

Tese de Doutorado
Programa de Pós Graduação em Genética
Universidade Federal de Minas Gerais

Avaliação do impacto assistencial e financeiro da genotipagem *RHD* fetal no plasma materno como ferramenta não-invasiva na conduta de atendimento a gestantes RhD Negativo

Luciana Cayres Schmidt
Orientador: Eduardo Martin Tarazona-Santos
Março de 2015
Luciana Cayres Schmidt

Luciana Cayres Schmidt

AVALIAÇÃO DO IMPACTO ASSISTENCIAL E FINANCEIRO DA
GENOTIPAGEM *RHD* FETAL NO PLASMA MATERNO COMO
FERRAMENTA NÃO INVASIVA NA CONDUTA DE ATENDIMENTO A
GESTANTES *RHD* NEGATIVO

Tese 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
Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martín Tarazona
Santos

Co-orientadores: Dr^a Marina Martins Lobato
Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2015

Agradecimentos

À Deus, que é a fonte infinita de força, inspiração e saber, meu agradecimento e meu reconhecimento.

À Marina Lobato Martins meus sinceros agradecimentos pelo tempo disponibilizado para minha orientação, pela paciência, pelo exemplo, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo total apoio e pelas inúmeras contribuições para o meu crescimento e aprendizado. Sua competência e seriedade são inspiração para mim.

Ao professor Antônio Carlos Vieira Cabral, autor deste projeto e que sempre esteve disposto a me orientar e ajudar quando precisei, privilegiando-me com seus valiosos conhecimentos.

Ao professor Augusto Guerra Júnior, que abraçou o projeto e me orientou com tamanha disposição e competência.

Ao orientador Eduardo Martín Tarazona, pelo apoio e orientações.

À Marina Alves, pelo comprometimento e responsabilidade.

À Maria Clara Fernandes da Silva Malta, pelo incentivo, exemplo, apoio e pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas, por me auxiliarem na captação de gestantes para o projeto, especialmente ao Dr Gabriel Osanan pelas incessáveis contribuições e apoio.

À equipe do Laboratório de Imuno-hematologia e do Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas, pelo apoio e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Hemominas, pelo incentivo e apoio.

Ao programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas / UFMG, pela oportunidade.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

Sumário

<i>Lista de tabelas</i>	<i>ix</i>
<i>Resumo</i>	<i>2</i>
<i>Abstract</i>	<i>3</i>
<i>Introdução</i>	<i>4</i>
1. Revisão bibliográfica	4
1.1 A doença hemolítica perinatal	4
1.2 Fisiopatologia da DHPN e intervenções clínicas	5
1.3 Protocolo de Atendimento a Gestantes em risco de DHPN	7
1.4 Doença Hemolítica Perinatal causada por Anti-D	8
1.5 Administração de anti-D profilático	9
1.6 O gene RHD	10
1.7 A proteína RhD	11
1.8 Bases moleculares do fenótipo RhD negativo	15
1.9 Genotipagem RHD fetal	17
1.10 Genotipagem RHD fetal não-invasiva	18
1.11 Controles e marcadores da genotipagem RHD fetal	20
1.12 Acurácia, sensibilidade e especificidade da genotipagem RHD fetal	23
1.13 Benefícios e impacto da genotipagem RHD fetal no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo	25
2. Objetivos	28
2.1 Objetivos gerais	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Material e Métodos	29
3.1 População de estudo	29
3.2 Fenotipagem RhD materna	29
3.3 Preparação das amostras	31
3.4 Purificação do DNA livre no plasma materno	31
3.4.1 Purificação do DNA plasmático usando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)	31
3.4.2 Purificação do DNA plasmático usando o kit Nucleo Spin Plasma XS (Marchery Nagel)	32
3.4.3 Purificação do DNA plasmático usando o kit QIAamp DSP Vírus Spin (Qiagen).....	33
3.4.4 Avaliação do kit KIAamp DSP Vírus Spin.....	33
3.5 Coleta de amostra da mucosa bucal do RN	34
3.6 Purificação do DNA da mucosa bucal do RN	34
3.7 PCR em tempo real para o gene da Albumina humana	34

3.8 PCR em tempo real para o gene RHD	34
3.9 Critérios de interpretação da genotipagem RHD fetal.....	36
3.10 Avaliação do limite mínimo de detecção da PCR para o gene RHD.....	39
3.11 Fluxograma do experimento.	40
3.12 Cálculo do custo do teste de genotipagem RHD fetal	41
3.12.1 Demanda de genotipagens RHD no Estado de Minas Gerais	41
3.12.2 Cálculo dos Recursos Humanos necessários	41
3.12.3 Cálculo do Material de Consumo	43
3.12.4 Cálculo do Custo com Serviços	43
3.12.5 Cálculo do custo com Imóvel	44
3.12.6 Cálculo do valor gasto com manutenção e depreciação de mobiliário e equipamentos.....	44
3.12.7 Estimativa do custo de Insumos e reagentes por teste de genotipagem fetal não-invasiva.....	45
3.12.8 Estimativa do custo mensal de um laboratório de genotipagem RHD fetal	45
3.12.9 Cálculo do custo do teste de Genotipagem RHD fetal não-invasiva automatizada	45
3.13 Avaliação do custo do Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo	46
3.13.1 Avaliação do custo do Protocolo para atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas ...	47
3.13.2 Avaliação do custo do Protocolo de atendimento a gestantes sensibilizadas.....	49
3.14 Cálculo do Impacto dos Cenários 1 e 2 no Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo	53
3.14.1 Para gestante Não-sensibilizada.....	53
3.14.2 Para gestantes sensibilizadas.....	59
4 Resultados	68
4.1 Características gerais da população de estudo.....	68
4.2. Avaliação do kit KIAamp DSP Vírus Spin.....	69
4.3 Avaliação do limite mínimo da PCR em tempo real para o gene RHD	70
4.4 Resultados das fenotipagens RhD maternas	72
4.5 Resultados da PCR em tempo real para o gene RHD e comparação com o fenótipo RhD dos recém-nascidos	72
4.6 Cálculo do custo da genotipagem RHD fetal.....	74
4.6.1 Demanda de genotipagens RHD no Estado de Minas Gerais	75
4.6.2 Cálculo dos recursos humanos necessários.....	76
4.6.3 Cálculo do Material de Consumo	77
4.6.4 Cálculo de Serviços	78
4.6.5 Cálculo do Custo com o Imóvel.....	81
4.6.6 Cálculo do valor gasto com manutenção e depreciação de mobiliário e equipamentos.....	81
4.6.7 Estimativa do custo de Insumos e reagentes por teste de genotipagem fetal não-invasiva.....	86
4.6.8 Planilha geral de custo mensal de um laboratório de genotipagem RHD fetal	87
4.6.9 Cálculo do custo do teste de Genotipagem RHD fetal não-invasiva automatizada.....	89
4.7 Cálculo do Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas	90
4.7.1 Cenário 1.....	90
4.7.2 Cenário 2.....	90
4.8 Cálculo do Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D.....	91
4.8.1 Gestante sensibilizada no Cenário 3	91
4.8.2 Gestante sensibilizada no Cenário 4	93
4.9 Avaliação do Impacto Financeiro da Introdução da Genotipagem RHD fetal no Protocolo de Acompanhamento a Gestantes RhD negativo.....	94

4.9.1 Cálculo do impacto do Cenário 1 – Gestante não sensibilizada	94
4.9.2 Cálculo do impacto do Cenário 2 – Gestante não sensibilizada	96
4.9.3 Avaliação do impacto da introdução do teste de genotipagem RHD fetal no Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas.....	99
4.10 Cálculo do Impacto da Genotipagem RHD fetal não-invasiva no Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo Sensibilizada.....	100
4.10.1 Cálculo do impacto do Cenário 3 – Gestante sensibilizada	100
4.10.2 Cálculo do impacto do Cenário 4 – Gestante sensibilizada	103
4.10.3 Avaliação do impacto da introdução do teste de genotipagem RHD fetal no Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas	107
5. Discussão	108
6 Conclusão.....	114
7 Referências bibliográficas.....	115

Lista de Figuras

Figura 1 – Aloimunização materna	4
Figura 2 - Genes RHD e RHCE	10
Figura 3: As proteínas RhD, RhCE e RhAg.....	12
Figura 4: Polimorfismos na proteína RhD, resultando no fenótipo D fraco ou D parcial.....	13
Figura 5: Representação da organização genômica característica de um fenótipo D positivo e de três fenótipos D negativo	16
Figura 6: Figura representativa de uma fenotipagem RhD em cartela gel teste.	30
Figura 7 - Critérios de interpretação dos resultados da genotipagem RHD fetal.....	39
Figura 8 - Fluxograma geral da metodologia do estudo	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 - Fluxograma do processo de Genotipagem RHD não-invasiva	42
Figura 10 Figura 10 - Protocolo atualmente realizado no Atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas no Cenário 1	48
Figura 11 – Proposta de Protocolo para Atendimento a gestante não sensibilizada no Cenário 2	49
Figura 12 – Cenário 3: Protocolo para Atendimento a Gestantes RhD sensibilizadas por anti-D no Centro de Medicina Fetal/UFMG (PEREIRA et al, 2012)	51
Figura 13 – Proposta de Protocolo para Atendimento a gestante sensibilizada no Serviço de Medicina Fetal, incluindo a Genotipagem <i>RHD</i> fetal (Cenário 4).....	52
Figura 14 – Custo do Impacto do cenário 1 para gestantes não-sensibilizadas	55
Figura 15 - Impacto do cenário 2 para gestantes não-sensibilizadas	58
Figura 16 - Impacto do Protocolo para Atendimento a Gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 3.....	61
Figura 17 - Impacto do Protocolo de Atendimento a Gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 4.....	65
Figura 18 - Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes sensibilizadas	68
Figura 19 – Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes RhD negativo com histórico de aborto.	69
Figura 20 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene RHD na PCR em tempo real.....	70
Figura 21 - Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene RHD (exon 5) na PCR em tempo real.....	71
Figura 22 - Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene RHD (exon 7) na PCR em tempo real.....	72

Figura 23 - Cálculo da taxa de água para estabelecimento comercial	80
Figura 24 - Impacto do cenário 1- Gestante não sensibilizada.....	95
Figura 25 - Impacto do cenário 2 – Gestante não sensibilizada	98
Figura 26 - Impacto do cenário 3 – Gestante sensibilizada	101
Figura 27 - Impacto do cenário 4 – Gestante sensibilizada	105

Lista de tabelas

Tabela 1 - Tipos de clones presente em reagentes anti-D monoclonais disponíveis no mercado e sua reatividade com algumas categorias de D parcial.....	14
Tabela 2– Reagentes anti-D licenciados pelo FDA e sua reatividade com algumas hemácias D parcial e Rhce que resultam em discrepâncias na fenotipagem RhD	15
Tabela 3- Marcadores utilizados em estudos de genotipagem RHD fetal.....	22
Tabela 4- Comparação da acurácia (concordância entre a genotipagem RHD fetal no plasma materno com o fenótipo RhD do recém-nascido), número de amostras testadas e exons do gene RHD analisados entre alguns estudos de 2002 a 2014.	24
Tabela 5- Iniciadores e sondas para PCR em tempo real para detectar o gene <i>RHD</i> . ..	35
Tabela 6- Alelos RHD variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX5F: 636-654; EX5R: 697-717) e sonda (EX5P: 656-681) usados na amplificação do exon 5 do gene RHD.	36
Tabela 7- Alelos RHD variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX7F: 972-992, EX7R: 1025-1046) e sonda (EX7P: 997-1023) usados na amplificação do exon 7 do gene RHD.	38
Tabela 8 - Estimativa do consumo mensal	44
Tabela 9-Resultado da Análise da amostra do NIBSC	70
Tabela 10 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene RHD na PCR em tempo real.....	71
Tabela 11 Resultados da genotipagem RHD fetal utilizando PCR em tempo real e comparação com o fenótipo do recém-nascido.	73
Tabela 12 - Cálculo da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem RHD fetal em relação ao fenótipo do recém-nascido.	74
Tabela 13 - Estimativa do número de genotipagens realizadas no Estado de Minas Gerais	75
Tabela 14 - Estimativa do perfil e do número de funcionários para compor a equipe..	76
Tabela 15 - Estimativa do custo mensal com Recursos Humanos	77
Tabela 16 – Estimativa do custo mensal com Maeriais de consumo.....	78
Tabela 17 - Cálculo do consumo mensal com energia elétrica	78
Tabela 18 - Estimativa do custo mensal com Serviços.....	80
Tabela 19 - Estimativa do Custo mensal com imóvel.....	81
Tabela 20 – Equipamentos necessários e a estimativa do custo mensal com manutenções preventivas/corretivas	82

Tabela 21 - Valor estimado do custo mensal com a calibração de equipamentos listados na tabela 22.....	82
Tabela 22 - Valor estimado do custo mensal com a qualificação térmica dos freezers e refrigeradores	83
Tabela 23 - Custo com manutenção, calibração e qualificação térmica dos equipamentos	84
Tabela 24 – Cálculo do custo com a depreciação de equipamentos e mobiliário	84
Tabela 25- Estimativa do custo mensal com equipamentos e mobiliário.....	85
Tabela 26 - Custo dos Insumos e Reagentes para a Genotipagem RHD fetal automatizada.....	86
Tabela 27 - Estimativa do custo mensal de um laboratório e genotipagem RHD fetal não-invasiva.....	88
Tabela 28 Custo do Protocolo de Atendimento a Gestante não sensibilizada com feto RhD negativo no cenário 1	90
Tabela 29 - Custo do Protocolo de Atendimento a Gestante Não Sensibilizada com feto RhD negativo	91
Tabela 30 - Custo do Protocolo de Atendimento a Gestante com feto RhD positivo ...	91
Tabela 31 – Custo do Protocolo de Gestante Sensibilizada com Feto de Alto Risco no cenário 3.....	92
Tabela 32 - Custo do Acompanhamento de Gestante sensibilizada com feto de Baixo Risco no Cenário 3	92
Tabela 33 - Custo do Protocolo de Atendimento a gestante sensibilizada por anti-D com feto RhD negativo no cenário 4	93

Lista de abreviaturas

AGH: Antiglobulina humana

AMB: Associação Médica Brasileira

CH: Coeficiente de honorários médicos

CI: Coombs Indireto

CLT: Consolidação das Leis Trabalhistas

DHPN: Doença Hemolítica Perinatal

EXT: Exsanguineotransfusão

Fig.:Figura

ICF: Índice Córdiofemoral

Ig: imunoglobulina

kDa: Kilo Daltons

Min.: Minuto

mRNA: RNA mensageiro

NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control

NS: Não-sensibilizadas

pb : Pares de base

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PVS: Pico da Velocidade Sistólica da artéria cerebral média

Rhlg: Imunoprofilaxia anti-D

Seg.: Segundos

SNP: *single-nucleotide polymorphism* (polimorfismo de um único nucleotídeo)

TIU: Transfusão Intrauterina

UBS: Unidade Básica de Saúde

US: Ultrassom

Resumo

A genotipagem RHD fetal não-invasiva tem sido amplamente utilizada como rotina no acompanhamento de gestantes RhD negativo nos países desenvolvidos. Entretanto, no Brasil, esse teste ainda não é bem conhecido e nem se sabe qual o impacto a adoção desta ferramenta poderia causar na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas e não-sensibilizadas. O presente estudo tem como objetivo avaliar o impacto da introdução do teste de genotipagem *RHD* fetal na rotina de atendimento de gestantes RhD negativo não-sensibilizadas e sensibilizadas.

Material e métodos: 248 amostras de sangue de gestantes RhD negativo foram processadas para purificação do DNA fetal. PCR em tempo real foi realizada para amplificar segmentos dos exons 5 e 7 do gene *RHD*. Os resultados da genotipagem fetal no plasma materno foram comparados com a fenotipagem RhD dos recém-nascidos. Foi ainda levantado o custo do teste e o impacto de sua adoção na rotina de atendimento de gestantes RhD negativo sensibilizadas e não-sensibilizadas.

Resultados: Os resultados da genotipagem *RHD* fetal puderam ser comparados com 217 fenótipos RhD dos recém-nascidos. Houve 9 resultados inconclusivos, quatro falso negativos e 12 falso positivos. A sensibilidade do teste foi de 97,3%, a especificidade foi de 82,1% e a concordância dos resultados moleculares com os sorológicos foi de 93,1%. O custo da genotipagem RHD fetal não-invasiva foi de R\$74,47. A economia estimada para a introdução do teste molecular não-invasivo para gestantes não-sensibilizadas foi de cerca de R\$4.000,00 e para as sensibilizadas foi de cerca de R\$45.000.000,00.

Conclusão: O teste de genotipagem *RHD* fetal se mostrou sensível e de baixo custo. A análise do impacto da introdução do teste na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo, não-sensibilizadas e sensibilizadas, demonstrou que sua introdução seria muito vantajosa do ponto de vista econômico e assistencial. Para gestantes sensibilizadas, o impacto financeiro foi bem maior que para as não-sensibilizadas. Entretanto, para gestantes não-sensibilizadas a possibilidade de administração da imunoprofilaxia antenatal geraria uma substancial redução da sensibilização materna com conseqüente redução no custo do acompanhamento dessas gestantes numa próxima gestação.

Abstract

Noninvasive *RHD* genotyping have been widely used as routine management of RhD negative pregnant women in developed countries. However, in Brazil, this test is not well known and they don't know nether to what impact the adoption of this tool could cause to the routine care of sensitized and non-sensitized pregnant RhD negative women. This study aims to avaiate the impact of the fetal *RHD* genotyping in the management of sensitized and non sensitized RhD negative pregnant women.

Methods: 248 blood samples from RhD negative pregnant women were processed for fetal DNA purification. Real-time PCR was performed to amplify segments of exon 5 and 7 of the *RHD* gene. The results of genotyping in fetal maternal plasma were compared with the RhD phenotype of newborns. It was further raised the cost of the test and the impact of its adoption in routine care of sensitized and non-sensitized. pregnant RhD negative women.

Results: The results of fetal *RHD* genotyping could be compared with 217 RhD phenotype of newborns. There were 9 inconclusive results, four false negative and 12 false positive. The sensitivity was 97.3%, the specificity was 82.1% and the acuracy of the test was 93.1%. The cost of fetal RHD genotyping was estimated in R\$ 74,47. The estimated savings for the introduction of non-invasive molecular test for non-sensitized patients was approximately R\$ 4,000.00 and for the sensitized women was around R\$ 45,000,000.00.

Conclusion: The fetal *RHD* genotyping test was sensitive and of low cost. The analysis of the impact of this introduction into routine care to non-sensitized and sensitized RhD negative pregnant women, has demonstrated that its introduction would be very advantageous by economic and welfare point of view. The financial impact for sensitized was much higher than for non- sensitized pregnant women. However, for non-sensitized pregnant women the possibility of administration of antenatal immunoprophylaxis would generate a substantial decrease of maternal sensitization with consequent reduction in the cost of monitoring those women at a future pregnancy.

Introdução

1. Revisão bibliográfica

1.1 A doença hemolítica perinatal

A doença hemolítica perinatal (DHPN) é caracterizada pela destruição de hemácias fetais por anticorpos IgG de origem materna (HARMENING, 2005). Essa produção de anticorpos é conhecida por aloimunização. No caso de aloimunização por anti-D, que é a causa mais comum de DHPN, a aloimunização pode ocorrer numa primeira gestação de uma mulher RhD negativo portando um feto RhD positivo. Durante a transferência feto-materna, sobretudo durante o parto, a presença de hemácias RhD positivo na circulação materna pode estimular a produção de anticorpos anti-D maternos. Numa próxima gestação de um feto RhD positivo, o anti-D atravessa a barreira transplacentária e se liga às hemácias fetais, destruindo-as (Figura 1).

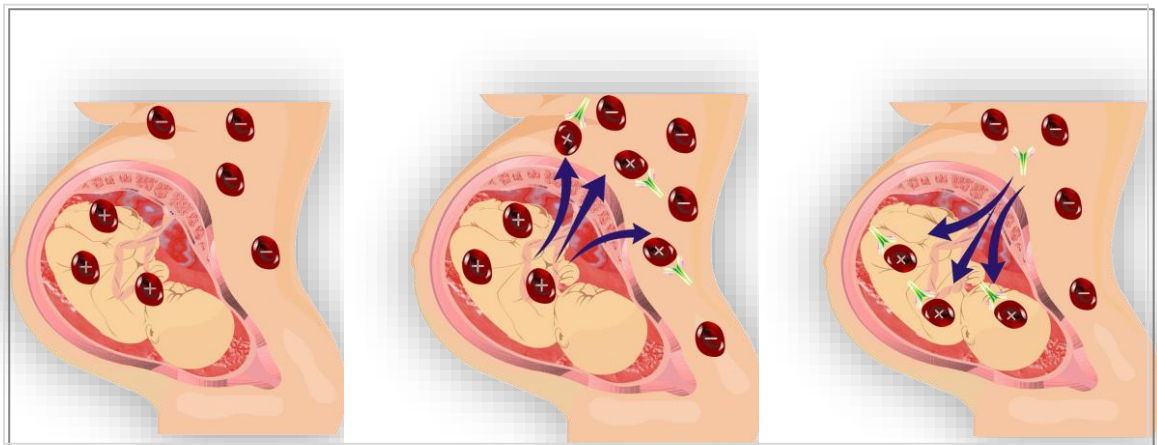


Figura 1 – Aloimunização materna

Numa primeira gestação de uma mulher RhD negativo portando um feto RhD positivo, pode haver transferência feto-materna, sobretudo durante o parto. A presença de hemácias RhD positivo na circulação materna pode estimular a produção de anticorpos anti-D maternos. Numa próxima gestação de um feto RhD positivo, o anti-D atravessa a barreira transplacentária e se liga às hemácias fetais, destruindo-as.

Fonte: Harmening, 2005

A aloimunização materna é uma das causas da inclusão de gestantes RhD negativo em programas de acompanhamento a gestantes de alto risco em ambulatórios obstétricos. A destruição de hemácias fetais pode provocar desde um quadro de discreta anemia à eritoblastose, hidropsia, falência cardíaca e/ou morte fetal. A gravidade da doença vai depender do número de glóbulos destruídos, da capacidade do feto em compensar a destruição acelerada das hemácias e ainda do seu diagnóstico precoce, permitindo um tratamento eficaz e evitando sequelas trágicas e desnecessárias (MOLLISON et al., 1997).

O acompanhamento de gestantes em risco de desenvolver DHPN foi consideravelmente melhorado nos últimos 20 anos, como resultado do reconhecimento precoce da anemia e do tratamento por transfusão sanguínea intrauterina. No passado, o prognóstico fetal era realizado com base apenas em histórias gestacionais prévias e na titulação de anticorpos maternos, embora o significado do título materno não parece se correlacionar com os níveis do anticorpo e seus efeitos no feto (MOLLISON, et al., 1997).

Historicamente, a DHPN foi uma significativa causa de morte fetal ou do recém-nascido, e antes de qualquer intervenção médica as mortes neonatais por DHPN estavam entre 4 a 5 por 1.000 recém-nascidos. Em 1968, com a introdução da imunoprofilaxia RhD houve uma significativa queda na incidência de DHPN (BOWMAN, 1997). Entretanto, apesar de todos os avanços no acompanhamento de gestantes RhD negativo, a DHPN ainda não foi erradicada. No Brasil, o número de internações por DHPN vem subindo. Em 2010, o número de internações por DHPN foi de 2.507, enquanto que em 2006 esse número era 1.499 (DATASUS).

Em relação à incidência de DHPN por nascidos vivos, a realidade não é diferente. Em 2006, esse número era de 10,5 por 21.000 nascidos vivos. Todavia, em 2010 a taxa subiu para 18,4 por 21.000 nascidos vivos, enquanto que na Europa, essa taxa era, em 2004, de 1:21.000 nascidos vivos (DANIELS et al., 2004).

