilidad de la prueba de Coombs Directa: 18,73%
- Especificidad de la prueba de Coombs Directa: 99,69%
- Valor predictivo de un resultado positivo: 99,22%
- Valor predictivo de un resultado negativo: 37,17%
- Eficiencia de una prueba de Coombs Directa : 45,07%



Anticuerpos anti-A y anti-B e su asociación con el EHRN

No	Ac -%	Anti-A	Anti-B	Eluato +	Eluato -	ET	FT
19.743	592 - 3.0	407	185	450	142	10	299

G. S. RhD	Muestra	Ac - %	Anti-D (*)	Outros Acs	CDP	CDN	ET	FT
Neg	1.393	108-7.8	95	13	77	31	38	36
Pos	2.351	51-2.2	-	51	7	44	4	3
Total	3.744	159-4.2	95	64	84	75	42	39

* Anti-D y asociación



Anticuerpos irregulares asociados com EHPN excluidos los Anti-D

Anticuerpos	Anticuerpos (%)	CDP	CDN	ET	FT
Anti-K	3 - 1.9	2	1	1	1
Anti-c	3 - 1.9	3	-	3	-
Anti-E	2 - 1.3	1	1	-	1
Anti-C	2 - 1.3	1	1	-	1
Anti-Jk ^a	1 - 0.6	-	1	-	-
Total	11 - 7.0	7	4	4	3



Anticuerpos irregulares no asociados com EHRN

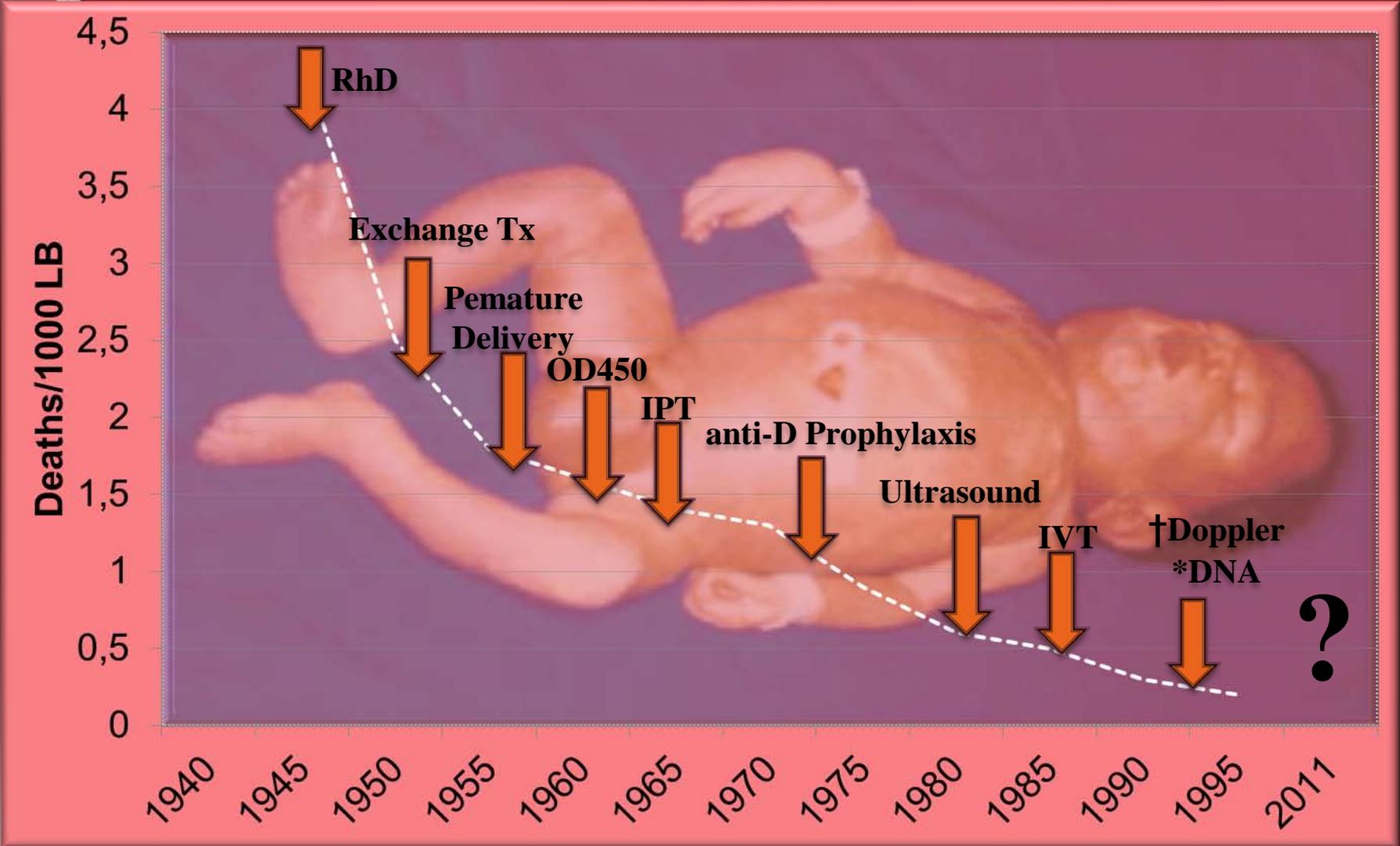
Anticuerpos que no provocan EHRN

Anticuerpos - %

Anti-Le^a	19 - 11.9
Anti-Le^b	1 - 0.6
Anti-HI	1 - 0.6
Anti-I	25 - 15.7
Anti-M	4 - 2.5
Anti-N	1 - 0.6
Anti-P₁	2 - 1.3
Total	53 - 33.2



EHRN





Referencias

Eder,A.F. Up date on HDFN: new information on long standing controversies. *Immunohematology*,2006;22:188-194.

Guidelines for the estimation of fetomaternal haemorrhage. Working party of the British Committe for standards in Haematology, Transfusion Taskforce. 2011.

Geaghan,S.M.Diagnostic Laboratory Technologies for the fetus and neonate with Isoimmunization.Seminars in Perinatology, 2011;35:148-154.

Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Alloimmunization during pregnancy. ACOG practice bulletin, 2006;108:457- 464.

Raya et al. Kell hemolytic disease of the fetus. Combination treament with plasmapheresis and intrauterine blood transfusion. *Transfusion and Apheresis Science*, 2011, in press.

Lazarus,A.H.;Brinc,D.Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion Medicine*,2009:185- 191.

Technical Manual, Association American Blood Bank, sixteenth edition, 2008.

Kumpel BM.Onthe immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion*, 2006;46:1652-1656.

Cooke et al. Systematic review of intravenous immunoglobulin in haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 2003;88:F6-F10.