Os números apresentados para o Brasil demonstram que as medidas preventivas não têm sido eficientes ou não têm sido aplicadas. Segundo Nardoza e colaboradores, isso se deve, em parte à falta de informação médica e em parte, ao alto custo da imunoprofilaxia anti-D (NARDOZZA et al., 2005).

1.2 Fisiopatologia da DHPN e intervenções clínicas

A ligação de anticorpos da classe IgG a hemácias fetais pode levar à destruição acelerada dessas células. Em casos de DHPN provocada pelo antígeno D, do grupo

sanguíneo Rh, há uma estimulação da eritropoese para compensar a rápida destruição eritrocitária, levando à produção de eritrócitos nucleados imaturos, os eritroblastos, constituindo o quadro conhecido por “eritroblastose fetal”. Entretanto, em casos de DHPN provocados pelo antígeno “K”, do grupo sanguíneo Kell, há supressão da eritropoese, que somada à destruição de eritrócitos da circulação fetal, pode levar à anemia intensa (VAUGHN et al., 1998).

Este processo poderá ser brando, de forma que o concepto não tenha alterações ao nascimento e, desta forma não exija nenhum tratamento ou poderá ser tão severo que o feto pode se tornar hidrópico ou ir a óbito. Quanto mais cedo este processo se inicia no útero e quanto maior é a sua intensidade, mais severos serão os efeitos ao feto (TANNIRANDORN & RODECK, 1991).

Diversos fatores afetam a imunização materna e a severidade da DHPN. Dentre eles, estão o tipo e o título do anticorpo, os efeitos desse anticorpo no feto, o grau de hemorragia feto-materna, dentro outros. É importante, ainda, citar o efeito protetor da incompatibilidade ABO, que protege o feto ao promover a eliminação das hemácias fetais incompatíveis da circulação materna, reduzindo a chance de imunização materna ou o aumento do título do anticorpo (MANUAL TECHNICAL AABB, 2005).

Em fetos severamente afetados, em que a produção de células hematopoiéticas pela medula óssea fetal é insuficiente para compensar a anemia, órgãos como o baço e o fígado são estimulados à produção de células hematopoiéticas, sobrecarregando-os e levando a um quadro de hepatoesplenomegalia, hipertensão portal e destruição de hepatócitos. Isso pode resultar em hipoproteïnemia, insuficiência cardíaca e hepática, além de edema generalizado, quadro conhecido por “hidropsia fetal” (GOODSTEIN, 2008). Fetos menos afetados continuam sofrendo hemólise com a consequente liberação de bilirrubina indireta na corrente sanguínea, que antes do nascimento é conjugada à albumina no fígado materno sendo eliminada da circulação fetal sem maiores danos. Entretanto, ao nascimento, pela dificuldade de metabolizar a alta concentração de bilirrubina liberada pelo rompimento eritrocitário, o recém-nascido pode apresentar altas concentrações de bilirrubina sérica, que pode se depositar nos gânglios basais e nos núcleos do tronco cerebral, causando lesão neuronal em áreas específicas do cérebro, fenômeno conhecido por “*kernicterus*” (MOLLISON et al., 1997).

Como forma de tratamento pré-natal poderá ser realizada a troca de plasma materno, com o objetivo de diminuir a concentração do anticorpo em mulheres sensibilizadas ou a transfusão intra-uterina, a fim de minimizar os riscos ao feto. Entretanto, pelo fato de transfusões intra-uterinas estarem associadas a um risco de 1

a 2% de perda perinatal, elas devem ser realizadas somente após criteriosa avaliação médica (WEINER & OKAMURA, 1996).

Após o nascimento, se o recém-nascido apresentar um grau de hemólise elevado, poderá ser realizada a ex-sanguíneo transfusão, com o principal objetivo de remover da circulação do recém-nascido hemácias sensibilizadas com anticorpos, anticorpos maternos e a bilirrubina presente em altas concentrações (igual ou maior a 340 µmol/L), além de promover o aporte de hemácias ao recém-nascido, corrigindo a anemia (MOLLISON et al., 1997).

Em estudo realizado no Centro de Medicina Fetal (CEMEFE) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foi demonstrado que 42,4% dos fetos de mães aloimunizadas pelo anti-D evoluíram para uma anemia intensa, sendo caracterizados como fetos de Alto risco (OSANAN, 2010). Outro estudo realizado no CEMEFÉ/UFMG, demonstrou que 41,3% dos fetos com DHPN, tiveram que ser submetidos à Transfusão Intrauterina e 45,3% à exsanguineotransfusão, sendo que 64,7% deles, foram submetidos a uma exsanguineotransfusão, 14,7% à duas, 14,7% à três, 2,9% à quatro e 2,9% à cinco exsanguineotransfusões (VILLASCHI, 2012).

1.3 Protocolo de Atendimento a Gestantes em risco de DHPN

Segundo Reis e colaboradores, gestantes aloimunizadas necessitam ser acompanhadas em Serviços de Atendimento terciário, para que recebam acompanhamento apropriado, devido ao alto risco de morbidade e mortalidade perinatal. Nesse contexto, o sucesso do acompanhamento vai depender do tempo do diagnóstico e do tratamento da anemia fetal (REIS et al., 2013).

No Centro de Medicina fetal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEMEFE), o diagnóstico inicial da DHPN é feito através do teste de Coombs Indireto, que indica a presença de anticorpos maternos contra antígenos presentes na superfície da hemácia. Após a detecção do anticorpo se faz necessária a identificação do anticorpo, pois nem todas as DHPN serão causadas pelo anti-D (PEREIRA et al, 2012).

A partir do diagnóstico inicial, são realizados métodos não-invasivos de diagnóstico da gravidade da anemia fetal como o ultrassom (US), o índice cardiofemoral (ICF) e o doppler. No US é avaliada a biometria e a presença de hidropsia fetal. O ICF é a medida da relação entre o diâmetro biventricular e o comprimento do fêmur (alterado se o ICF for maior ou igual a 0,59). Segundo Cabral e colaboradores, o ICF pode ser um eficiente marcador não-invasivo da anemia fetal

severa, mas não é suficientemente sensível para ser usado como um parâmetro único para a predição da anemia fetal (CABRAL et al., 2008). No doppler, mede-se o pico da velocidade sistólica da artéria cerebral média (alterado se estiver maior ou igual a 1,5 MoM) (PEREIRA et al, 2012).

A presença de hidropsia isoladamente ou a presença de ICF e Doppler alterados indicam fetos de alto risco de anemia grave. Se a gestação estiver acima de 34 semanas, indica-se a interrupção da gestação após corticoterapia. Abaixo desta idade gestacional, está indicada a cordocentese e se necessário, a transfusão intrauterina (TIU), ambos procedimentos invasivos, que trazem risco à gestante e ao feto. Exceção para os fetos hidrópicos, que devem, sempre, ser submetidos a TIU antes do nascimento, pois melhora as suas condições de nascimento e manejo pós natal (PEREIRA et al, 2012). Para fetos de baixo risco para a anemia são realizados os exames não-invasivos citados acima, a cada 2 semanas, entre a 15^a e a 28^a semana de gestação e a cada 7 dias a partir de então, até o parto. Para fetos de alto risco, os mesmos exames são realizados semanalmente, mesmo se submetidos a TIU (PEREIRA et al, 2012).

Como profilaxia, as gestantes RhD negativo não-sensibilizadas com anti-D, no painel de hemácias, recebem a imunoprofilaxia anti-D pós-natal ou na ocorrência de eventos hemorrágicos na gestação, independentemente do diagnóstico de isominunização materna ou da realização da salpingotripsia bilateral no momento da cesariana. É importante ressaltar que a profilaxia só se aplica ao anti-D, pois trata-se de anti-D exógeno. Caso a gestante esteja sensibilizada por outro(s) anticorpo (s), que não o anti-D, deve receber a profilaxia anti-D (PEREIRA et al, 2012).

A DHPN é de alta morbidade fetal, se não acompanhada em serviço de referência (PEREIRA et al, 2012).

1.4 Doença Hemolítica Perinatal causada por Anti-D

Mais de 50% das DHPN são causadas pelo antígeno D, um dos 54 antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh (CORREA et al., 2004; ISBT.ORG). Em caucasianos, cerca de 10% de todas as gestações envolve uma mulher RhD negativo e um feto RhD positivo, colocando a mãe em risco de sensibilização e os futuros conceptos em risco de desenvolver DHPN. Cerca de 5% das DHPN resultam em morte fetal ou neonatal e outros 5% resultam em moderados a graves problemas de desenvolvimento fetal (FINNING et al., 2008). Segundo Daniels (2004), a despeito do

uso da imunoprofilaxia anti-D, a aloimunização RhD ainda é a maior causa de doença hemolítica severa em fetos e neonatos (DANIELS et al., 2004).

Por ser altamente imunogênico, apenas 1 mL de hemácias fetais contendo o antígeno D é capaz de imunizar a mãe. Segundo Harmenig e colaboradores (2005), o risco de uma mãe RhD negativo produzir anti-D após gerar um filho RhD positivo é de aproximadamente 9%, se a imunoprofilaxia anti-D não for administrada. No caso de mulheres com uma história de fetos portadores de hidropsia fetal devido ao anti-D, há 90% ou mais de chances de um subsequente feto ser também afetado (BOWMAN, 1990).

1.5 Administração de anti-D profilático

A introdução da imunoprofilaxia RhD (Rhlg), em 1968, foi um marco importante na medicina preventiva. No Canadá, antes de sua introdução, a taxa de imunização RhD era de 13,2%. Subsequente à sua introdução, a taxa de imunização RhD foi reduzida para 0,14%. A taxa de sucesso da imunoprofilaxia RhD é, portanto, de 98,4 a 99% (MOLLISON et al., 1997; SCOTT, 2001).

Cerca de 0,71 a 1,9% dos casos de sensibilização RhD ocorrem antes do parto, a maioria dos quais em decorrência de hemorragia transplacentária no terceiro trimestre. Esta causa residual, mas importante, de doença aloimune RhD pode ser reduzida pelo uso de profilaxia antenatal, em mulheres RhD negativo não-sensibilizadas, com risco de estar gestando um feto RhD positivo.

A Rhlg tem um efeito profilático por se ligar a hemácias contendo o antígeno D, eliminando-as da circulação antes que o sistema imunológico materno reconheça o antígeno e inicie a produção de anti-D (SCHMIDT et al., 2010). Na experiência inicial na Universidade de Manitoba, no Canadá, a imunoprofilaxia com 28 e novamente com 34 semanas de gestação reduziu a incidência de sensibilização de 1,8 para 0,1%, sem quaisquer efeitos adversos à mãe ou ao feto (MANNING, 2000; CORREA et al., 2004). Sendo assim, a recomendação é que todas as mulheres RhD negativo não imunizadas recebam uma dose profilática de imunoglobulina anti-D antenatal, isto é, entre a 28ª e a 34ª semana de gestação e até 72 horas após o nascimento de um recém-nascido RhD positivo, ou ainda após aborto, gravidez ectópica, procedimentos invasivos e outras causas de hemorragia transplacentária.

No Brasil, a imunoprofilaxia antenatal não é administrada de rotina. A FEBRASGO, Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia, através do Manual de Gestação de alto risco 2011, recomenda a profilaxia antenatal em mulheres com teste de Coombs indireto negativo e com feto RhD positivo

(realizado no primeiro trimestre pela técnica de estudo de DNA fetal na circulação materna). Nos casos de RhD fetal desconhecido, que é o caso da maioria das gestações brasileiras, essa conduta é substituída pela profilaxia pós-parto exclusiva. Entretanto, em países desenvolvidos, a rotina de administração do anti-D antenatal iniciou-se em meados dos anos 90, quando foi reportada a redução na sensibilização materna de 1,2% para 0,28% (SZCZEPURA et al., 2011). Em 2002, o Instituto Nacional da Saúde e Excelência Clínica (NICE) padronizou o uso da imunoprofilaxia anti-D entre a 28ª e 34ª semana de gestação no Reino Unido, como uma medida custo-efetiva (SZCZEPURA et al., 2011). Todavia, nesses países, cerca de 41% de gestantes RD negativo recebem a imunoprofilaxia anti-D, desnecessariamente, por estarem gestando fetos RhD negativo (Dovc-Dnovsek et al., 2013).

1.6 O gene *RHD*

O gene *RHD* codifica a proteína RhD, que carrega os antígenos RhD e está localizado no cromossomo 1 (1p36.13-p34.3). Esse gene é flanqueado por duas regiões altamente homólogas, as “*Rhesus boxes*”, de orientação idêntica (figura 2). Intimamente ligado ao gene *RHD*, encontra-se o gene *RHCE*, que codifica a proteína RhCE, que carrega os antígenos RhCE, dos quais, os antígenos “C”, “c”, “E” e “e” são os principais. Esses genes estão separados por um terceiro gene, um segmento de 30.000 pb, o SMP1 (AVENT & REID, 2000).

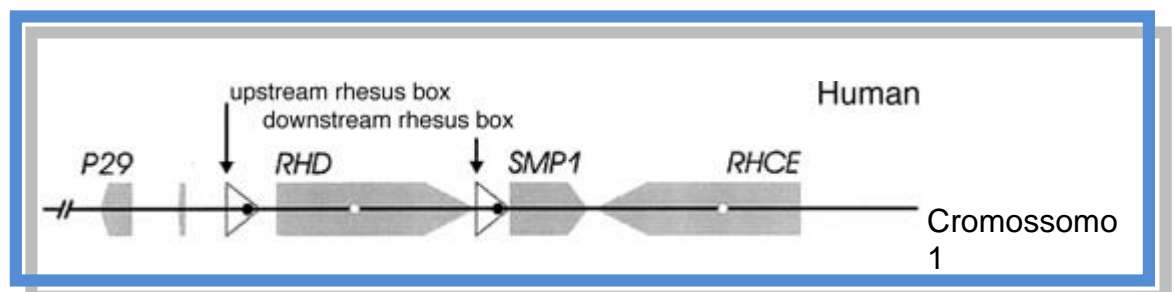


Figura 2 - Genes *RHD* e *RHCE*

Os genes *RHD* e *RHCE* estão localizados no cromossomo 1, possuem orientação oposta e estão separados apenas por um terceiro gene, o SMP1. O gene *RHD* é flanqueado por duas regiões, as “*Rhesus Box (upstream e downstream Rhesus Box)*”.

Fonte: Wagner e Flegel, 2002.

RHD e *RHCE* são altamente homólogos, possuem 10 exons cada e cerca de 60 Kb. A grande proximidade e homologia entre os genes *RHD* e *RHCE* permitem a formação de alelos *RHD* híbridos, levando à produção de antígenos D diversificados, observados entre os diferentes grupos étnicos (CHEN & FLEGEL, 2005). Já foram reportados mais de 200 alelos *RHD* e 80 alelos *RHCE* e novos alelos ainda estão sendo reportados (SIPPERT et al., 2015). Sendo assim, apesar da maioria dos indivíduos que possuem o gene *RHD* expressar a proteína D em uma sequência convencional de aminoácidos, 1 a 2% dos indivíduos de origem européia e a maioria dos afroamericanos e latinoamericanos têm alterações de sequência do *RHD*, resultando na produção de uma proteína alterada (WESTHOFF, 2005).

1.7 A proteína RhD

A proteína RhD consiste de 417 aminoácidos e é formada por doze hélices transmembranas, que entram e saem da membrana eritrocitária seis vezes, formando seis alças extracelulares, levando-a a ser denominada “proteína de múltiplos passos” (figura 3). A proteína RhD não é glicosilada e é expressa apenas na membrana dos eritrócitos, se a proteína RhAG, codificada pelo gene *RHAG* (cromossomo 6 p11-p21.1), estiver presente (AVENT & REID, 2000).

O antígeno D é uma coleção de epítomos de conformações dependentes ao longo da proteína RhD. Alterações na sequência de aminoácidos podem levar a mudanças na expressão, na estrutura ou nos epítomos do antígeno D, resultando nos fenótipos D fraco, D_{el} , D parcial ou epítomos RhCE “D-like”, os quais podem conduzir a uma inferência errônea do fenótipo RhD (WESTHOFF, 2005).

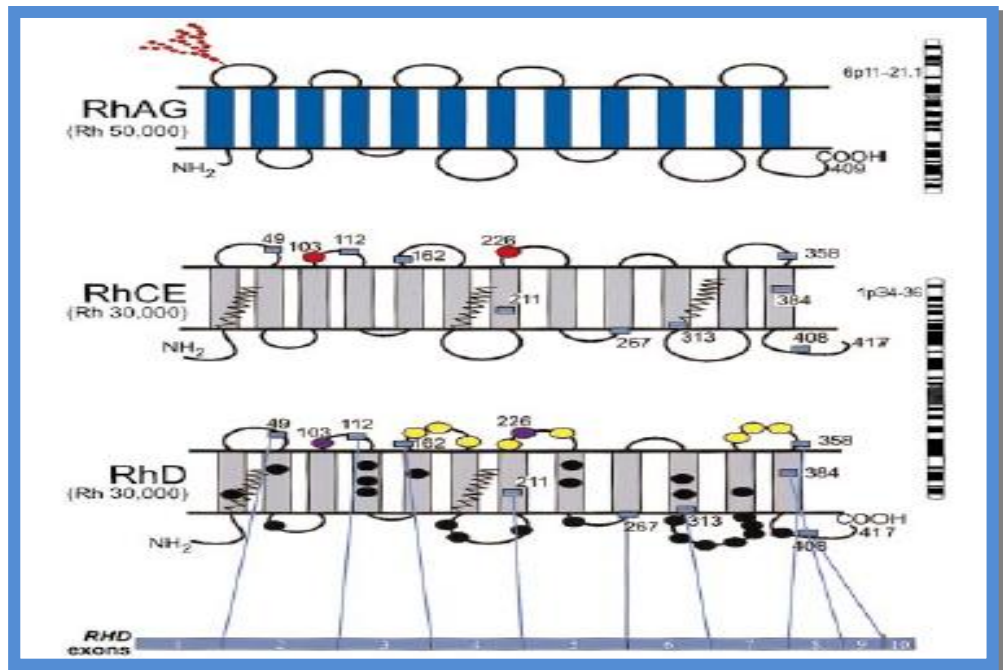


Figura 3: As proteínas RhD, RhCE e RhAg

As proteínas RhD, RhCE e RhAg atravessam a membrana eritrocitária seis vezes. Dos aminoácidos específicos do antígeno D, 8 estão na superfície exofacial (o) e 24 em domínios transmembranar ou citoplasmáticos (o). Círculos vermelhos (o) representam aminoácidos críticos para os antígenos C/c (Ser103Pro) e E/e (Pro226Ala), da proteína RhCE.

Fonte: Avent & Reid, 2000.

O fenótipo D fraco é caracterizado por mutações que são na grande maioria das vezes substituições únicas de nucleotídeos (SNP) localizadas na região transmembranar ou intracelular (figura 4). Essas alterações afetam a quantidade de proteína RhD na membrana, levando a um número reduzido de sítios antigênicos nas hemácias. Isso faz com que o antígeno D seja detectado somente na fase da antiglobulina humana (AGH) (WESTHOFF, 2005). Todavia, existem fenótipos D fraco de tão baixa densidade antigênica que não são detectados nem mesmo na fase de AGH. Mais de 80 diferentes tipos de mutações associadas ao fenótipo D fraco já foram reportados (tipos 1-78), mas os tipos mais frequentemente encontrados (D fraco tipos 1, 2 e 3) aparentemente não têm epítomos D alterados, não levando à produção de anti-D em caso de transfusões incompatível ou gravidez (WESTHOFF, 2005).

O fenótipo D_{el}, um tipo de D fraco frequentemente encontrado em asiáticos, é caracterizado por uma densidade antigênica abaixo do nível de detecção pelos reagentes anti-D disponíveis atualmente no mercado para a fenotipagem RhD e só é

detectado por testes de adsorção e eluição com anti-D, o que faz com que indivíduos D_{el} sejam erroneamente classificados como RhD negativo, embora o gene *RHD* esteja presente (WESTHOFF, 2005).

O fenótipo D parcial é caracterizado por mutações localizadas na região extracelular da membrana eritrocitária (figura 4). Esse fenótipo pode ser causado por substituições únicas de nucleotídeos (SNP) ou de conversão gênica, resultando na troca de exons do gene *RHD* por exons do gene *RHCE* e vice-versa, formando um gene híbrido *RHD-CE-D*. Essas mutações podem levar à formação de novos epítomos ou de epítomos alterados que podem ou não ser detectados pelos reagentes anti-D utilizados na fenotipagem. Portadores desse fenótipo, se estimulados por uma proteína RhD normal, podem produzir anticorpos anti-D. Atualmente já foram reportados 28 categorias e 60 tipos de D fraco (Rhesus site).

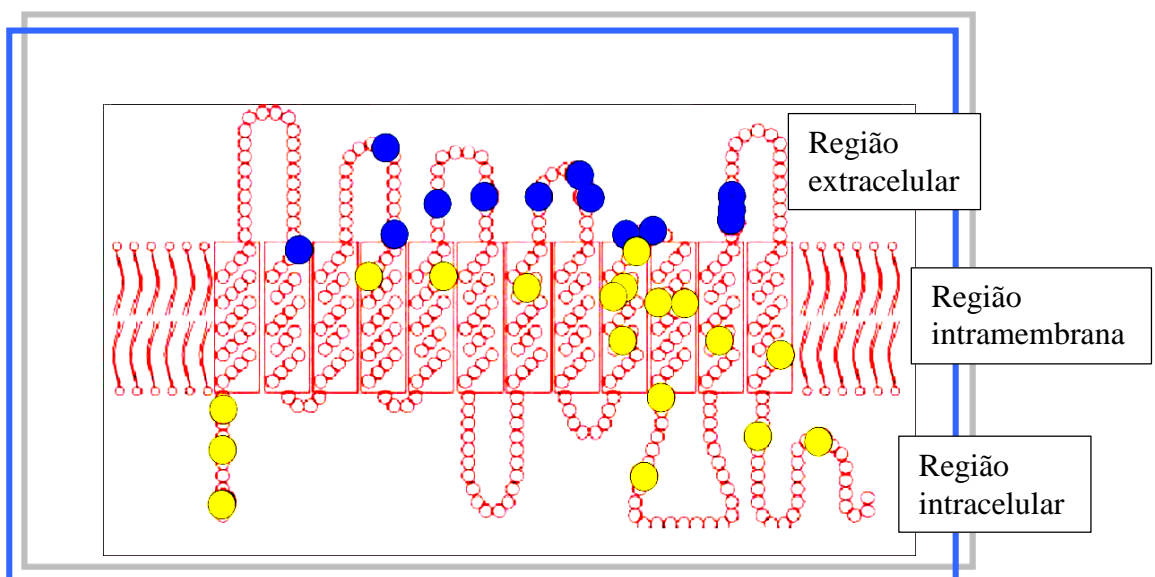


Figura 4: Polimorfismos na proteína RhD, resultando no fenótipo D fraco ou D parcial.

Desenho esquemático da proteína RhD inserida entre a dupla camada fosfolipídica da membrana eritrocitária. Em amarelo estão representados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) localizados na região transmembranar e intracelular gerando o fenótipo RhD fraco. Já os pontos azuis representam os polimorfismos de SNP na região extracelular, caracterizando o fenótipo D parcial.

Fonte: Flegel & Wagner, 2002.

O fenótipo RhCE “D-like” é caracterizado pela ausência do gene *RHD*. Entretanto, a proteína RhCE tem aminoácidos D-específicos que reagem com alguns anti-D, sendo erroneamente classificados como RhD positivo. Dois exemplos, D^{HAR} (também conhecido como R₀^{HAR}), encontrado em indivíduos de ancestralidade germânica e Crawford (ceCF), presente em indivíduos de ancestralidade africana, são notáveis devido à sua forte reatividade com alguns reagentes monoclonais licenciados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e completa ausência de reatividade com outros (tabela 2), mesmo quando o teste indireto da antiglobulina humana ou pesquisa de D fraco é realizado (WESTHOFF, 2005).

Face ao exposto, os diversos tipos de metodologias e reagentes empregados na fenotipagem RhD também podem ser responsáveis por fenotipagens RhD discrepantes (WESTHOFF, 2005). Alguns fenótipos D fraco e particularmente, D fraco tipo 2, nem sempre são detectados. Além disso, nenhum reagente anti-D atualmente disponível no mercado detecta hemácias D_{el} (WESTHOFF, 2005).

A tabela 1 apresenta quais os tipos de D parcial que são detectados por cada um dos clones que compõem alguns soros anti-D.

Tabela 1 - Tipos de clones presente em reagentes anti-D monoclonais disponíveis no mercado e sua reatividade com algumas categorias de D parcial

Clone	II	IIIa	IIIb	IIIc	IVa	IVb	Va	VI	VII	DFR	DBT	R ₀ ^{HAR}	HMI	Howe	Carr	Casar i	Lore	Sor	1711 844
RUM-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MS-201	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TH-28	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
MS-26	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+
MAD-2	+	NT	NT	NT	+	NT	(+)	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(+) Reação positiva (-) Reação negativa (NT) Não testado

A tabela 2, ilustra alguns reagentes anti-D licenciados pelo FDA e sua reatividade com algumas hemácias D parcial e Rhce que resultam em discrepâncias na fenotipagem RhD.

Tabela 2– Reagentes anti-D licenciados pelo FDA e sua reatividade com algumas hemácias D parcial e Rhce que resultam em discrepâncias na fenotipagem RhD

Reagente	IgM Mono clonal	IgG	D parcial		D – ou D-like epitopo(s) em Rhce			
			D ^{VI}	DBT	D ^{HAR}	CE ^{CF}	ce ^{RT}	CE ^{SL}
			TA/AGH	TA/AGH*				
Gammaclone	GAMA401	F8D8	N / P	P	P	P	P	NTE
Immucor series 4	MS201	MS26	N /P	P	P	N	N	(+)
Immucor series 5	Th28	MS26	N /P	P	Var /P	N	N	(+)
Ortho BioClone	MAD2	Policl.	N /P	N /P	N	N	N	NTE
Ortho Gel	MS201	NSA	N/N	P	P	N	N	(+)
Policlonal	NSA	NSA	N /P	N /P	N	N	N	(+)*

* Células tratadas com enzimas (+): Fracamente positivo Cauc.: Caucasianos
 AGH: Fase antiglobulínica TA: Teste realizado à temperatura ambiente N: Negativo
 Var: Variável
 P: Positivo NSA: Não se aplica NTE: Não testado

Fonte: WESTHOFF, 2005

1.8 Bases moleculares do fenótipo RhD negativo

O fenótipo RhD negativo é encontrado em 15% da população europeia, 8% dos africanos e é raro em asiáticos (REID & CHRISTINE, 2004). Em estudo realizado no Brasil, envolvendo 2.462 doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, demonstrou que a frequência de doadores RhD negativo foi de 8,08% (NOVARETTI et al., 1995). Já o estudo realizado por Moreira e colaboradores, também no estado de São Paulo, revelou que uma frequência de 12,5% de doadores de sangue RhD negativo (MOREIRA et al., 1996). Em estudo realizado com 2.372 puérperas do Hospital e Maternidade Cachoeirinha, zona oeste de São Paulo, a frequência do fenótipo RhD negativo foi de 9,7% (BAIOCHI et al., 2007). Levando-se em conta esses estudos, estima-se que a média do fenótipo RhD negativo na população brasileira é

de cerca de 10%, mas essa frequência pode variar, dependendo da região brasileira, devido ao alto grau de miscigenação nesse país.

Cerca de 18% dos europeus não expressam o antígeno D devido, na grande maioria dos casos, a uma deleção completa do gene *RHD*. Entretanto, o fenótipo D negativo pode ser causado também por alelos híbridos *RHD/CE* envolvendo as alças exofaciais 3 a 6, mutações em sítios de *splicing*, mutações sem sentido e outras alterações como deleções ou inserções, conforme mostrado na figura 5 (COLIN, 1991).

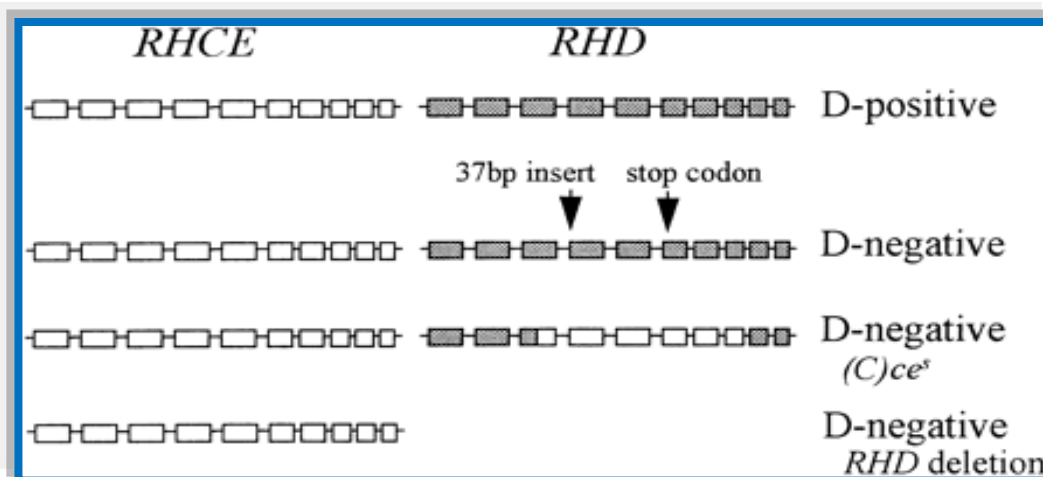


Figura 5: Representação da organização genômica característica de um fenótipo D positivo e de três fenótipos D negativo

Primeira linha: representação do genótipo *RHD* positivo devido à presença do gene *RHD*.

Segunda linha: representação do gene *RHD Ψ* , responsável pelo fenótipo RhD negativo, por se tratar de um gene *RHD* não funcional, onde há uma inserção de 37 pares de base no exon 4 e a formação de um “*stop codon*” no exon 6.

Terceira linha: representação do gene híbrido *RHD-CE-D*, onde parte dos exons de *RHD* se funde aos exons de *RHCE*, levando à ausência de epítomos da proteína RhD, resultando em um fenótipo RhD negativo.

Quarta linha: Representação do fenótipo RhD negativo devido à deleção total do gene *RHD*.

Em africanos, o fenótipo RhD negativo é decorrente em 18% dos casos de uma deleção completa do gene *RHD*, em 67% dos casos pela presença do pseudogene *RHD Ψ* e em 15% dos casos pelo híbrido *RHD-CE-D* (*Cde^s*) (AVENT & REID, 2000).

O *RHD Ψ* é caracterizado pela inserção de 37 pares de base no exon 4, que introduz um códon de terminação (*stop codon*) na posição 210 (exon 6) (figura 5). O

gene *RHD Ψ* difere do *RHD* funcional por um ponto único de mutação nos exons 4 e 6 e muitos pontos de mutação no exon 5. Esse fenótipo está presente em cerca de 24% dos afro-americanos D negativo e em 17% dos sul-africanos D-negativo miscigenados (SINGLETON et al., 2000).

O gene híbrido *RHD-CE-D* consiste na fusão de exons *RHD* com exons *RHCE*. O híbrido *RHD-CE-D* mais comum em caucasianos, o D parcial categoria VI (D^{VI}), consiste dos exons 1-3 e 7-10 do gene *RHD* e dos exons 4-6 do gene *RHCE* (DANIELS et al., 2004).

1.9 Genotipagem *RHD* fetal

Em 1991, quando as bases moleculares do fenótipo RhD se tornaram conhecidas, a genotipagem *RHD* se tornou amplamente abordada e tem sido de grande utilidade no acompanhamento precoce de gestantes RhD negativo sensibilizadas ou em risco de imunização, a tempo de administrar a imunoprofilaxia anti-D antenatal ou de evitar sua infusão desnecessariamente, em caso de feto RhD negativo (BENNET et al., 1993).

A genotipagem *RHD* fetal permite a predição do fenótipo RhD do feto a partir da análise de seu DNA. O teste envolve a amplificação de uma ou preferencialmente mais de uma região do gene *RHD* para determinar se o gene está presente, pois numerosas variantes de *RHD* já foram descritas, como *RHD Ψ* e genes híbridos *RHD-CE-D*. Desta forma, como o genótipo é utilizado para a predição do fenótipo expressado, um amplo conhecimento da genética dos grupos sanguíneos é absolutamente necessário.

Os primeiros métodos de genotipagem foram realizados mediante o isolamento direto de DNA fetal de amniócitos ou de vilosidades coriônicas (COSTA et al., 2002). Entretanto, tal procedimento é de alto custo e por requerer técnicas invasivas de coleta, é de difícil realização, sendo viabilizado somente em poucos centros. Além disso, está associado a um pequeno, mas significativo risco de aborto espontâneo (WILSON, 2000) e a presença de DNA fetal não pode ser detectada com menos de 11 semanas de gestação (WHITE et al., 2012). A amniocentese está associada à indução da hemorragia feto-materna em 17% dos casos onde esse procedimento é adotado (TABOR et al., 1987) e ao aumento da incidência de imunização gestacional (FINNING et al., 2002). A coleta de amostra vilo-coriônica apresenta um risco de 3% de hemorragia transplacentária e está associada ao aumento do título do anticorpo e

perda fetal de aproximadamente 0,3% (MARTINE et al., 2006), além de oferecer risco de má formação congênita (DENOMME & FERNANDES, 2007).

Análise de DNA extraído de tecido da mucosa cervical é minimamente invasiva, mas a quantidade de DNA fetal recuperada é muito pequena e há possibilidade de contaminação por DNA materno, contribuindo para uma baixa sensibilidade do teste (LO et al., 1997).

1.10 Genotipagem *RHD* fetal não-invasiva

A presença de ácido nucléico fetal na circulação materna foi estabelecida em 1948, antes da elucidação da estrutura do DNA, mas a primeira descrição da utilização de uma PCR em tempo real utilizando DNA fetal livre no plasma materno só se deu em 1997 (LO et al., 1997) e muitos grupos têm avaliado sua eficácia na predição da herança do gene *RHD*. Todavia, um protocolo único sem resultados falsos ou discordantes com a fenotipagem ainda não se encontra disponível (MACHADO et al., 2006).

O alto “*turnover*” de DNA fetal no plasma materno sugere que o DNA é liberado continuamente na circulação materna e em grandes quantidades. Tem sido aceita a hipótese de que a fonte de DNA fetal livre é o sinsiciotrofoblasto. Um trabalho envolvendo gravidezes anembriônicas (desprovidas de feto, porém com material placentário) demonstrou que DNA derivado de fetos (isto é, placenta) foi encontrado em tais gestações em níveis similares às gestações controles com feto de idade similar. Por esta razão, acredita-se que a fração fetal de DNA livre no plasma materno é derivada de sinsiciotrofoblastos que sofreram apoptose, e então o DNA é fragmentado (AVENT et al., 2009).

Estudos evidenciaram que o tamanho dos fragmentos de DNA fetal no plasma materno é de 145 a 201 pb, em contraste com os fragmentos de DNA materno que são consideravelmente maiores (CHAN et al., 2004). Lo e colaboradores (1997) demonstraram que a concentração de DNA fetal livre no plasma aumenta com o tempo de gestação, sendo que o DNA fetal representa aproximadamente 3,4% a 6,2% de DNA livre no plasma materno durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação, respectivamente (FINNING et al., 2002). Sendo assim, a genotipagem não-invasiva é capaz de detectar o DNA fetal livre a partir de 5 semanas de gestação (WHITE et al., 2012). Todavia, a quantidade de DNA fetal presente no soro materno varia de gestação a gestação e a cada dia ao longo do período gestacional (AVENT et al., 2009). Por outro lado, a relativa proporção de DNA fetal no plasma materno é conhecida por

umentar em certas gestações com complicações, incluindo pré-eclampsia, casos onde há algum tipo de dano placentário e aneuploidia (ZHOU et al., 2005).

Gravidezes prévias não afetam a eficácia dos testes, como no caso do isolamento de leucócitos fetais do sangue materno, que permanecem por muitos anos após a gestação (BIANCHI et al., 1996) e desaparece da circulação materna em poucas horas após o nascimento, sendo sua meia vida de 16 horas após cesariana e de 10 a 100 horas após parto normal, exceto em casos de doença hepática materna (AVENT et al., 2009). Por outro lado, microquimerismo ou transplante de células fetais nos órgãos linfóides ou na medula óssea podem levar à persistência de uma pequena quantidade de células nucleadas.

Atualmente sabe-se que o plasma é a melhor fonte de DNA fetal celular livre, quando comparado ao soro e EDTA é o melhor anticoagulante de escolha, comparado à Heparina ou Citrato (DOVC-DRNOVSEK et al., 2013). O tempo recomendado para processamento do plasma é aquele dentro de 48 horas de coleta e não deve ser superior a 5 dias.

Quanto à extração manual do DNA fetal livre, dentre os kits recomendados, o QIAmp DSP Virus Kit (Qiagen, Hilden, Germany) é o de escolha, quando comparado ao tradicional QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen) ou pode-se utilizar o kit comercial recentemente lançado, o QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) (DOVC-DRNOVSEK et al., 2013). Os métodos automatizados recomendados para extração de DNA fetal livre são o MgnaPure LC System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) e o Magnetic Separation Module 1 (Chemagen, Baesweiler, Germany), que permite uma extração em larga escala (DOVC-DRNOVSEK et al., 2013).

Diferentes regiões do gene *RHD*, como os exons 3, 4, 5, 7, 10 e intron 4, têm sido testados para a determinação do correto fenótipo RhD inferido. Nos últimos anos, muitos estudos têm sido descritos para a genotipagem *RHD* fetal. Similarmente, o SAFE (Avanços especiais na Avaliação Fetal e Neonatal), tem recomendado testar o exon 5 (a região que discrimina entre *RHD* e *RHD* Ψ) e o exon 7 (LEGLER et al., 2007).

Os testes iniciais de genotipagem *RHD* fetal foram direcionados a diferenças entre os genes *RHD* e *RHCE*, os quais estão intimamente relacionados, e se mostraram relativamente simples e tecnicamente robustos. Entretanto, com o avanço do conhecimento sobre as complexidades genéticas do sistema Rh, especialmente o fato de que múltiplos mecanismos genéticos podem apontar para um fenótipo D negativo, testes que detectam todos os fenótipos D negativo comuns na Europa, foram desenvolvidos (AVENT et al., 2009).

Por ser um teste realizado em amostras com pouquíssima quantidade de DNA, a qualidade dos testes deve ser assegurada. Antes de oferecer a genotipagem *RHD*

não-invasiva como rotina diagnóstica, se faz necessário participar de workshops tal como o Workshop Internacional em Genotipagem de Grupo sanguíneo e avaliação Internacional de Reagente Referência para a detecção de *RHD* e *SRY* em plasma, oferecido pelo Instituto Nacional para Controles e Padrões biológico (NIBSC) (DOVC-DRNOVSEK et al., 2013).

No Brasil a genotipagem *RHD* fetal não tem sido utilizada de rotina e apenas um Centro realiza o teste para a rotina diagnóstica, que é o Hospital Albert Einstein, em São Paulo. No Reino Unido, a genotipagem *RHD* fetal não-invasiva vem sendo oferecida desde 2001 e trouxe significativa redução do número de procedimentos invasivos (FINNING et al., 2004). Em 2007, muitos países europeus introduziram esse teste para gestantes sensibilizadas com o objetivo de identificar gestações de alto risco (SCZEPURA et al., 2011). Todavia, na Europa, apenas a Dinamarca e a Holanda introduziram a genotipagem *RHD* fetal na rotina de atendimento a gestantes não-sensibilizadas (DOVC-DRNOVSEK et al., 2013).

1.11 Controles e marcadores da genotipagem *RHD* fetal

Considerando-se que a concentração de DNA fetal livre no plasma materno é muito pequena, faz-se necessária a inclusão de controles e marcadores para verificar se há presença de DNA (controle da amplificação) e, especificamente, de DNA fetal na PCR.

Vários estudos utilizam como controle interno da amplificação de DNA o gene *CCR5* (Universal Chemokine Receptor Gene) (FINNING et al., 2008; WHESTOFF, 2005; MINON et al., 2008; GAUTIER et al., 2005). Outros genes que podem ser utilizados são o *GAPDH* (gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase) (FINNING et al., 2004; ZHOU et al., 2005), β -globina (MACHADO et al., 2006; MÜLLER et al., 2008; CARBONNE et al., 2007), β -actina (BROJER et al., 2005), Albumina (DOVC-DRNOVSEK et al., 2013) ou *SOD* (Superóxido dismutase) (COSTA et al., 2002). Quando não há amplificação do gene controle, os testes não serão validados. Nesse caso, são necessárias nova purificação de DNA e nova PCR.

Como controle da reação de PCR pode se usar amostras de DNA genômico RhD positivo e RhD negativo (FINNING et al., 2008) ou DNA extraído do plasma de gestantes de feto RhD positivo (GROOTKERK-TAX et al., 2006; FINNING et al., 2004).

Atualmente, as aplicações clínicas do diagnóstico pré-natal não-invasivo requerem a detecção de alelos paternalmente herdados (ou *de novo*) para dar um

resultado definitivo. Ausência de detecção de sequências paternas pode estar relacionada a um resultado verdadeiramente positivo ou pode indicar ausência de amplificação devido a baixas concentrações ou à completa ausência de DNA fetal livre na amostra. Desta forma, a amplificação de um marcador fetal, que confirme a presença de DNA fetal livre, permite que um resultado negativo seja mais acuradamente interpretado como um resultado verdadeiramente negativo ou falso negativo (WHITE et al., 2012).

Para verificar se o DNA fetal livre está de fato presente, utilizam-se marcadores. No caso de fetos do sexo masculino poderá ser amplificado o gene *SRY* (DANIELS et al., 2004; FINNING et al., 2002; MINON et al., 2008; FINNING et al., 2004; ZHOU et al., 2005). Finning e colaboradores (2008), entretanto, determinaram o sexo fetal usando sequências específicas de iniciadores relativos a alelos X (cromossomo X) e Y (cromossomo Y) do gene da amelogenina. Todavia, em casos de fetos do sexo feminino com ausência de amplificação do gene *RHD*, é necessário utilizar outros marcadores.

Num trabalho pioneiro da professora Ellen Van der Shoot, na Holanda, foi desenvolvido a aplicação de marcadores de polimorfismos de inserção/deleção bialélica. Nesse estudo, eles utilizaram um painel composto de 10 marcadores de polimorfismos bialélicos de inserção-deleção, onde reportaram que, dentre 23 amostras testadas contra esse painel de marcadores, 5 (21,7%) tiveram resultados inconclusivos (PAGE-CHRISTIAENS et al., 2006). Outro estudo, realizado por Dovc-Drnovsek e colaboradores, utilizou um painel de 8 marcadores bialélicos de inserção/deleção, demonstrou que em 5 (26,3%) das 19 amostras testadas, não foi possível confirmar a presença do DNA fetal livre (DOVC-DRNOVSEK et al., 2013).

Alternativamente, um marcador epigenético foi descrito por Allen Chan e colaboradores (2006), que demonstraram que o promotor do gene supressor de tumor, *RASSF1A*, é hipermetilado na placenta e hipometilado em células sanguíneas maternas. Desta forma, eles removeram as sequências maternas hipometiladas do gene *RASSF1A* após digestão com enzima de restrição sensível à metilação, revelando as sequências hipermetiladas de *RASSF1A*, derivadas da placenta (fetal), as quais são resistentes ao tratamento com tais enzimas e, assim, puderam detectá-las e quantificá-las por PCR em tempo real. No referido estudo, sequências hipermetiladas do gene *RASSF1A* foram detectadas no plasma de 71 gestantes. O genótipo do gene *RASSF1A* no plasma após digestão com enzima foi idêntico ao genótipo fetal em cada caso, confirmando, desta forma, a origem do DNA fetal. No estudo, o controle de DNA fetal, *RASSF1A* não foi detectado em 4 (21,05%) de 19 amostras testadas (CHAN et al., 2006).

Recentemente, White e colaboradores reportaram um novo protocolo para detecção do marcador fetal *RASSF1A*. Nesse protocolo, a amostra de DNA extraído do plasma materno é testada em 3 reações (controle não digerido, metilação sensível à digestão e metilação insensível à digestão) e envolve um período de digestão mais rápido. No referido estudo, insuficiente quantidade de DNA fetal livre foi encontrada em 11 (12%) amostras, das quais, 10 tinham idade gestacional abaixo de 7 semanas (WHITE et al., 2012).

Face ao exposto, percebe-se que para desenvolver um sistema positivo de controle para a detecção de DNA fetal, variações genéticas que diferem entre mãe e feto podem ser utilizadas. Procedimentos que explorem tais variações, portanto, irão exigir o uso de múltiplos marcadores para assegurar que, pelo menos um será informativo, aumentando, desta forma, a complexidade da análise (CHAN et al., 2006). Todavia, esse sistema pode demandar bastante tempo, pode ser trabalhoso e aumenta o custo do teste. Além disso, a análise das falhas na detecção de DNA fetal demonstra uma taxa de cerca de 20%, o que pode impedir o uso de tais marcadores na rotina de genotipagem *RHD* fetal (WHITE et al., 2012).

Na prática clínica, no entanto, marcadores para identificação de DNA de origem fetal não têm sido amplamente utilizados. A maioria dos estudos utilizam o gene *SRY* ou *DYS14* como marcador da presença de DNA fetal livre, conforme demonstra a tabela 3 abaixo. Entretanto, esse marcador é insuficiente no caso de fetos *RHD* negativos, do sexo feminino.

Tabela 3- Marcadores utilizados em estudos de genotipagem RHD fetal

Autor (es)	Ano	País	Uso de marcadores para a presença de DNA fetal livre
Finning et al.	2002	Reino Unido	<i>SRY</i>
Costa et al.	2002	França	Nenhum
Gautier, et al.	2004	França	Nenhum
Brojer et al.	2005	Polônia	<i>SRY</i>
Minon et al.	2008	Bélgica	<i>SRY</i>
Müller et al.	2008	Alemanha	Nenhum
Sesarini et al.	2009	Argentina	<i>DYS14</i>
Chinen et al.	2010	Brasil	Nenhum
Amaral, et al.	2011	Brasil	<i>SRY</i>

Akolekar et al.	2011	Reino Unido	Nenhum
Schefffer et al.	2011	Holanda	SRY, 24 indel
Dovc-Drnovsek, et al.	2013	Slovenia	SRY, 8 indel
Aykut et al.	2013	Turquia	SRY
Dauber and Mayr	2013	Austria	34 Indel, STR
Schmidt et al.	2014	Brasil	SRY

1.12 Acurácia, sensibilidade e especificidade da genotipagem *RHD* fetal

A acurácia da genotipagem *RHD* fetal no plasma materno é medida pela comparação entre o genótipo *RHD* fetal predito e o resultado sorológico da análise de sangue do cordão umbilical do recém-nascido ou por PCR utilizando DNA extraído do líquido amniótico. A acurácia do diagnóstico não-invasivo tem sido reportada por estar entre 94,8% a 100% (SZCZEPURA et al., 2011). Todavia, alguns fatores podem alterar esse valor, como a idade gestacional, a presença de alelos *RHD* variantes, que ocorre em frequências diferentes entre as populações étnicas, o tempo de armazenamento da amostra materna antes da separação do plasma materno, a metodologia de extração de DNA utilizada, os iniciadores e sondas utilizadas na PCR, etc (SCHMIDT et al., 2011).

O tempo de armazenamento da amostra materna antes do processamento do plasma é também um fator determinante para a sensibilidade e especificidade do teste. O atraso na separação do plasma da camada de leucócitos materna pode levar à ruptura de células maternas e contaminação do plasma com DNA materno. Sendo assim, o DNA plasmático não deverá exceder 125 ng/mL. Se isso acontecer, indica que as células maternas foram lisadas e a eficácia do teste pode estar comprometida. A etapa de extração do DNA fetal é fundamental para a sensibilidade do teste de genotipagem no plasma materno, pois ausência de DNA fetal pode levar a resultados falso-negativos (WHITE et al., 2012).

A acurácia do teste de genotipagem *RHD* fetal é conhecida por diminuir em idade gestacional precoce (COSTA et al, 2002; CHAN et al., 2003).

Em alguns estudos realizados entre 2002 e 2014, a acurácia dos testes de genotipagem *RHD* fetal variou de cerca de 80% a 100%, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4- Comparação da acurácia (concordância entre a genotipagem RHD fetal no plasma materno com o fenótipo RhD do recém-nascido), número de amostras testadas e exons do gene RHD analisados entre alguns estudos de 2002 a 2014.

Referência bibliográfica	Nº de amostras testadas	Regiões do gene <i>RHD</i> analisadas	Concordância entre a genotipagem <i>RHD</i> fetal e fenótipo RhD do recém-nascido
Costa et al., 2002	106	Não informado	100%
Finning et al., 2002	137	Exons 4, 5, 6	100%
Brojer et al., 2005	255	Exons 7, 10 e intron 4	100%
Lan Zhou et al., 2005	98	Exons 4, 5, 10	94%
Machado et al., 2006	81	Exon 10, intron 4	97,3%
Minon et al., 2008	563	Exons 4, 5, 10	100%
Müller et al., 2008	1113	Exons 5, 7	99,5%
Sesarini et al., 2009	109	Exon 7	86,7%
Chinen et al., 2010	102	Exon 7	98%
Amaral, et al., 2011	88	Exons 4, 5 e 10	100%
Akolekar et al., 2011	591	Exons 5, 7	98,8%

Dovc-Drnovsek, et al., 2013	153	Intron 4, exons 5, 7 e 10	100%
Aykut et al., 2013	30	Exons 7 e 10	100%
Schmidt al., 2014	55	Exons 5 e 7	100%

É importante ainda lembrar que os métodos sorológicos de fenotipagem RhD ao nascimento da criança também podem falhar (SCHMIDT et al., 2014). Após realizar estudo com 563 gestantes, amplificando segmentos dos exons 4, 5 e 10, Minon e colaboradores, obtiveram 100% (99,8% incluindo um incomum falso-positivo) de concordância entre a genotipagem e a fenotipagem do recém-nascido ao nascimento. Todavia, houve quatro resultados discrepantes com o fenótipo do sangue coletado do cordão umbilical, dos quais três se mostraram concordantes mais tarde, quando o sangue venoso ou células bucais da criança foram utilizados. O outro resultado discordante foi um caso incomum de falso-positivo na genotipagem, devido a um transplante de fígado de doador RhD positivo (MINON et al,2008).

Os estudos acima, bem como o realizado por Müller e colaboradores (MÜLLER et al., 2008) demonstraram que a genotipagem *RHD* fetal pode trazer resultados mais acurados que o teste sorológico-natal, por minimizar erros humanos e ajudar na detecção de recém nascidos portadores de fenótipo D variante ou D fraco.

1.13 Benefícios e impacto da genotipagem RHD fetal no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo

Apesar de todos os avanços no acompanhamento de gestantes RhD negativo, a DHPN ainda é um problema para os serviços de saúde. Uma das causas da ocorrência de DHPN se deve principalmente à falta de atenção aos protocolos da imunoprofilaxia RhD e à espontânea e indetectada hemorragia feto-materna durante o terceiro trimestre de gravidez (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BR).

A Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetria (FEBRASGO), preconiza que toda gestante RhD negativo não aloimunizada receba a imunoprofilaxia anti-D entre a 28ª e 34ª semana de gestação e no máximo 72 horas pós-parto. Entretanto, a administração da imunoprofilaxia RhD antenatal não é realizada rotineiramente no Brasil, em parte, por acreditar-se que grande parte das

gestantes RhD negativo estarão portando fetos RhD negativo e, portanto, estariam recebendo a vacina desnecessariamente. Além disso, a vacina tem custo elevado, o que diminui as chances de acesso a essa profilaxia por gestantes de baixa condição sócio-econômica.

Por outro lado, em países, onde a imunoprofilaxia anti-D antenatal é aplicada de rotina, mais de 40% das gestantes RhD negativo recebem a antiglobulina anti-D desnecessariamente, uma vez que seus fetos são RhD negativo (MARTINE et al., 2006). Por isso, tem sido avaliado, nesses países, o custo-benefício da genotipagem fetal, em gestantes não-sensibilizadas, como um teste preditivo para a não administração da profilaxia antenatal em fetos RhD negativos. O estudo realizado por Szczepura e colaboradores demonstrou que a genotipagem *RHD* fetal não-invasiva como um teste determinante para a decisão de se administrar ou não a profilaxia antenatal, não apresenta um custo-benefício suficiente para garantir sua introdução em larga escala na Inglaterra e País de Gales. Segundo o estudo, a redução do custo é muito inexpressiva, enquanto que o risco do aumento da taxa de sensibilização materna é inaceitavelmente alto (SCZEPURA et al., 2011).

Há que se considerar ainda, que o custo envolvendo o acompanhamento de gestantes RhD negativo é relativamente alto, devido à necessidade de realização de muitos testes laboratoriais e de intervenções médicas constantes. O Ministério da Saúde preconiza que gestantes RhD negativo com coombs indireto positivo sejam incluídas em programas de acompanhamento a gestantes de alto risco, aumentando o custo do acompanhamento pré-natal. Entretanto, sabe-se que cerca de 40% de gestantes RhD negativo estarão gestando um feto RhD negativo e, por isso, a inclusão dessas gestantes em programas de acompanhamento a gestantes de alto risco é desnecessária (SCHMIDT et al., 2011). Por outro lado, para 60% delas, o intensivo e precoce acompanhamento é extremamente necessário.

Nesse contexto, a genotipagem fetal *RHD* pode causar um grande impacto no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo, sobretudo àquelas acompanhadas na rede pública de saúde. Caso o feto não seja portador do gene *RHD*, nenhum procedimento adicional será necessário e a gestante, mesmo que sensibilizada com anticorpos anti-D, poderá ser acompanhada como uma gestante comum e não mais de alto risco, reduzindo bastante o nível de estresse da gestante e dos familiares, assim como o custo do acompanhamento. Em contrapartida, caso o feto seja portador do gene *RHD*, a genotipagem fetal constitui fonte de diagnóstico precoce de risco de DHPN, permitindo que todos os recursos necessários à segurança da gestante e do feto sejam adotados prontamente. Além disso, permitirá a correta

administração da profilaxia antenatal, reduzindo ainda mais a chance de sensibilização materna.

2.Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o impacto do uso da genotipagem *RHD* fetal não-invasiva como ferramenta não-invasiva no acompanhamento de gestantes RhD negativo.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Verificar o desempenho do teste de genotipagem *RHD* não-invasivo em prever corretamente o fenótipo RhD fetal.

2.2.2 Verificar o percentual de mulheres RhD negativo aloimunizadas que poderiam ser consideradas gestantes sem risco por determinação do genótipo fetal como *RHD* negativo, de modo que não precisariam ser acompanhadas por serviço especializado (Serviço Terciário de Saúde).

2.2.3 Analisar se o teste de genotipagem *RHD* fetal não-invasivo poderá ser usado como ferramenta para definir o uso racional da profilaxia anti-D em gestantes RhD negativo não-sensibilizadas e para reduzir o custo do acompanhamento de gestantes sensibilizadas por anti-D.

3. Material e Métodos

3.1 População de estudo

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Hemominas e da UFMG, sob o parecer N^o ETIC CAAE - 0012.0.215.410-10. Todas as gestantes participantes do estudo foram convidadas a participarem do estudo e a assinaram o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE).

Após a aprovação do projeto nos Comitês de Ética da UFMG e da Fundação Hemominas, foi iniciada a coleta das amostras no ambulatório de pré-natal Geni Faria, do Hospital das Clínicas, da UFMG.

Inicialmente, coletou-se amostras de 55 gestantes RhD negativo atendidas no ambulatório de alto risco do Hospital das Clínicas, UFMG, para padronização do melhor kit de purificação do DNA fetal livre e padronização da PCR *RHD* não-invasiva. Após essa fase, foram coletadas amostras de 193 gestantes RhD negativo atendidas no Ambulatório de pré-natal do Hospital das Clínicas, UFMG, classificadas em dois grupos: (1) não-sensibilizadas (não aloimunizadas, sem produção de anticorpos antieritrocitários) ou (2) sensibilizadas (aloimunizadas, com produção de anticorpos antieritrocitários). No total, foram colhidas amostras de 248 gestantes RhD negativo.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados 02 tubos de sangue em EDTA, sendo um deles tubo separador de plasma. Cada tubo continha 6 mL de sangue total.

3.2 Fenotipagem RhD materna

Para a confirmação do grupo sanguíneo materno, foi realizada a fenotipagem RhD materna, pela metodologia gel teste. Para tal, foi utilizada a cartela ID-DiaClon ABO/D (BioRad) contendo 2 anti-D monoclonais, clones ESD1-M, 175-2 (DVI+) e LHM59/20 (LDM3), 175-2 (DVI-), conforme ilustrado na Figura 6.

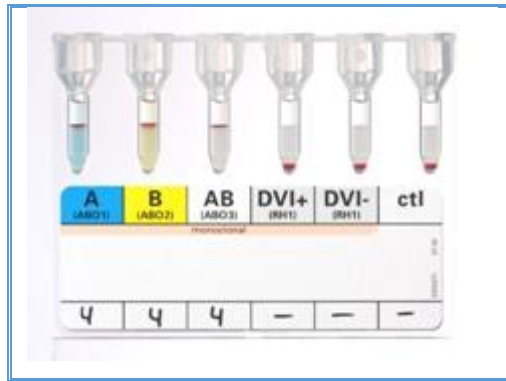


Figura 6: Figura representativa de uma fenotipagem RhD em cartela gel teste.

Fenotipagem RhD pela metodologia gel teste, utilizando a cartela ID-DiaClon ABO/D (BioRad) de uma amostra do grupo AB RhD negativo.

Foi realizada uma suspensão de hemácias a 5% em LISS (Solução de baixa força iônica). Adicionou-se 10 µL dessa suspensão em cada um dos microtubos da cartela ABO/RhD, contendo anti-A, anti-B, Anti-D (DVI+), anti-D (DVI-) e controle Rh. A cartela foi centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos e então foi realizada a leitura da aglutinação obtida. Para confirmação do fenótipo RhD negativo todas as amostras maternas foram submetidas à pesquisa de D fraco pela metodologia tubo, utilizando-se soro anti-D blend (IgG + IgM – clones MS26 + TH-28) (BioRad) e soro da antiglobulina humana poliespecífico (BioRad). A pesquisa de D fraco em tubo consistiu na realização de uma suspensão de hemácias a 5%, adicionando-se 25 µL de concentrado de hemácias em 500 µL de solução salina (NaCl 0,9%). Em um tubo de Khan adicionou-se 50 µL de soro anti-D e em seguida 50 µL da suspensão de hemácias teste a 5% em salina. Após homogeneização, incubou-se o tubo a 37°C por 15 minutos. A seguir o tubo foi lavado três vezes com solução salina para remover o anti-D não ligado às hemácias e foi feita a adição do soro da antiglobulina humana (soro de coombs) para promover a aglutinação, caso tenha havido a ligação antígeno-anticorpo. Em paralelo, realizou-se a mesma reação utilizando-se soro controle Rh do mesmo fabricante do soro anti-D, para validar a pesquisa de D fraco. A reação foi considerada positiva se houve aglutinação no tubo contendo anti-D e ausência de aglutinação no tubo contendo soro controle Rh e negativa, se houve ausência de aglutinação em ambos os tubos.

Foi também realizada a tipagem CDE em tubo, utilizando o soro anti-CDE (Lorne), para verificar a presença dos antígenos C e E do sistema Rh. Para tal, foi pipetado em um tubo de Khan, 50 µL do soro anti-CDE. A seguir, foi pipetado 50 µL da suspensão de hemácias a 5% preparada para a pesquisa de D fraco descrita acima.

O tubo foi homogeneizado e incubado a 37°C por 15 minutos. Após a incubação foi realizada a leitura da aglutinação sob fundo iluminado.

Amostras CDE positivas foram testadas para a presença de D fraco também pela metodologia gel teste. Foi utilizado, para cada teste, 50 µL do soro anti-D monoclonal IgG, clone ESD1 (BioRad), o qual foi pipetado numa cartela gel teste contendo soro de AGH poliespecífico (anti-IgG+ anti-C3d), juntamente com uma suspensão a 1% da amostra da gestante, preparada em LISS. O teste foi incubado a 37°C por 15 minutos e a cartela foi, então, centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos.

3.3 Preparação das amostras

Imediatamente após a coleta de 10 mL de sangue materno, o tubo foi centrifugado a 2.500 x g por 10 minutos. O plasma materno foi separado do concentrado de hemácias e novamente centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi distribuído em tubos de 1,5 mL, em alíquotas de 400 µL e estocado a -80°C até o momento da purificação do DNA fetal. Foi separada uma alíquota de 1 mL da camada de leucócitos para purificação de DNA materno.

3.4 Purificação do DNA livre no plasma materno

A purificação do DNA fetal livre no plasma materno foi realizada utilizando-se três kits comerciais para a purificação do DNA fetal livre no plasma materno. Na primeira parte do estudo foi utilizado o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) para purificação do DNA plasmático de 25 amostras e o kit Nucleo Spin Plasma XS (Marchery Nagel, Alemanha) foi utilizado em 30 amostras. Na segunda parte do estudo, todas as amostras foram purificadas utilizando-se o kit comercial KIAamp DSP Vírus Spin (QIAGEN, Alemanha).

3.4.1 Purificação do DNA plasmático usando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

A purificação do DNA foi realizada conforme as recomendações do fabricante, conforme descrito a seguir. A uma amostra de 400 µL de plasma materno foi acrescentado 40 µL de Protease Qiagen e 400 µL do Tampão AL. O tubo foi homogeneizado em agitador, incubado à 56°C por 10 minutos e centrifugado

brevemente para remover as gotas na tampa do tubo. A seguir, foi adicionado 400 µL de etanol (96-100%) ao tubo, que foi homogeneizado por 15 segundos e centrifugado novamente para remover as gotas na tampa do tubo. O conteúdo do tubo foi adicionado à coluna de centrifugação contendo um tubo coletor de 2 mL, foi centrifugado a 11.000 x g por 5 minutos e foi descartado o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi depositada em novo tubo coletor e foram adicionados 500 µL do Tampão AW1 à coluna, que foi centrifugada como antes e o tubo coletor foi descartado. A coluna de centrifugação foi depositada em novo tubo coletor, foi adicionado 500 µL do Tampão AW2 e o tubo foi centrifugado a 15.000 x g por 3 minutos, descartando-se o tubo. A coluna de centrifugação foi colocada em um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 50 µL do Tampão AE. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 min. e centrifugou-se à 15.000 x g por 5 minutos. A amostra foi estocada à -20°C até o momento do uso.

3.4.2 Purificação do DNA plasmático usando o kit Nucleo Spin Plasma XS (Marchery Nagel)

A purificação do DNA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, conforme descrito a seguir. Uma amostra de 240 µL de plasma materno foi transferida para um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 20 µL de proteinase K. Agitou-se e incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se 360 µL do tampão BB. O tubo foi invertido três vezes, vortexado por três segundos e centrifugado brevemente para remover as gotas na tampa do tubo. O conteúdo do tubo foi adicionado à coluna de centrifugação contendo um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se a 2.000 x g por 1 minuto. Centrifugou-se novamente a 11.000 x g por 1 minuto e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e foram adicionados 500 µL do Tampão de lavagem WB. Centrifugou-se a 11.000 x g por 1 minuto. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e adicionaram-se 250 µL do Tampão de lavagem WB. Centrifugou-se a 11.000 x g por 3 minutos e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em um tubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 20 µL do tampão de eluição e centrifugou-se à 11.000 x g por 1 minuto. A amostra foi estocada à -20°C até o momento do uso.

3.4.3 Purificação do DNA plasmático usando o kit QIAamp DSP Vírus Spin (Qiagen)

Foi utilizado o kit comercial QIAamp DSP Virus Kit (Qiagen, Hilden, Germany) para a purificação do DNA fetal livre no plasma materno. A purificação do DNA foi feita conforme as recomendações do fabricante, conforme descrito a seguir. A uma amostra de 400 μ L de plasma materno acrescentou-se 25 μ L de Protease Qiagen e 200 μ L do Tampão AL (já contendo 5,6 μ L de RNA carreador). O tubo foi misturado em agitador e incubado à 56°C por 15 minutos. Centrifugou-se brevemente para remover as gotas na tampa do tubo e adicionou-se 250 μ L de etanol (96-100%). Agitou-se por 15 segundos e o tubo foi deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, centrifugou-se novamente o tubo para remover as gotas da tampa. O conteúdo do tubo foi adicionado à coluna de centrifugação contendo um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se à 6.000 x g por 2 minutos e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e foram adicionados 500 μ L do Tampão AW1 à coluna. Centrifugou-se como antes e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e adicionaram-se 500 μ L do Tampão AW2. Centrifugou-se a 6.000 x g por 2 minutos e descartou-se o tubo coletor. A coluna de centrifugação foi colocada em um tubo de 2 mL limpo e adicionou-se 500 μ L de etanol. O tubo foi centrifugado novamente, nas mesmas condições acima e a coluna de centrifugação foi colocada em novo tubo coletor e centrifugada a 20.000 x g por 3 minutos para secar completamente a membrana. O tubo coletor foi novamente trocado e a coluna foi incubada a 56°C por 3 minutos. Após essa incubação a coluna foi colocada em um tubo de 1,5 mL e foi adicionado 35 μ L do Tampão AE. Incubou-se à temperatura ambiente por 1 min. e centrifugou-se à 20.000 x g por 2 minutos. A amostra foi estocada à -20°C até o momento do uso.

3.4.4 Avaliação do kit KIAamp DSP Vírus Spin

Após definir pelo kit KIAamp DSP Vírus Spin (QIAGEN, Alemanha), testamos a amostra fornecida pelo Instituto Nacional para Padrões e Controles biológicos (NIBSC). O tipo de padrão utilizado foi o WHO International Standard or Reference Reagent, contendo plasma RhD positivo (sexo masculino) diluído em um excesso de plasma (sexo feminino) RhD negativo.

Após a amostra ter sido purificada, foi diluída a 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e foi submetida à PCR *RHD* fetal para os exons 5 e 7, da mesma forma que as amostras testadas no presente estudo.

3.5 Coleta de amostra da mucosa bucal do RN

Para fins de confirmação do fenótipo fetal, foi colhido, para uma amostra, material da mucosa bucal do RN. Para tal, foi utilizado um Swab, para escovar de 4 a 5 vezes, cada lado da mucosa bucal do RN. Após a coleta, o Swab foi deixado a temperatura ambiente por 50 minutos para secar e depois foi armazenado num tubo coletor de 1,5 mL. O tubo foi mantido sob refrigeração entre 2 a 8°C até o momento da extração, não ultrapassando 24 horas de armazenamento.

3.6 Purificação do DNA da mucosa bucal do RN

Para a purificação do DNA extraído da mucosa bucal do RN foi utilizado o kit QIAamp DSP Vírus Spin (Qiagen). O DNA foi colhido em um Swab, o qual foi depositado no tubo de 1,5 mL para a posterior purificação do DNA.

3.7 PCR em tempo real para o gene da Albumina humana

Para a confirmação da presença de DNA na amostra de DNA fetal obtida, todas as amostras foram submetidas a uma PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan para detecção do gene da albumina humana, em separado da genotipagem RHD fetal, mas utilizando a mesma amostra nas duas PCR. A reação foi feita em um sistema de PCR em tempo real (modelo 7300, Applied Biosystems, EUA), utilizando-se o kit TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados 200 nM dos iniciadores ALB-F (5' – GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA – 3') e ALB-R (5' – GGGCATGACAGGTTTTGCAATTGCAATATTA – 3'), 100 nM da sonda ALB-P marcada com FAM (5' - FAM-TTGTGGGCTGTAATCAT-MGB – 3') e 5 µL da amostra de DNA fetal, com um volume final de reação de 25 µL. Os ciclos de temperatura consistiram de uma fase inicial à 50°C por 2 minutos, e 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos à 95°C por 15 segundos e à 60°C por 1 minuto.

3.8 PCR em tempo real para o gene *RHD*

Para a determinação da presença do gene *RHD*, foi realizada uma PCR, em duplicata, em tempo real usando o sistema TaqMan para amplificação simultânea de regiões dos exons 5 e 7 do gene *RHD*, consistindo em um produto de 82pb e 75 pb, respectivamente, conforme descrito por Finning e colaboradores (FINNING et al.,

2002). As sequências dos iniciadores e sondas, suas concentrações e localizações estão descritas na tabela 5. A reação foi realizada em um sistema de PCR em tempo real (modelo 7300, Applied Biosystems, EUA) usando-se o kit TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 200 nM dos iniciadores EX5F e EX5R, 100 nM da sonda EX5P marcada com FAM para detecção do exon *RHD* 5, mais 200 nM dos iniciadores EX7F e EX7R e 100 nM da sonda EX7P marcada com VIC (tabela 5) para detecção do exon *RHD* 7, e 5 µL do DNA fetal, com um volume final da reação de 25 µL. Os ciclos de temperatura consistiram de uma fase inicial à 50°C por 2 minutos, e à 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos à 95°C por 15 segundos e à 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi testada em duplicata. Como controle positivo e negativo foram utilizadas amostras de DNA genômico de doadores de sangue com fenótipo RhD positivo e negativo, respectivamente, previamente genotipadas por PCR convencional, em uma concentração de 1 ng/ µL. Os resultados da PCR para *RHD* só foram considerados em amostras que apresentaram amplificação prévia do gene da albumina humana. Amostras com amplificação dos exons *RHD* com Ct superior a 42 foram consideradas negativas.

Tabela 5- Iniciadores e sondas para PCR em tempo real para detectar o gene *RHD*.

Exon	Iniciadores e sondas	Sequência (5' – 3')
<i>RHD</i> Exon 5	EX5F	636-CGCCCTCTTCTTGTGGAT <u>G</u> -654
	EX5R	717-GAACACGGCATTCTTCCTTTC-697
	EX5P	656-FAM-TCTGGCCAAGT <u>T</u> TCAACTCTGCTCGCT-MGB-681
<i>RHD</i> Exon 7	EX7F	972-CAGCTCCATCATGGGCTACAA-992
	EX7R	1046-AGCACCAGCAGCACAATGTAGA-1025
	EX7P	997-VIC-AGCTTGCTGGGTCTGCTTGGAGAGATC-MGB-1023

Bases em negrito: distinguem *RHD* de *RHCE*.

Bases duplamente sublinhadas: distinguem *RHD* de *RHD Ψ*

Fonte: Finning et al.,2002

3.9 Critérios de interpretação da genotipagem *RHD* fetal

Foi feita uma busca na literatura da descrição de alelos *RHD* variantes, para verificar se os polimorfismos encontrados nestes alelos coincidiam com as regiões de anelamento dos iniciadores e sondas dos exons 5 e 7 utilizados na amplificação do gene *RHD*, de modo que poderiam resultar na não amplificação da região gênica testada.

As tabelas 6 e 7 mostram os alelos *RHD* variantes que possuem mutações nas regiões de anelamento dos iniciadores e sondas utilizados nesse estudo, cujo fenótipo pode ser RhD positivo ou negativo.

Tabela 6- Alelos *RHD* variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX5F: 636-654; EX5R: 697-717) e sonda (EX5P: 656-681) usados na amplificação do exon 5 do gene *RHD*.

Nome	Alelo	Mutações
D fraco tipo 4*	<i>RHD</i> (T201R,F223V)	602C>G, 667T>G, 819G>A
D fraco tipo 4.1*	<i>RHD</i> (W16C,T201R,F223V)	648G>C, 602C>G, 667T>G, 819G>A
D fraco tipo 16	<i>RHD</i> (W220R)	658T>C
D fraco tipo 27*	<i>RHD</i> (P221S)	661C>T
D categoria Va-like (YH)*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-V245L)	667T>G, 744C>T
D categoria V tipo VII*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-G263R)-D	667T>G, 787G>A
DCS*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-A226P)-D	667T>G, 676G>C
DVa-associado (HK)	<i>RHD</i> (E233K)	697G>A

Nome	Alelo	Mutações
D categoria IIIa*	<i>RHD</i> (N152T,T201R,F223V)	455A>C, 602C>G, 667T>G
D categoria Va (Kou.)*	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-E233Q)-D	667T>G, 697G>C
D categoria Va (Hus.)*	<i>RHD-CE</i> (5)-D	667T>G, 800A>T
D categoria Va TO	<i>RHD-CE</i> (5:E233Q-V238M)-D	697 G>C, 712G>A
D categoria VI tipo IV	<i>RHD-CE</i> (2-5)-D	CDe
DHMii	<i>RHD-CE</i> (3-5)-D	cDE
D categoria VI tipo III	<i>RHD-CE</i> (3-6)-D	CDe
D categoria VI tipo I	<i>RHD-CE</i> (4-5)-D	cDE
D categoria VI tipo II	<i>RHD-CE</i> (4-6)-D	CDe
DCS	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-A226P)-D	
D categoria Va (Kou.)	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-E233Q)-D	
D categoria Va TO	<i>RHD-CE</i> (5:E233Q-V238M)-D	
D categoria Va-like (YH)	<i>RHD-CE</i> (5:F223V-V245L)-D	
D categoria Va (Hus.)	<i>RHD-CE</i> (5)-D	
R ₀ ^{Har}	<i>RHCE-D</i> (5)-CE	cDe

Nome	Alelo	Mutações
<i>RHD</i> pseudogene		Duplicação de 37 pb na junção intron3 / exon 4 múltiplas mutações com sentido, códon de terminação no exon 6
<i>RHD</i> (exon 5 variant)		Códon de terminação prematuro

Fonte: <http://rhesusbase.atspace.com>

Tabela 7- Alelos RHD variantes com mutações localizadas em regiões de anelamento dos iniciadores (EX7F: 972-992, EX7R: 1025-1046) e sonda (EX7P: 997-1023) usados na amplificação do exon 7 do gene RHD.

Fenótipo RhD fraco ou parcial			
Nome	Alelo	Mutações	Tipo
D fraco tipo 7	<i>RHD</i> (G339E)	1016G>A	D fraco
D fraco tipo 24	<i>RHD</i> (L338P)	1013T>C	
D fraco tipo 30	<i>RHD</i> (E340M)	1018G>A, 1019A>T	
D categoria IV tipo III	<i>RHD-CE</i> (6-9)- <i>D</i>		Alelos híbridos
D categoria IVb (J)	<i>RHD-CE</i> (7-9)- <i>D</i>		
Fenótipo RhD negativo			
Grande híbrido	<i>RHD</i> (1-6)- <i>CE</i> (7-10)		Alelo híbrido

Fonte: <http://rhesusbase.atspace.com>

Diante disso, se uma amostra de DNA fetal (em duplicata) apresentou amplificação de apenas um exon do gene *RHD*, o resultado foi considerado inconclusivo, pois a ausência de amplificação de um dos exons pode ser devido a diferentes polimorfismos encontrados em alelos *RHD* variantes, cujo fenótipo pode ser tanto RhD positivo (fraco ou parcial) ou RhD negativo, não sendo possível inferir qual dos dois tipos. Se, no entanto, uma amostra apresentar amplificação de um exon na duplicata e do outro exon, em apenas uma replicata, o resultado foi considerado positivo.

Em resumo, o critério de interpretação da genotipagem *RHD* fetal é mostrado na figura abaixo:

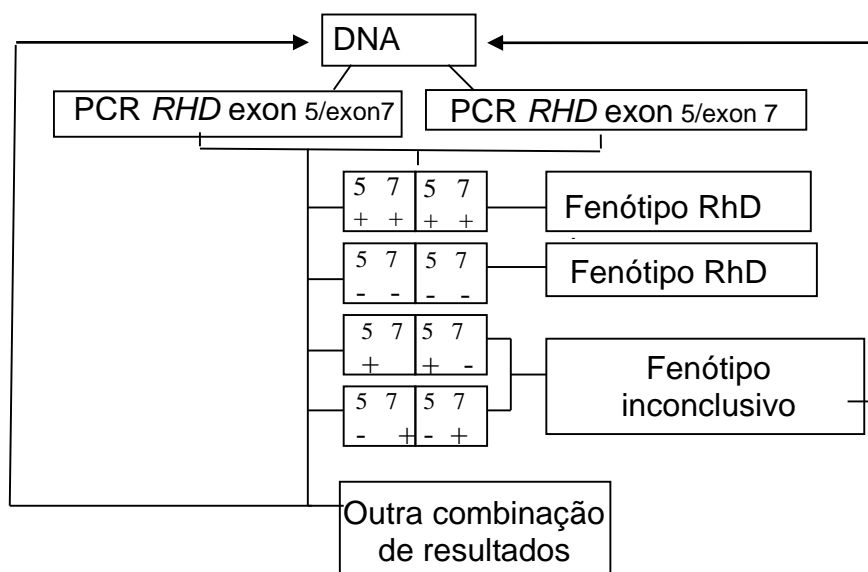


Figura 7 - Critérios de interpretação dos resultados da genotipagem RHD fetal

Se a amostra testada em duplicata apresentar amplificação dos exons 5 e 7 do gene *RHD*, o fenótipo será considerado RhD positivo. Se não houver amplificação em ambos os exons na duplicata, o fenótipo RhD será considerado negativo. Caso ocorra amplificação em apenas um exon, o resultado será considerado inconclusivo.

3.10 Avaliação do limite mínimo de detecção da PCR para o gene RHD

Foi avaliado o limite mínimo de detecção do gene *RHD* na PCR em tempo real. Para tal, foi feita uma diluição em série (10 X) do DNA obtido a partir de sangue total de uma amostra com fenótipo RhD positivo. As quantidades de DNA avaliadas na PCR

foram de 40 ng a 4 pg de DNA, equivalente ao DNA genômico de 6.500 células a 0,65 células, considerando-se que uma célula eucariótica possui 6,16 pg de DNA.

3.11 Fluxograma do experimento.

A metodologia deste estudo seguiu o fluxograma geral delineado abaixo, conforme Figura 8.

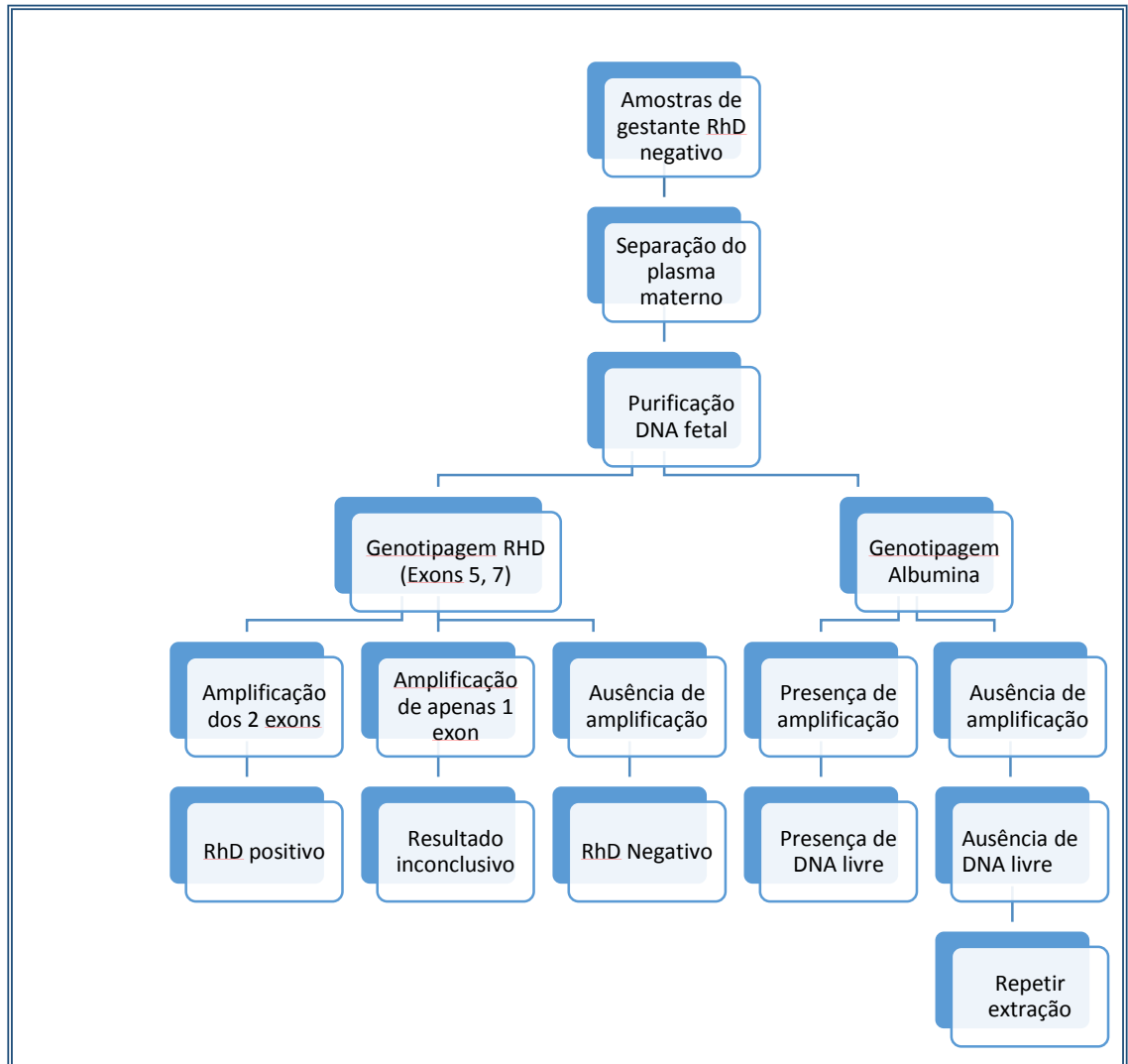


Figura 8 - Fluxograma geral da metodologia do estudo

O plasma materno foi obtido mediante centrifugação da amostra materna. O DNA fetal livre foi extraído a partir do plasma materno e submetido a reações de PCR em tempo real para detecção dos genes da albumina humana e *RHD* (exons 5 e 7). Amostras que tiveram amplificação dos dois exons foram consideradas RhD positivo. Amostras que amplificaram em apenas um dos exons tiveram o

resultado inconclusivo. Amostras que não apresentaram amplificação de nenhum dos dois exons, foram consideradas *RHD* negativas.

3.12 Cálculo do custo do teste de genotipagem *RHD* fetal

Para o cálculo do custo do teste de genotipagem *RHD* fetal não-invasiva, considerando-se que os testes seriam realizados em um único laboratório de referência, foi realizada a estimativa do número de gestantes RhD negativo que seriam atendidas no período de ano.

Foi realizada ainda, a estimativa do custo mensal com recursos humanos, com material de consumo, com serviços, com imóvel, com a depreciação de equipamentos e mobiliário. Esse valor foi dividido pela média entre a demanda máxima estimada de 75% e a mínima de 30%.

Após essa etapa, calculou-se o custo da genotipagem *RHD* fetal automatizada. Esse custo foi, então, somado ao valor do custo mensal por amostra.

3.12.1 Demanda de genotipagens *RHD* no Estado de Minas Gerais

Com o objetivo de calcular a estimativa do número de genotipagens *RHD* fetais a serem realizadas e, portanto, a estimativa da demanda máxima e mínima do laboratório, foi feita uma busca no site do DATASUS e calculada a média do período de 10 anos (2001 a 2011).

Como não havia informação sobre o número de gestações ocorridas por ano, para estimá-la, foi realizado o cálculo da média de nascidos vivos entre 2001 e 2011, acrescida da média de óbitos fetais nesse mesmo período, no estado de Minas Gerais. Calculamos a demanda anual de gestantes RhD negativo no estado, a partir da média do fenótipo RhD negativo obtido de estudos realizados no Brasil (NOVARETTI, 1995; MOREIRA et al., 1996; BAIOCHI et al., 2007), que foi de 10%.

3.12.2 Cálculo dos Recursos Humanos necessários

Para o cálculo dos recursos humanos necessários foi estimado quais seriam os profissionais necessários, bem como a carga horária diária necessária para a realização de todas as etapas do processo, descritas na figura 9.

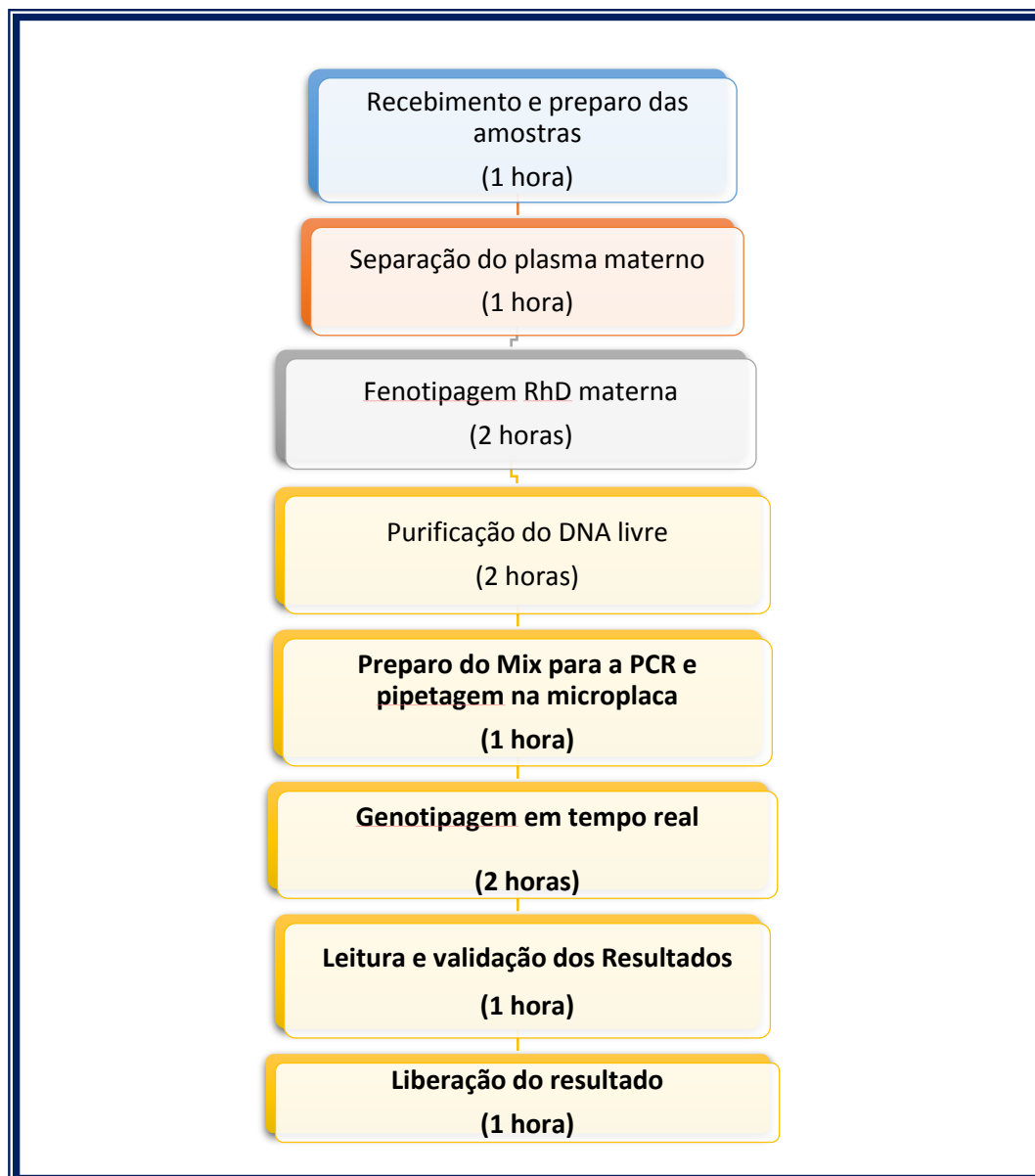


Figura 9 - Fluxograma do processo de Genotipagem RHD não-invasiva

Após a amostra ser recebida e preparada para os testes, é realizada a fenotipagem RhD fetal para se certificar que a gestante é de fato RhD negativa. Após confirmado o fenótipo negativo, o plasma materno é separado e o DNA livre é purificado. Prepara-se, então o mix, pipeta-se o mix e a amostra na microplaca e inicia-se a genotipagem em tempo real. Após o término da genotipagem, analisa-se os resultados, valida-os e libera-se o resultado.

O salário dos profissionais foi calculado a partir da informação sobre a remuneração, em Minas Gerais, no ano de 2011, no setor público e privado. Foi considerado como valor base a média entre os valores máximos e mínimos. Foi ainda calculado os encargos trabalhistas gerados, em cumprimento da lei CLT.

A partir da demanda estimada de 75% do atendimento a gestantes RhD negativo do Estado de Minas Gerais e do fluxograma do processo abaixo, foi estimado o número de amostras a serem processadas diariamente. A partir desse dado, estimou-se o tempo de funcionamento do laboratório, considerando uma rotina automatizada, bem como, quais e quantos seriam os profissionais necessários para compor a equipe do laboratório.

3.12.3 Cálculo do Material de Consumo

Para fins de cálculo de despesas mensais com material de consumo foi estimado o custo com serviços gerais, materiais de higiene e limpeza e material de escritório.

Para o cálculo do custo mensal com serviços gerais, foi pesquisado o valor do salário pago a um Auxiliar de Limpeza da empresa MGS (Minas Gerais Administração e Serviços S.A.), acrescido dos encargos trabalhistas.

Para cálculo do material de consumo com limpeza e material de escritório, considerou-se 15% do valor mensal pago para a contratação do Auxiliar de Limpeza.

Para a estimativa do gasto com materiais de consumo, levou-se em conta o gasto previsto com serviços gerais, material de limpeza e de escritório.

3.12.4 Cálculo do Custo com Serviços

Para o cálculo de Serviços (energia elétrica), foi considerado o consumo de cada equipamento utilizado no processo e o tempo de utilização mensal. A partir dessas informações foi feita uma simulação do custo de cada equipamento no site do CEE (Companhia Estadual de Energia Elétrica do Rio Grande do Sul).

Para o cálculo do custo com a água, foi considerado o consumo diário de 17 litros por pessoa e 10 litros para serviços de limpeza, conforme tabela 8, que foi elaborada a partir de dados publicados pela Unidade Acadêmica de Engenharia Civil da Universidade de Campina Grande/Brasil. A partir deste consumo estimado, foi realizada uma simulação no site da Copasa, para um imóvel comercial.

Tabela 8 - Estimativa do consumo mensal

Atividade	Consumo diário (Litros)
Bebida	02
Abluções diárias	05
Aparelhos sanitários	10
Total por pessoa	17
Total para 7 pessoas	119
Limpeza	9
Total diário	128
Total mensal	2.560

Fonte: <http://www.dec.ufcg.edu.br/saneamento/A5.html>

Para o cálculo do custo com internet e telefonia, foi utilizada a estimativa da União Internacional de Telecomunicações, considerando um consumo de 132 minutos de telefone por mês e uma taxa de 4,14% do salário mínimo para a internet banda larga.

3.12.5 Cálculo do custo com Imóvel

Os custos relativos ao imóvel foram valorados com base no custo do m² construído no ano de 2012 no Estado de Minas Gerais, bem como no valor estimado para locação (0,5% a 0,7% do valor total do imóvel), divulgados pelo Conselho Regional de Corretores de Imóveis de Minas Gerais (CRECIMG). Foi considerado para fins de cálculo, um laboratório com 100 m² na região Centro-Sul de Belo Horizonte.

3.12.6 Cálculo do valor gasto com manutenção e depreciação de mobiliário e equipamentos

3.12.6.1 Manutenção, calibração e qualificação térmica

Para o cálculo do valor gasto com manutenção de equipamentos foi feita uma cotação no mercado para a contratação de manutenção preventiva/corretiva e calibração dos equipamentos necessários, bem como qualificação térmica dos freezers e geladeiras.

3.12.6.2 Depreciação de equipamentos e mobiliário

Para o cálculo da depreciação anual de equipamentos e mobiliário, foi considerado como base, as Instruções Normativas SRF n.ºs. 162/98 e 130/99, que preconizam uma depreciação anual de 10% para equipamentos e mobiliários de laboratório. A partir deste valor, foi feito o cálculo da depreciação mensal dos itens.

3.12.7 Estimativa do custo de Insumos e reagentes por teste de genotipagem fetal não-invasiva

Foi realizado o levantamento dos insumos e reagentes necessários para a realização da genotipagem *RHD* fetal não-invasiva automatizada, devido à alta demanda de testes previstos. O custo com os equipamentos, sob comodato, bem como seus consumíveis, já está inserido dentro do custo do kit de purificação de DNA. Os equipamentos em comodato realizariam a purificação do DNA, o preparo do mix da PCR e a pipetagem das amostras e do mix nas microplacas.

Considerou-se, ainda, insumos para os testes manuais, para os casos de repetições isoladas.

3.12.8 Estimativa do custo mensal de um laboratório de genotipagem RHD fetal

A partir do cálculo da demanda de testes, dos recursos gastos com Recursos humanos, com material de consumo, com serviços, com o imóvel, com os equipamentos e mobiliário, foi elaborada uma tabela contendo a estimativa de custo mensal do laboratório.

3.12.9 Cálculo do custo do teste de Genotipagem RHD fetal não-invasiva automatizada

O cálculo do teste de genotipagem RHD fetal não-invasiva foi realizado, considerando-se a demanda máxima de 1.678 testes (75% da demanda) e a demanda mínima de 671 testes (30%). A partir desses dados será calculada a capacidade média de atendimento do laboratório.

Para fins de cálculo do custo do teste, será dividido o valor estimado do custo mensal de um laboratório de genotipagem RHD fetal não-invasiva, pela demanda média prevista. Esse valor será acrescido ao valor do material de consumo necessário por teste.

3.13 Avaliação do custo do Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo

O custo do Protocolo de atendimento terá como base, o protocolo de Atendimento a gestantes de Alto risco do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (PEREIRA et al., 2012). O Custo dos procedimentos será estimado a partir dos valores da tabela da Associação Médica Brasileira AMB92. Será adotado o valor do CH (Coeficiente de honorários médicos) de R\$1,212. O custo dos testes laboratoriais será calculado com base na tabela CBHPM (Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos).

O período inicial de acompanhamento adotado será a idade gestacional mínima das gestantes participantes do presente estudo. Para gestantes não-sensibilizadas a idade gestacional máxima estimada para o acompanhamento é de 40 semanas e para gestantes sensibilizadas, de 37 semanas, conforme PEREIRA ET AL., 2012. Para o cálculo do custo do Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo, foram considerados 4 cenários. Para ambos, a estimativa do número de testes a serem realizados no pré-natal foi baseada na idade gestacional mínima e máxima encontrada para gestantes participantes do presente estudo.

O cenário 1 consiste do Protocolo atualmente utilizado na rede pública, para acompanhamento de gestantes RhD negativo não-sensibilizadas, conforme orientação do Ministério da Saúde no Caderno de Atenção Básica – Atenção ao Pré Natal de Baixo Risco (MS, Série A. Normas e Manuais Técnicos Cadernos de Atenção Básica, nº 32 – 2012) .

O cenário 2 foi calculado, considerando que o teste de genotipagem *RHD* fetal seria realizado, na rotina de pré-natal de gestantes RhD negativo, não-sensibilizadas.

O cenário 3 consiste no Protocolo atualmente utilizado no CEMEF (UFMG), para acompanhamento de gestantes RhD negativo sensibilizadas.

O cenário 4 foi calculado, considerando que o teste de genotipagem *RHD* fetal seria realizado, na rotina de pré-natal de gestantes RhD negativo sensibilizadas.

Considerando-se que há o risco do teste de genotipagem *RHD* fetal apresentar um resultado falso negativo, devido à baixa quantidade de DNA fetal livre

no primeiro trimestre de gestação, será considerado, para fins de cálculo deste cenário, que em casos de fenótipo inferido RhD negativo, o teste será repetido no segundo trimestre de gestação, onde a quantidade de DNA fetal livre é maior. Considerando-se ainda que nesse cenário há duas possibilidades (feto RhD positivo e feto RhD negativo), será calculado o custo de cada possibilidade.

O custo da imunoprofilaxia anti-D adotado foi o custo da vacina KaMRhoD (300 mg/mL), disponível no mercado em ampolas de 2 mL.

Cada um desses cenários foi considerado no Protocolo para Atendimento de Gestantes sensibilizadas e não-sensibilizadas.

3.13.1 Avaliação do custo do Protocolo para atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas

Serão consideradas gestantes não-sensibilizadas, aquelas gestantes que não desenvolveram o anti-D nem antes nem durante a gestação e que, portanto, têm o resultado do teste de Coombs Indireto negativo durante todo o período gestacional.

3.13.1.1 Cenário 1: Assistência Pré-natal vigente à gestante RhD negativo, não sensibilizada

No cenário 1, para gestantes não-sensibilizadas, são realizadas consultas mensais em Unidades Básicas de Saúde (UBS). O teste de Coombs Indireto é realizado na primeira consulta ou primeiro trimestre, no segundo semestre e a cada 4 semanas a partir da 24ª semana de gestação. Para o cálculo do custo do cenário 1, serão estimados o número e o custo dos testes realizados no pré natal habitual, conforme demonstrado na figura 10.

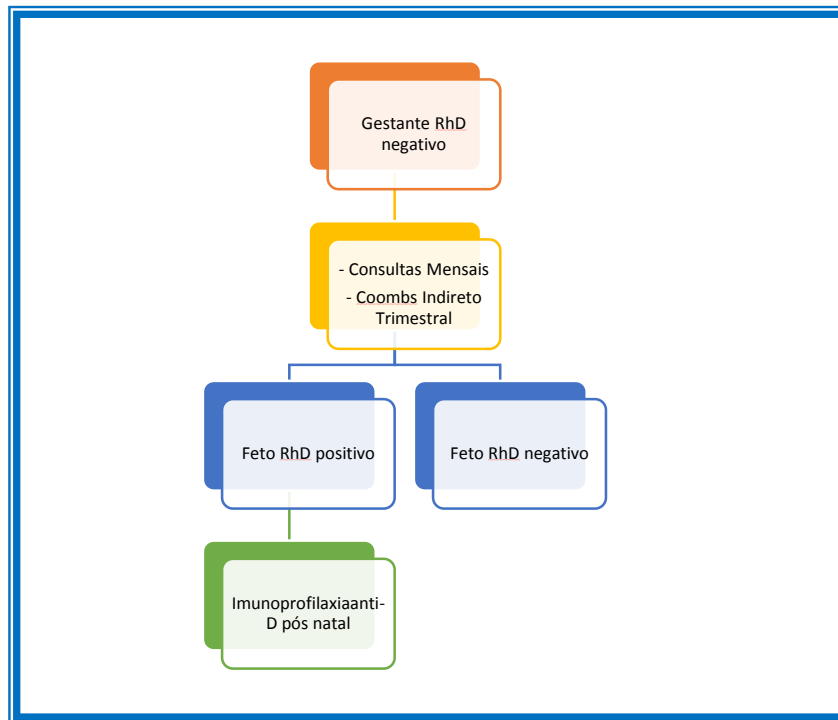


Figura 10 - Protocolo atualmente realizado no Atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas no Cenário 1

No cenário 1, após confirmado que a gestante não é sensibilizada, pelo teste de Coombs Indireto, serão necessárias apenas consultas mensais numa Unidade Básica de Saúde e testes de Coombs Indireto trimestrais. Caso o feto seja RhD positivo ao nascimento, será aplicada a imunoprofilaxia anti-D pós natal.

3.13.1.2 Cenário 2: Introdução da Genotipagem RHD fetal na Assistência Pré-natal de gestantes RhD negativo, não-sensibilizada

No cenário 2, seria realizada a genotipagem *RHD* fetal para todas as gestantes RhD negativo e seria seguido o fluxo descrito abaixo.

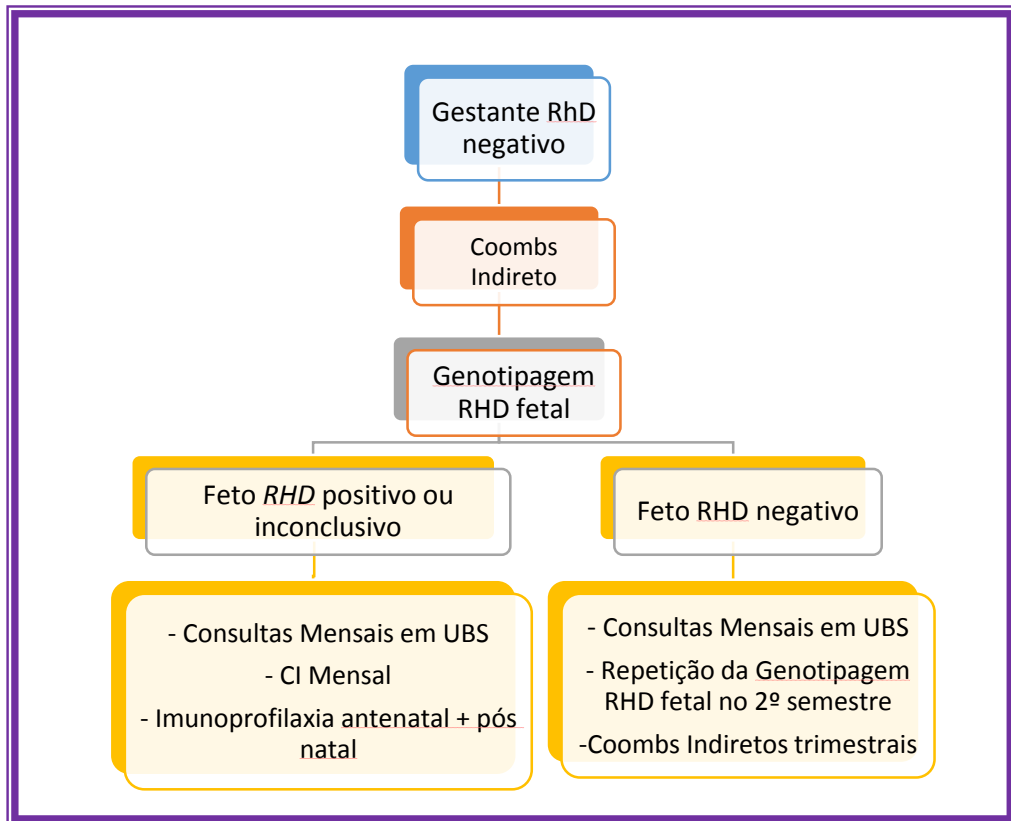


Figura 11 – Proposta de Protocolo para Atendimento a gestante não-sensibilizada no Cenário 2

No cenário 2, toda gestante RhD negativo faria o teste de coombs indireto, para confirmar que não está sensibilizada. A seguir, faria a Genotipagem *RHD* fetal e, caso o fenótipo inferido do feto fosse RhD negativo, a gestante faria apenas consultas mensais e, coombs indireto trimestrais. Caso o fenótipo inferido do feto fosse RhD positivo ou inconclusivo, seriam necessárias consultas e teste de coombs indireto mensais e receberia a imunoprofilaxia anti-D antenatal e pós natal.

3.13.2 Avaliação do custo do Protocolo de atendimento a gestantes sensibilizadas

Serão consideradas nesse estudo gestantes sensibilizadas para o anti-D. As consultas consideradas para gestantes sensibilizadas são consideradas consultas especiais, pois são realizadas num Serviço de Atendimento Terciário (Alto Risco).

Para o cálculo deste protocolo, não foi considerado o custo com transfusão intrauterina, pois, segundo VILLASHI, 2012, em estudo realizado no Hospital das Clínicas da UFMG, no período de 2005 a 2011, a frequência de fetos de mães

aloimunizadas que necessitaram desses procedimentos está em torno de 41,3%. Portanto, esse procedimento será considerado na Avaliação do Impacto do Protocolo mais à frente.

Para gestantes com fetos de alto risco, o número de ICF e PVS estimado foi de 13, considerando que de 15 a 28 semanas de gestação são realizados quinzenalmente e a partir da 28ª semana, são realizados semanalmente. Considerou-se, para fins de cálculo, para gestantes com fetos de alto risco, que o término do pré natal se daria com 34 semanas. Desta forma, o período total de acompanhamento seria de 29 semanas, considerando o início do protocolo com 5 semanas de gestação.

Para gestantes com fetos de baixo risco, o número de ICF e PVS estimado foi de 16, considerando que de 15 a 28 semanas de gestação são realizados quinzenalmente e a partir da 28ª semana, são realizados semanalmente. Considerou-se, para fins de cálculo, para gestantes com fetos de baixo risco, que o término do pré natal se daria com 37 semanas (PEREIRA et al., 2012). Desta forma, o período total de acompanhamento seria de 32 semanas.

O custo das bolsas de sangue, em caso de Transfusões intrauterinas ou de exsanguineotransfusão, bem como procedimentos médicos e diárias hospitalares não foi incluído no custo do protocolo pois foi considerado apenas o custo dos procedimentos associados a testes ou procedimentos transfusioais.

3.13.2.1 Cenário 3: Assistência pré-natal a gestantes RhD negativo sensibilizadas em Serviço de Medicina Fetal/UFMG

Segue abaixo o Protocolo de Atendimento a gestantes sensibilizadas que foi utilizado para o cálculo do custo do cenário 3.

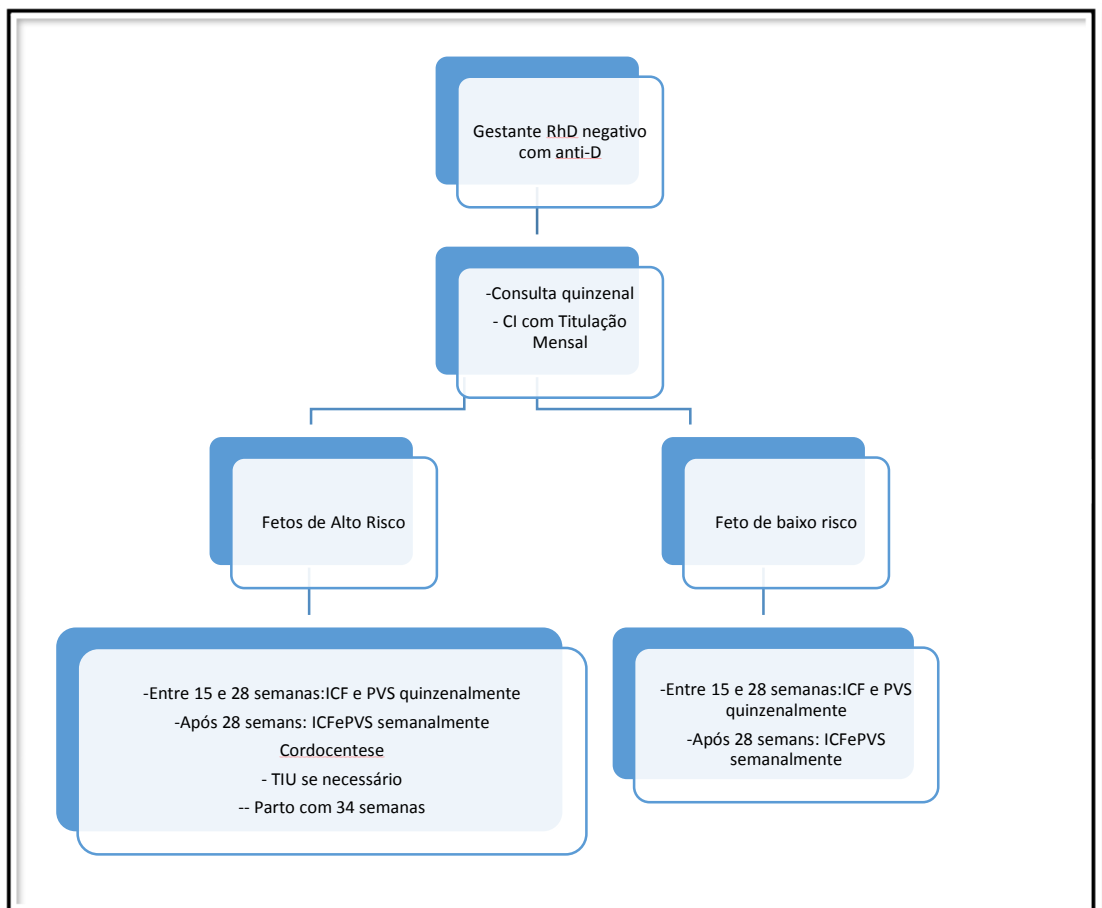


Figura 12 – Cenário 3: Protocolo para Atendimento a Gestantes RhD sensibilizadas por anti-D no Centro de Medicina Fetal/UFMG (PEREIRA et al, 2012)

Uma gestante RhD negativo com anti-D realiza consultas quinzenais (consultas médicas ambulatoriais / especialista), coombs indireto com titulação mensal.

Em fetos considerados de baixo risco, mede-se o Índice Cardiofemoral (ICF) e o Pico da Velocidade Sistólica da artéria cerebral média quinzenalmente, da 15^a à 22^a semana de gestação e semanalmente, a partir da 28^a semana.

Em fetos considerados de alto risco, mede-se o ICF e PVS, conforme fetos de baixo risco, realiza-se a cordocentese e a transfusão intrauterina (TIU), se necessário e interrompe-se a gestação após 34 semanas.

3.13.2.2 Cenário 4: Introdução da Genotipagem *RHD* fetal na Assistência Pré-natal a gestantes RhD negativo Sensibilizadas

Segue abaixo, proposta de Protocolo para Atendimento a gestantes sensibilizadas. A partir desta proposta, foi realizado o cálculo do custo do cenário 4.

Nesse cenário, foi considerada a realização da genotipagem *RHD* fetal para definir o protocolo de atendimento à gestante. Sendo assim, o cenário 2 foi dividido entre gestantes com feto RhD positivo e com feto RhD negativo.

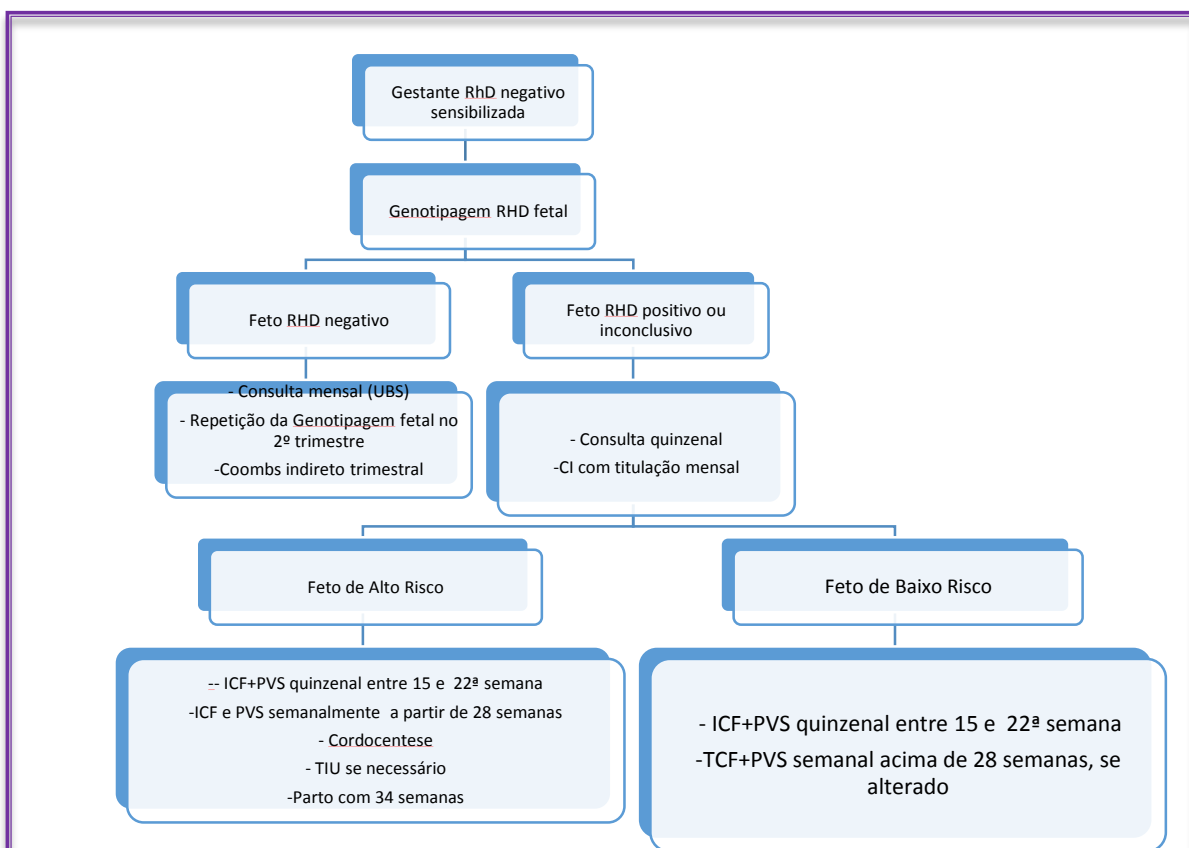


Figura 13 – Proposta de Protocolo para Atendimento a gestante sensibilizada no Serviço de Medicina Fetal, incluindo a Genotipagem *RHD* fetal (Cenário 4)

Neste cenário, toda gestante RhD negativo sensibilizada faria o teste de genotipagem *RHD* fetal. Caso o feto fosse *RHD* negativo, a gestante seria atendida em Serviço de Pré-natal habitual, consistindo de consultas mensais, repetição da genotipagem *RHD* fetal no segundo trimestre e coombs trimestrais. Caso o feto fosse *RHD* positivo ou inconclusivo, a gestante seria atendida no Serviço de Alto risco, consistindo de acompanhamento com consultas quinzenais e Coombs Indireto com titulação mensal. Caso o feto fosse considerado de alto risco, seria realizado o ICF+PVS quinzenal, da 15ª à 22ª semana gestacional e semanalmente, a partir da 28ª semana gestacional,

cordocentese e TIU, se necessário e a gestação seria interrompida com 34 semanas. Caso o feto fosse de baixo risco, o ICF+PVS seria realizado quinzenalmente, da 15^a à 22^a semana gestacional e semanalmente, a partir da 28^a semana gestacional.

3.14 Cálculo do Impacto dos Cenários 1 e 2 no Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo

O impacto da genotipagem RHD fetal será avaliado para gestantes sensibilizadas e para gestantes não-sensibilizadas, em cada cenário. Para tal, serão utilizadas frequências observadas na literatura.

Para gestantes não-sensibilizadas, para cálculo do impacto de cada cenário, foi considerada a chance de aloimunização, num segundo evento, que foi de 1,5% no cenário 1, considerando a aplicação apenas da profilaxia pós natal e de 0,2% no cenário 2, considerando a administração da profilaxia antenatal e pós natal. Esses valores foram obtidos calculando-se a média das frequências informadas no item 1.5 deste estudo (CORREA et al., 2004; SZCZEPURA et al., 2011).

3.14.1 Para gestante Não-sensibilizada

Será calculado o impacto do Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo nos dois cenários (1 e 2) e os valores serão comparados.

3.14.1.1 Gestantes não-sensibilizadas - Cenário 1

Para a análise do impacto do cenário 1, considerou-se a média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano (A). A esse dado, multiplicou-se a frequência de gestantes não-sensibilizadas, encontradas na 2^a parte do estudo, pois as gestantes da 1^a parte do estudo eram do CEMEFE, onde se encontram gestantes sabidamente de alto risco (X%A), para se obter a estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão não-sensibilizadas em um ano (B). Ao valor B foi multiplicado o custo do protocolo para atendimento a gestante não sensibilizada no cenário 1, obtendo-se o valor B'.

A partir da frequência de gestantes RhD negativo com feto RhD positivo, encontrada no presente estudo (X%B), calculou-se o quantitativo B1, que seria a

estimativa de gestantes RhD negativo não-sensibilizadas, que deverão receber a imunoprofilaxia anti-D pós-natal. Ao quantitativo B1 multiplicou-se o custo da Imunoprofilaxia Anti-D, obtendo-se, então, o valor B1'. Considerando que no cenário 1 não é administrada a imunoprofilaxia anti-D antenatal, calculou-se o quantitativo C, que é o quantitativo estimado de gestantes RhD negativo, que se tornariam sensibilizadas num segundo evento (1,5% de B). Essa frequência foi obtida pela média das frequências de sensibilização relatadas no item 1.5 (MANNING, 2000; CORREA et al., 2004; SZCZEPURA et al., 2011).

Multiplicando-se o quantitativo C à frequência de 42,4%, que foi a frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluíram para o status de Alto risco para anemia, encontrada por Osanan e colaboradores (OSANAN et al., 2010), calculou-se o quantitativo C1. Considerando-se que 57,6% delas poderão ter fetos de Baixo risco para anemia fetal (OSANAN, 2010), calculou-se o quantitativo C2. O custo estimado do protocolo de gestantes sensibilizadas com fetos de alto risco foi multiplicado a C1, obtendo-se C1'. O custo estimado do protocolo de gestantes sensibilizadas com fetos de baixo risco foi multiplicado a C2, obtendo-se C2'.

O custo total do Protocolo (D), foi obtido somando-se $B'+B1'+C1'+C2'$. O fluxograma do cálculo está representado na figura 14, abaixo.

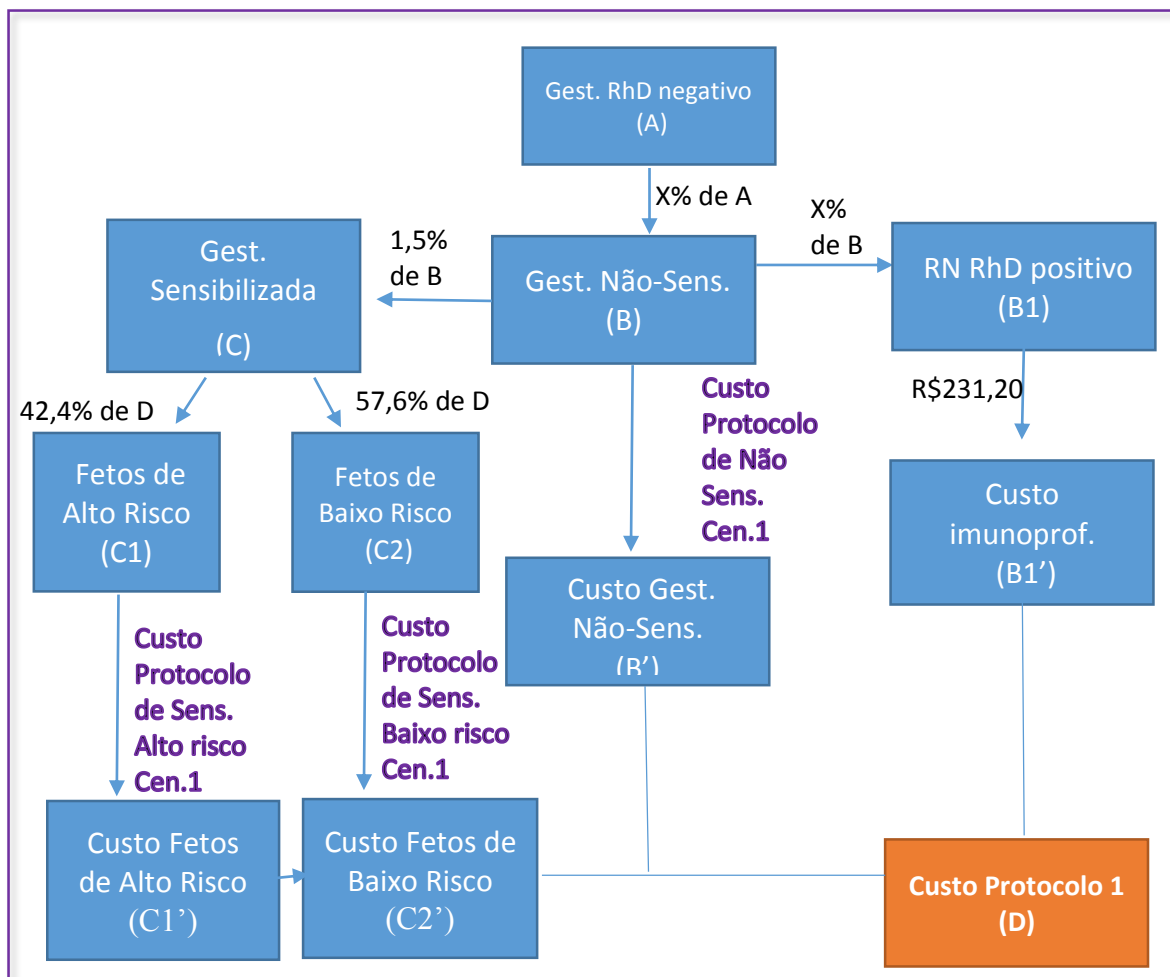


Figura 14 – Custo do Impacto do cenário 1 para gestantes não-sensibilizadas

Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão não-sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes não-sensibilizadas do presente estudo ($X\%A$).

B': Custo do Acompanhamento de Gestantes RhD negativo não-sensibilizadas no Cenário 1.

B1: Estimativa do número de Gestantes RhD negativo com fetos RhD positivos, calculada a partir da frequência de gestantes RhD negativo, com fetos RhD positivo, encontrada no presente estudo ($X\%B$).

B1': Custo da Administração da Imunoprofilaxia pós natal a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas, com feto RhD positivo.

C: Quantitativo estimado de gestantes RhD negativo, que se tornariam sensibilizadas num segundo evento, calculado a partir de 1,5% de A (ver item 1.5).

C1: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Alto risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Alto risco para anemia fetal (42,4%) relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C2: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Baixo risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Baixo risco para anemia fetal (57,6%), relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C1': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Alto risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Alto risco no cenário 3, calculado conforme descrito no item 3.15.1.1.

C2': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Baixo risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Baixo risco no cenário 3, calculado conforme descrito no item 3.15.1.1.

D: Soma dos valores $B'+B1'+C1'+C2'$, que é o valor do Acompanhamento de Gestantes RhD negativo, não-sensibilizadas, no cenário 1.

3.14.1.2 Gestantes não-sensibilizadas - Cenário 2

Para a análise do impacto do cenário 2, considerou-se a média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano (A). A partir desse dado, estimou-se a frequência de gestantes não-sensibilizadas, considerando-se a frequência de gestantes não-sensibilizadas do presente estudo ($X\%A$) e obteve-se o quantitativo B.

Considerando-se que $X\%B$ e $Y\%B$ dos fetos serão RHD positivo ou inconclusivo e RHD negativo, respectivamente, calculou-se os quantitativos $B+$ e $B-$. A esses quantitativos, foi multiplicado o custo do protocolo de gestantes não-sensibilizadas com fetos RHD positivo e RHD negativo, obtendo-se os valores $B+'$ e $B-'$, respectivamente.

Assim como no cenário 1, temos que avaliar o impacto da administração ou não da imunoprofilaxia antenatal. Desta forma, considerando que no cenário 2, a imunoprofilaxia anti-D antenatal seria administrada, calculou-se a frequência de

gestantes que se tornariam sensibilizadas num segundo evento (0,2% de B), obtendo-se o quantitativo C. Para tal, foi utilizada como base, a média da redução da frequência de sensibilização reportada nos estudos do item 1.5 (MANNING, 2000; CORREA et al., 2004; SZCZEPURA et al., 2011).

Considerando-se que 42,4 e 57,6% das gestantes estarão gestando fetos de alto e baixo risco, respectivamente, calculou-se os quantitativos E1 e E2. A esses valores multiplicou-se o custo do protocolo de gestantes com fetos de alto e baixo risco, respectivamente, obtendo-se E1' e E2'.

O impacto do cenário 2 (F), foi então obtido, somando-se os valores $C'+D'+D1'+D2'$.

A esquematização do cálculo está descrita no fluxograma abaixo.

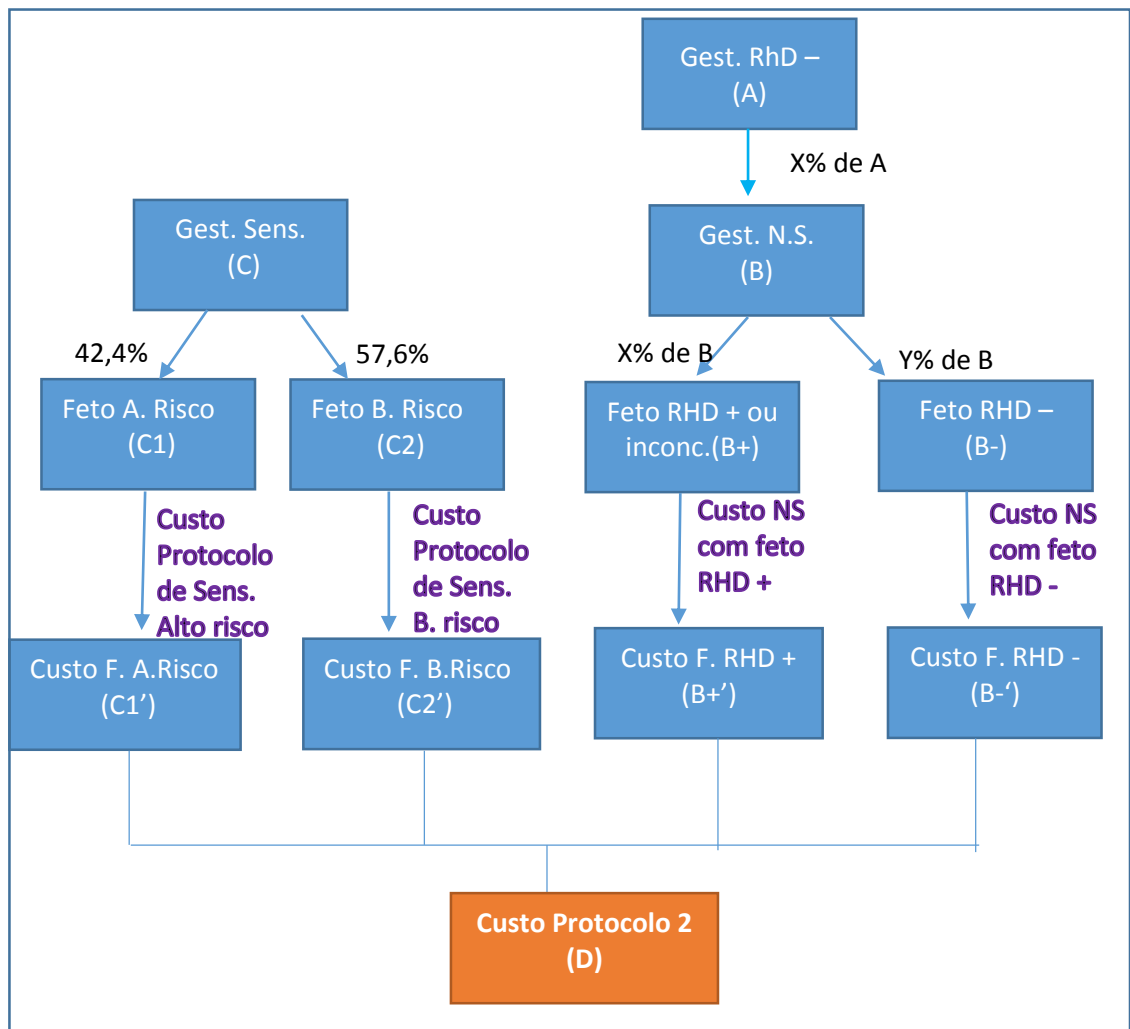


Figura 15 - Impacto do cenário 2 para gestantes não-sensibilizadas

Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão não-sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes não-sensibilizadas do presente estudo (X%A).

B+: Estimativa do quantitativo de fetos que serão *RHD* positivos e inconclusivos (X%B) na genotipagem *RHD* fetal não-invasiva, calculado a partir da frequência de fetos *RHD* positivos e inconclusivos do presente estudo.

B-: Estimativa do quantitativo de fetos que serão *RHD* negativos (Y%B) na genotipagem *RHD* fetal não-invasiva, calculado a partir da frequência de fetos *RHD* negativos do presente estudo.

B+': Estimativa do custo do Protocolo para Atendimento a gestantes RhD negativo, com fetos *RHD* positivos ou inconclusivos.

B-': Estimativa do custo do Protocolo para Atendimento a gestantes RhD negativo, com fetos RHD negativos.

C1: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Alto risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Alto risco para anemia fetal (42,4%) relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C2: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Baixo risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Baixo risco para anemia fetal (57,6%), relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C1': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Alto risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Alto risco no cenário 3, calculado conforme descrito no item 3.15.2.2.

C2': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Baixo risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Baixo risco no cenário 3, calculado conforme descrito no item 3.15.2.2.

D: Valor obtido pela soma de $B+'+B-'+C1'+C2'$, que é o valor do Acompanhamento de Gestantes RhD negativo, não-sensibilizadas, no cenário 2.

3.14.2 Para gestantes sensibilizadas

Será calculado o impacto do Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas nos dois cenários e os valores serão comparados.

3.14.2.1 Gestantes sensibilizadas - Cenário 3

Para a análise do impacto do cenário 3, considerou-se a média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano (A). A esse dado, multiplicou-se a estimativa da frequência de gestantes sensibilizadas por anti-D, do presente estudo ($X\%A$) e obteve-se o quantitativo B. A partir de B calculou-se os quantitativos C e D. C é a estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o perfil de fetos de Baixo risco, o qual foi obtido calculando-se 57,6%

de B (OSANAN, 2010). D é a estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o perfil de fetos de Alto risco, o qual foi obtido calculando-se 42,4% de B (OSANAN, 2010). Para se obter os valores C' e D', multiplicou-se o custo do protocolo para atendimento a gestantes sensibilizadas com fetos de Baixo risco e de Alto Risco, no cenário 3, respectivamente. Para se obter o quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de TIU (D1), foi utilizada a frequência de 41,3%, conforme outro estudo realizado no CEMEFÉ/MG (VILLASCHI, 2012). Para se obter o valor gasto com esse procedimento (D1'), foi multiplicado o quantitativo D1 pelo custo da TIU, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 363,60. Para o cálculo do quantitativo estimado de gestantes com fetos de alto risco que necessitarão de exsanguineotransfusão (D2), foi calculado 45,3% de D. Essa frequência foi obtida do estudo realizado por VILLASCHI, 2012. Conforme esse mesmo estudo, 64,7% desses fetos receberão 1 exsanguineotransfusão (D2a), 14,7% receberão 2 (D2b), 14,7% receberão 3 (D2c), 2,9% receberão 4 (D2d) e 2,9% receberão 5 (D2e). A esses quantitativos foi multiplicado o valor da EXT, que, segundo a tabela AMB92 é de R\$363,60, obtendo-se os valores D2a', D2b', D2c', D2d', D2e', respectivamente. O valor do impacto do cenário (E) será a soma de $C'+D'+D1'+D2a'+D2b'+D2c'+D2d'+D2e'$, conforme demonstrado na figura 16.

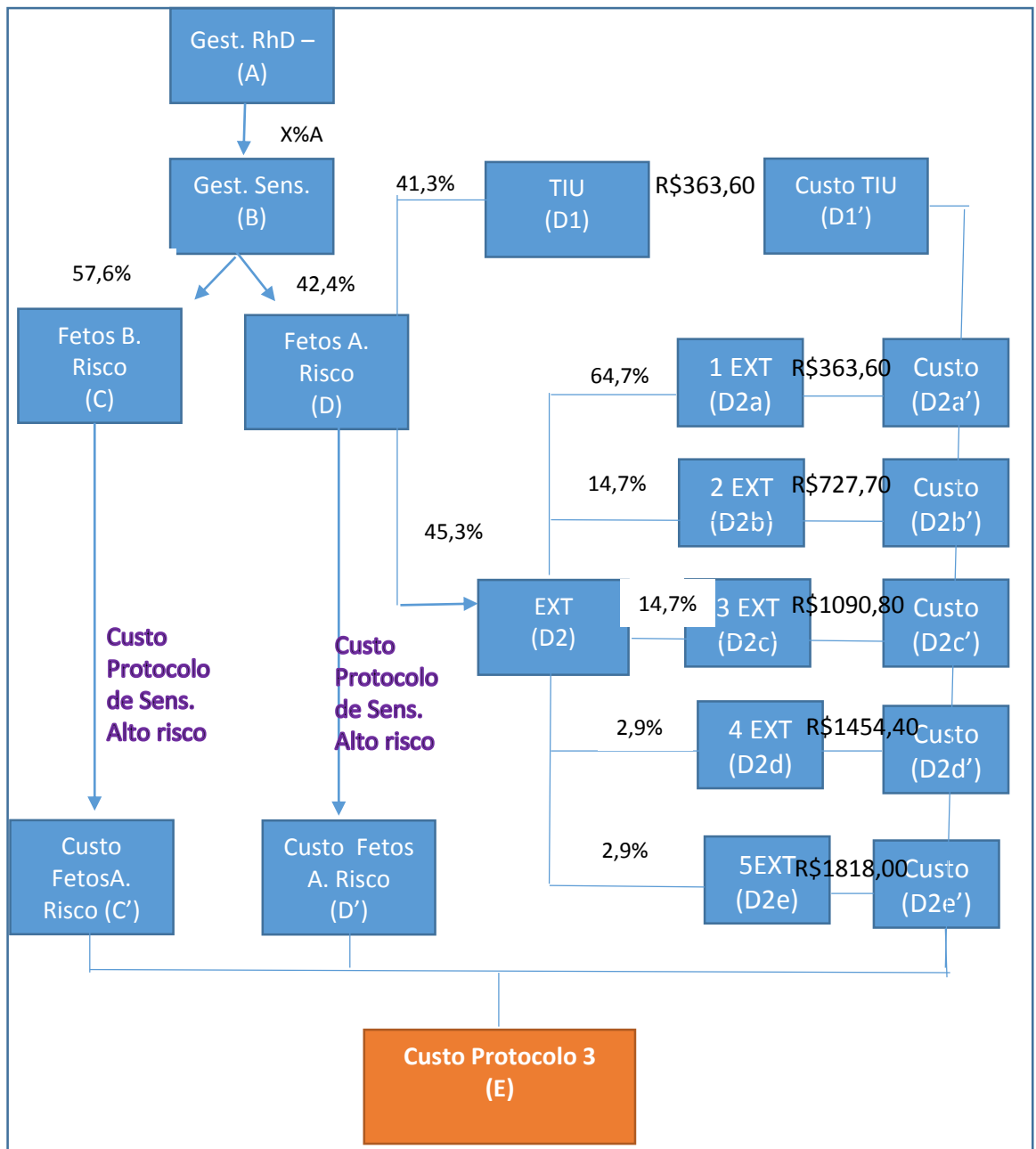


Figura 16 - Impacto do Protocolo para Atendimento a Gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 3

Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes sensibilizadas do presente estudo ($X\%A$).

C: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Baixo risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Baixo risco para anemia fetal (57,6%), relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

D: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Alto risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Alto risco para anemia fetal (42,4%) relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Baixo risco, obtido após multiplicar C ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Baixo risco no cenário 3, calculado conforme descrito no item 3.15.2.2.

D': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Alto risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Alto risco no cenário 3, calculado conforme descrito no item 3.15.2.2.

D1: Quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de TIU, calculada, multiplicando-se o número de fetos que poderão se tornar de alto risco para anemia, pela frequência de fetos que necessitaram de TIU (41,3%), encontrada em estudo realizado no CEMEFÉ/MG (VILLASCHI, 2012).

D1': Valor estimado do custo com o procedimento de TIU para gestantes com fetos de alto risco para anemia. Para se obter esse valor, foi multiplicado o quantitativo D1 ao custo da TIU, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 363,60.

D2: Quantitativo estimado de RN de alto risco que necessitarão de EXT, calculada multiplicando-se o número de fetos que poderão se tornar de alto risco para anemia, pela frequência de RN que necessitaram de EXT (45,3%), encontrada em estudo realizado no CEMEFÉ/MG (VILLASCHI, 2012).

D2a: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 1 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 64,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 1 EXT ao nascimento..

D2b: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 2 EXT ao nascimento.

D2c: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 3 EXT ao nascimento.

D2d: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 4 EXT ao nascimento.

D2e: Quantitativo estimado de fetos que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 5 EXT.

D2b': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2b ao valor de 2 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 727,20.

D2c': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2c ao valor de 3 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.090,80.

D2d': Valor estimado o custo com os RN os que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2d ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.454,40.

D2e': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2e ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.818,00.

E: Valor obtido pela soma dos custos $C'+D'+D1'+D2a'+D2b'+D2c'+D2d'+D2e'$, que é o custo total do impacto previsto para o acompanhamento de gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 3.

3.14.2.2 Gestantes sensibilizadas - Cenário 4

Para análise do impacto da introdução da genotipagem *RHD* na rotina de atendimento a gestantes RhD negativo, considerando que o teste ainda não foi implantado, não há dados para saber quantos fetos RhD positivo evoluíram para alto risco para anemia fetal e quantos para baixo risco. Desta forma, foi feita uma projeção, a partir dos dados informados. Sabe-se que 42,4% dos fetos de gestantes aloimunizadas que chegaram ao CEMEF/UFMG evoluíram para alto risco (OSANAN, 2010) e 57,6% evoluíram para baixo risco. Destas, estima-se que cerca de 30% estarão gestando fetos RhD negativo (Frequência de RN RhD negativo do presente estudo) e cerca de 27,6% estarão gestando fetos RhD positivo (Frequência de RN RhD positivo do presente estudo) com DHPN branda e por isso, os fetos evoluíram para baixo risco para anemia.

Para a análise, portanto, do impacto do cenário 4, considerou-se a média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano (A). A esse dado, multiplicou-se a estimativa da frequência de gestantes sensibilizadas por anti-D, do presente estudo ($X\%A$) e obteve-se o quantitativo B. A

partir de B calculou-se os quantitativos B- e B+, onde B- é a estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos serão RHD negativo na genotipagem RHD e foi obtida, calculando X% de B, que foi a frequência de fetos *RHD* negativos do presente estudo. B+ é a estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos serão *RHD* positivo ou inconclusivo e foi obtida, calculando-se Y% de B, que é a frequência de fetos *RHD* positivos e inconclusivos do presente estudo. Ao valor B- multiplicou-se o custo do Protocolo para Acompanhamento de gestantes com feto *RHD* negativo, obtendo-se o valor B-'. C é a estimativa de gestantes RhD negativo que estarão gestando fetos RhD positivo que evoluirão para baixo risco para anemia, por não terem desenvolvido anemia severa e equivale a 27,6% de B+. D é a estimativa de gestantes sensibilizadas, com fetos RhD positivo, cujos fetos evoluirão para o perfil de fetos de Alto risco (42,4% de B+). Para se obter o valor B-', multiplicou-se B- ao custo do protocolo do Acompanhamento de uma gestante RhD negativo, sensibilizada, gestando feto com resultado *RHD* negativo na genotipagem *RHD*. Para se obter os valores C' e D', multiplicou-se o custo do protocolo de atendimento a gestantes sensibilizadas com fetos de Baixo risco e de Alto Risco, respectivamente. Para se obter o quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de TIU (E), foi calculado 41,3% de D, obtendo-se o quantitativo E, o qual foi multiplicado ao custo da TIU (R\$ 363,60) e então obteve-se o valor E1'. Para o cálculo do quantitativo estimado de gestantes com fetos de alto risco que necessitarão de exsanguineotransfusão (F), foi calculado 45,3% de D. Calculou-se 64,7%, 14,7%, 14,7%, 2,9% e 2,9% de F, para se obter os quantitativos de fetos que receberão 1 (F1), 2 (F2), 3 (F3), 4 (F4) e 5 exsanguineotransfusões(F5). A esses quantitativos foi multiplicado o valor da EXT, de acordo com o número de EXT, obtendo-se os valores F1', F2', F3', F4', F5', respectivamente. O valor do impacto do cenário (G) será a soma de B-'+ C'+ D'+ E'+F1'+F2'+F3'+F4'+F5, conforme figura 17.

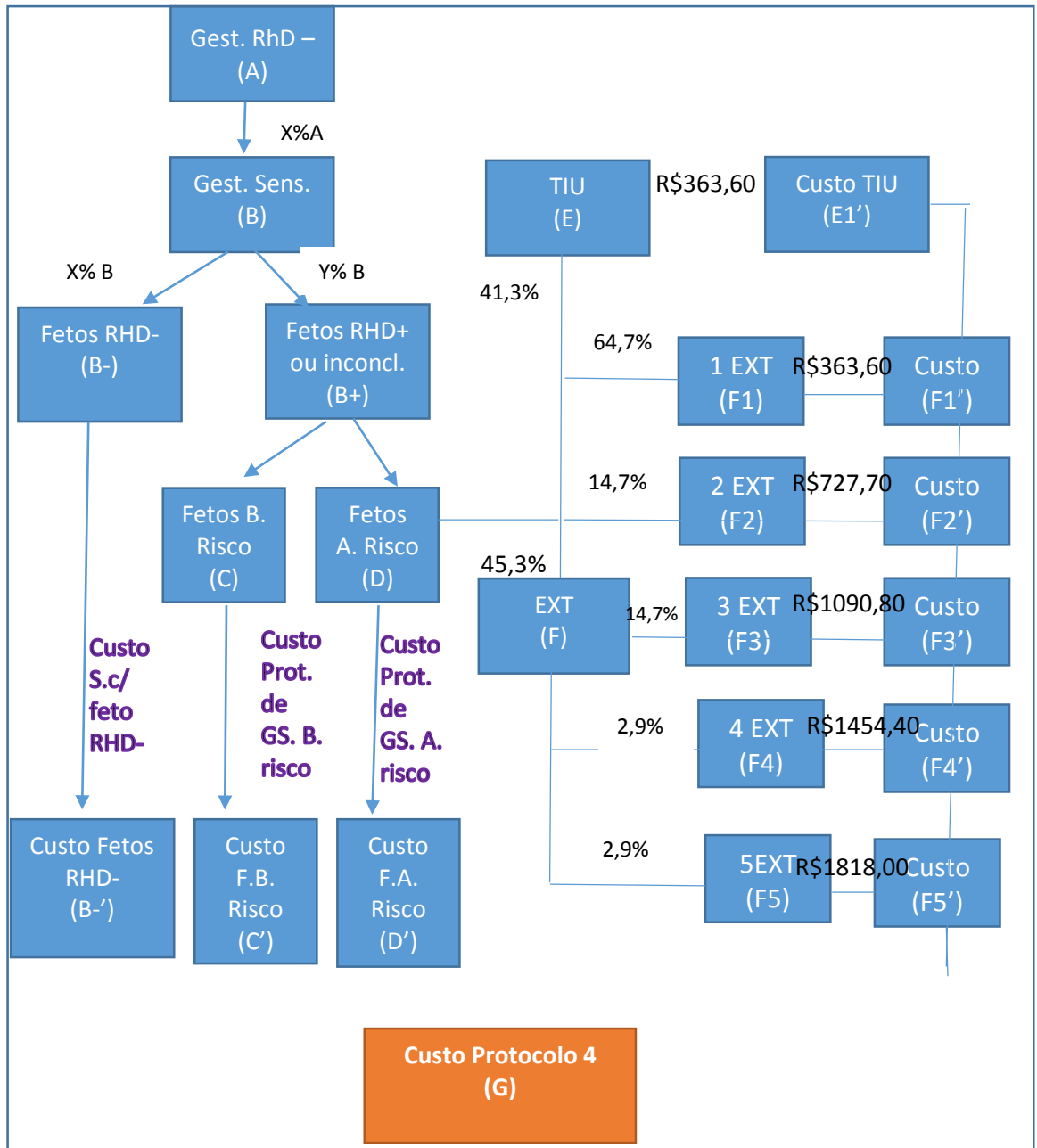


Figura 17 - Impacto do Protocolo de Atendimento a Gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 4

Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes sensibilizadas do presente estudo (X%A).

B-: Estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos serão RHD negativo na genotipagem RHD e foi obtida, calculando X% de B, que foi a frequência de fetos RHD negativos do presente estudo.

B-': Valor obtido multiplicando-se B- ao custo do protocolo do Acompanhamento de uma gestante RhD negativo, sensibilizada, gestando feto com resultado *RHD* negativo na genotipagem *RHD*.

B+: Estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos serão *RHD* positivo ou inconclusivo e foi obtida, calculando-se Y% de B, que é a frequência de fetos *RHD* positivos e inconclusivos do presente estudo.

C: Quantitativo estimado do número de gestantes RhD negativo, aloimunizadas, com fetos RhD positivo, que evoluirão para o perfil de fetos de Baixo risco. Valor obtido, calculando-se 27,6% de B+.

D: Estimativa de gestantes sensibilizadas, com fetos RhD positivo, cujos fetos evoluirão para o perfil de fetos de Alto risco, o qual foi obtido calculando-se 42,4% de B+.

C': Custo do Protocolo para Atendimento a gestantes sensibilizadas, com feto de Baixo risco.

D': Custo do Protocolo para Atendimento a gestantes sensibilizadas com fetos de Alto Risco.

E: Quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de TIU

E': Custo estimado do acompanhamento de fetos que necessitarão de TIU.

F: Quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de EXT, calculada multiplicando-se o número de fetos que poderão se tornar de alto risco para anemia, pela frequência de fetos que necessitaram de EXT (45,3%), encontrada em estudo realizado no CEMEFÉ/MG (VILLASCHI, 2012).

F1: Quantitativo estimado de fetos que necessitarão de 1 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 64,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 1 EXT.

F2: Quantitativo estimado de fetos que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 2 EXT.

F3: Quantitativo estimado de fetos que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 3 EXT.

F4: Quantitativo estimado de fetos que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 4 EXT

F5: Quantitativo estimado de fetos que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 5 EXT.

F1': Valor estimado o custo com fetos que necessitarão de 1 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2a ao valor de 1 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 363,60.

F2': Valor estimado o custo com fetos que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2b ao valor de 2 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 727,20.

F3': Valor estimado o custo com fetos que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2c ao valor de 3 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.090,80.

F4': Valor estimado o custo com fetos que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2d ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.454,40.

F5': Valor estimado o custo com fetos que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2e ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.818,00.

G: Valor obtido pela soma dos custos $B' + C' + D' + E' + F1' + F2' + F3' + F4' + F5'$, que é o custo total do impacto previsto para o acompanhamento de gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 4.

4 Resultados

4.1 Características gerais da população de estudo

Foram obtidas amostras de plasma de 248 gestantes RhD negativo com idade gestacional média de 27 semanas. A idade gestacional mínima geral foi de 05 semanas e a máxima foi de 40 semanas, sendo que, entre as gestantes não-sensibilizadas esse número foi de 5 a 40 semanas e entre as sensibilizadas foi de 14 a 37 semanas. A idade média das gestantes participantes do estudo foi de 30 anos, com a idade mínima de 16 anos e a máxima de 44 anos. A paridade média das gestantes foi de duas, sendo que o número máximo foi de dez. Um total de 84 (33,9%) gestantes estavam na primeira gestação, 70 (28,1%) na segunda, 47 (19,0%) na terceira, 47 (19,0%) na quarta gestação ou mais.

Das 248 gestantes participantes do estudo, 184 (74,2%) eram não-sensibilizadas e sessenta e quatro (25,8%) eram sensibilizadas, sendo que 54 (21,8%) das 248 gestantes, eram aloimunizadas para o anti-D. Entre as gestantes sensibilizadas, o aloanticorpo mais frequente foi o anti-D, presente em 84,4% delas, sendo que 48,1% produziu apenas o anti-D, 46,3% produziu o anti-D + anti-C e 5,6% delas, o anti-D + anti-E. Os outros aloanticorpos encontrados foram o anti-K, o anti-M, o anti-anti-Le^a, o anti-Le^b, o anti-S, o anti-S, o anti-Di^a, o anti-P1 e um anticorpo de especificidade não determinada. A frequência dos aloanticorpos está demonstrada na figura 18.

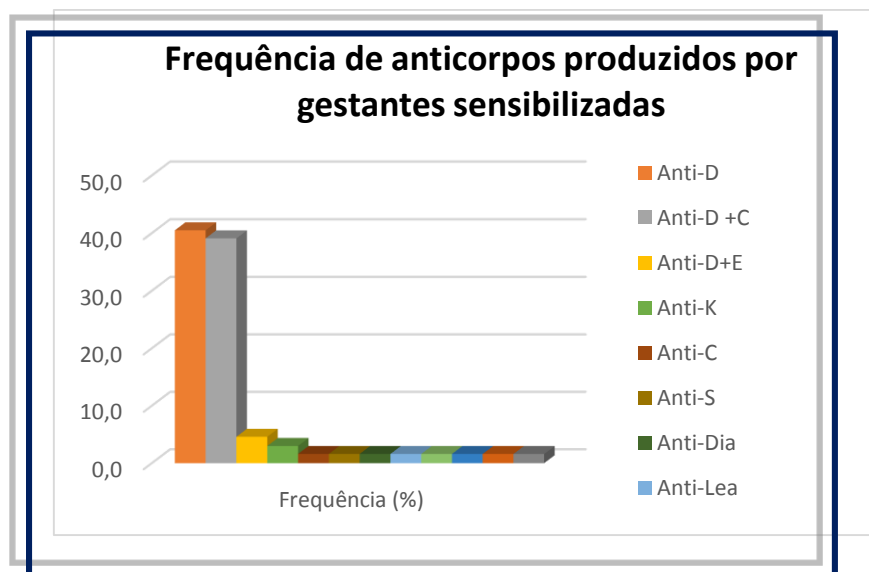


Figura 18 - Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes sensibilizadas

Das 55 gestantes procedentes do CEMEFE/UFMG, vinte e oito (51%) eram sensibilizadas e 27 (49%) eram não-sensibilizadas. Das 193 gestantes participantes da 2ª parte do estudo, provenientes do Ambulatório de Atendimento a gestantes RhD negativo e do CEMEFE, 157 (81,3%) eram não-sensibilizadas e trinta e seis (18,7%) eram sensibilizadas, sendo que 32 (16,5%) eram aloimunizadas para o anti-D.

Das 164 (66,1%) gestantes com mais de uma gestação, 75 (45,7%) já tiveram história de aborto. Destas, 47 (62,7%) não estavam sensibilizadas e 28 (37,3%) estavam sensibilizadas, sendo que em 24 (85,6%) delas, o anti-D estava presente, em uma (3,6%) o anti-S, em outra (3,6%), o anti-C, em outra (3,6%), o anti-Le^b e em outra (3,6%), um anticorpo não identificado (Figura 19).

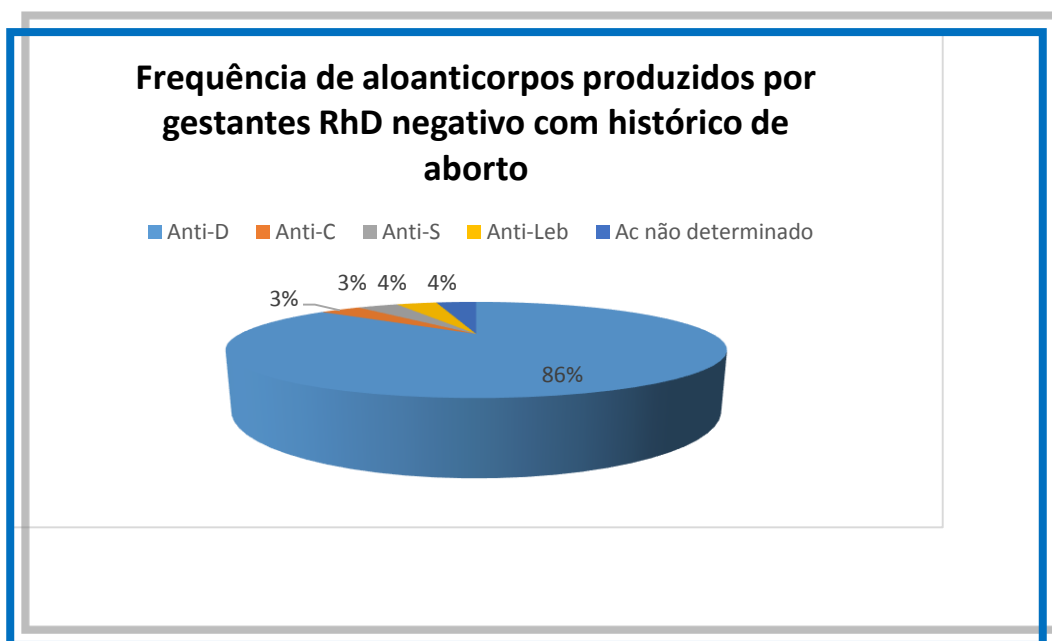


Figura 19 – Frequência de aloanticorpos produzidos por gestantes RhD negativo com histórico de aborto.

4.2. Avaliação do kit KIAamp DSP Vírus Spin

A amostra fornecida pelo Instituto Nacional para Padrões e Controles biológicos (NIBSC), do padrão WHO, foi purificada utilizando o kit KIAamp DSP Vírus Spin (QIAGEN, Alemanha). Após purificação e diluição a 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16, foi submetida à PCR *RHD* fetal para os exons 5 e 7, da mesma forma que as amostras testadas no presente estudo.

Houve amplificação do gene RHD até a diluição 1:8. Segundo informação do NIBSC, dos 39 laboratórios participantes, apenas 8 (20,5%) deles conseguiram

detectar o gene *RHD* na diluição 1:8, sendo que somente 1 laboratório conseguiu detectar o gene na diluição 1:16, conforme demonstrado na tabela 9.

Sem detecção do gene <i>RHD</i>	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
4	7	12	7	8	1

Tabela 9-Resultado da Análise da amostra do NIBSC

4.3 Avaliação do limite mínimo da PCR em tempo real para o gene *RHD*

A figura 20 e a tabela 9 mostram o resultado de amplificação dessa curva padrão para os exons 5 e 7 do gene *RHD*, e as figuras 21 e 22, os valores do slope e R^2 obtidos.

Devido ao efeito estocástico, que pode acontecer para amostras com muito pouco DNA, como as representadas pelas duplicatas com 4 pg de DNA, foi considerado como 40 pg de DNA o limite mínimo de detecção para a PCR *RHD*, o que corresponde teoricamente a 13 cópias do gene *RHD* (em homozigose). Até esta concentração, a eficiência da PCR para amplificação do exon 5 e 7 do gene *RHD* foi de 109% e 107%, respectivamente, de acordo com os valores de slope encontrados (-3,12 para o exon 5 e -3,17 para o exon 7). Um slope de -3,32 compreende uma PCR com eficiência de 100%, ou seja, em que há duplicação do material alvo a cada ciclo de amplificação.

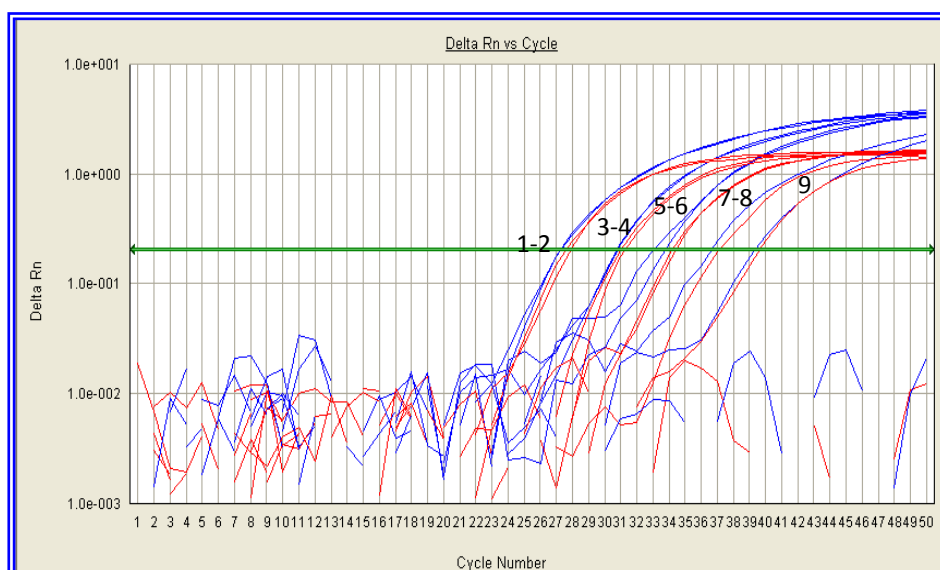


Figura 20 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene *RHD* na PCR em tempo real.

Amplificação do exon 5 (azul) e 7 (vermelho) do gene *RHD* de uma amostra RhD positivo em diluição seriada (40 ng, 4 ng, 400 pg, 40 pg e 4 pg de DNA). Os números 1-9 se referem aos valores de Ct para as referidas concentrações. Baseline: 3-20.

Tabela 10 - Avaliação do limite mínimo de detecção do gene RHD na PCR em tempo real.

DILUIÇÕES	QUANTIDADE DE DNA	GENOTIPAGEM <i>RHD</i> (Ct)	
		Exon 5	Exon 7
1	40 ng	27,52	28,06
2		27,46	27,80
3	4 ng	31,01	31,46
4		30,95	31,22
5	400 pg	33,97	34,57
6		33,32	34,37
7	40 pg	36,83	37,36
8		40,37	38,33
9	4 pg	39,54	39,83
10		-	-

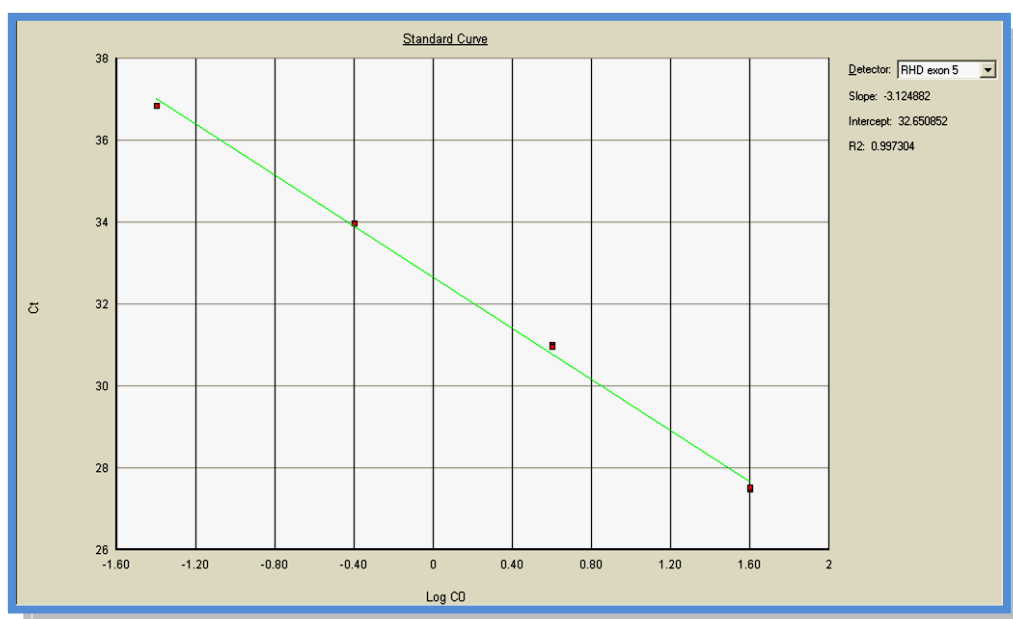


Figura 21 - Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene RHD (exon 5) na PCR em tempo real.

Para avaliação da eficiência da PCR foram utilizadas as quatro primeiras diluições (40 ng a 40 pg) de DNA de uma amostra RhD positivo. O slope encontrado foi de -3,125 e o R^2 foi de 0,997.

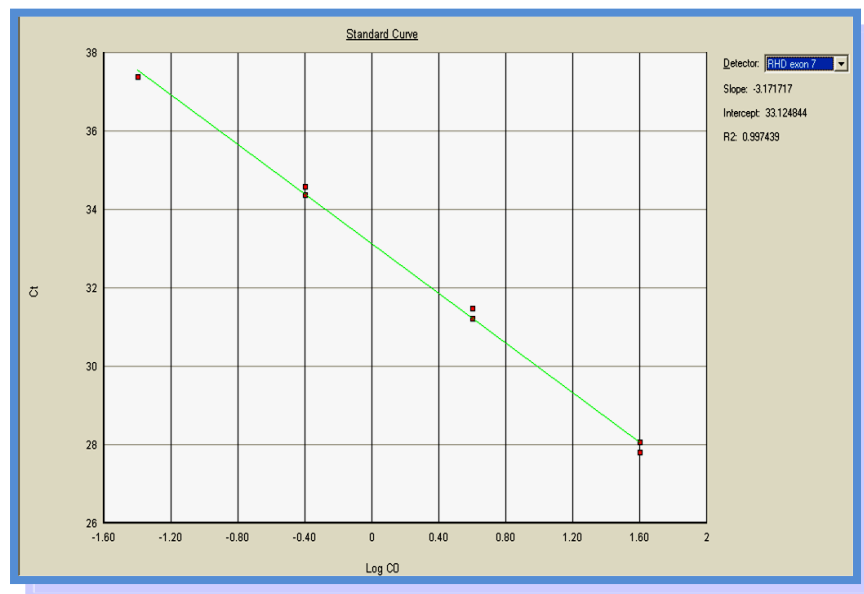


Figura 22 - Curva padrão obtida na avaliação do limite mínimo de detecção do gene RHD (exon 7) na PCR em tempo real

Para avaliação da eficiência da PCR foram utilizadas as quatro primeiras diluições (40 ng a 40 pg) de DNA de uma amostra RhD positivo. O slope foi de -3,172 e o R^2 de 0,997.6.

4.4 Resultados das fenotipagens RhD maternas

Foi realizada a fenotipagem RhD e a pesquisa de D fraco nas 248 amostras maternas colhidas. Destas, duas (1,03%) demonstraram ser RhD positivo fraco e uma (0,51%) RhD positivo. Portanto, apenas 245 (98,4%) amostras foram genotipadas para o gene *RHD*.

4.5 Resultados da PCR em tempo real para o gene RHD e comparação com o fenótipo RhD dos recém-nascidos

Foi realizada PCR em tempo real para genotipagem *RHD* das amostras de DNA fetal obtido a partir do plasma materno das gestantes RhD negativo, confirmadas pela fenotipagem RhD. Os resultados só foram considerados se a amostra mostrou amplificação para o gene albumina humana. Destas, 171 (69,8%) foram *RHD*

positivas, 65 (26,5%) foram *RHD* negativas e nove (3,7%) foram inconclusivas, devido à amplificação de apenas um exon do gene *RHD* (oito amostras amplificaram apenas o exon 7, e uma amostra apenas o exon 5). O percentual de Recém nascidos RhD positivo foi de 70% e o de RhD negativo foi de 30%.

Dezenove (7,8%) das 245 amostras genotipadas não puderam ter os resultados da genotipagem comparados com o fenótipo RhD dos recém-nascidos, pois em 14 casos (5,7%) não foi possível obter a informação do fenótipo, em dois casos (0,9%) houve interrupção da gestação, em outros três casos (1,2%) o feto foi à óbito, não sendo possível realizar a fenotipagem RhD do concepto. Considerando-se então, que nove (3,7%) amostras tiveram resultado inconclusivo, apenas 217 amostras puderam ter o resultado da genotipagem *RHD* fetal com o fenótipo RhD do recém-nascido.

Entre as nove amostras com resultado inconclusivo, oito (89%) apresentaram amplificação apenas para o exon 7 e uma (11%) apresentou amplificação apenas para o exon 5.

Entre as amostras que puderam ter o resultado da genotipagem comparado com o fenótipo do recém-nascido, uma delas foi discrepante com o fenótipo obtido do sangue de cordão umbilical, mas foi concordante com o fenótipo obtido do sangue venoso e por isso foi considerada concordante. Outra amostra, também discordante com o resultado do sangue de cordão, foi concordante com o genótipo obtido a partir de DNA da mucosa bucal do recém-nascido, entretanto, não foi considerado conclusivo, por ser uma inferência indireta do fenótipo. A frequência de resultados discordantes e concordantes estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11 Resultados da genotipagem RHD fetal utilizando PCR em tempo real e comparação com o fenótipo do recém-nascido.

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Resultados que puderam ser comparados com o fenótipo do recém-nascido	217	100,0
Resultados concordantes entre a genotipagem <i>RHD</i> fetal e a fenotipagem RhD do recém-nascido	202	93,1%

Resultados discordantes entre a genotipagem <i>RHD</i> fetal e a fenotipagem RhD do recém-nascido	15	6,9%
---	----	------

Conforme a tabela 12 abaixo, a sensibilidade do teste de genotipagem *RHD* fetal foi de 97,3% e a especificidade foi de 82,1%.

Tabela 12 - Cálculo da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da genotipagem *RHD* fetal em relação ao fenótipo do recém-nascido.

Fenotipagem RhD dos recém-nascidos			
Genotipagem <i>RHD</i>	Positivo	Negativo	Total
Positivo	146	12	158
Negativo	4	55	59
Total	150	67	217
Sensibilidade: 97,3%			
Especificidade: 82,1%			
Acurácia do teste: 93,1%			
Valor preditivo positivo: 92,4%			
Valor preditivo negativo: 93,2%			

4.6 Cálculo do custo da genotipagem *RHD* fetal

O cálculo do custo do teste da genotipagem RhD fetal foi realizado, considerando-se que toda a demanda do Estado de Minas Gerais seria atendida em um laboratório de referência. Desta forma, calculou-se a o custo mensal estimado para o funcionamento deste laboratório. Para tal, foram considerados os custos com recursos humanos, com todos os encargos sociais, custo com materiais de consumo, serviços, imóvel, manutenções e depreciação de equipamentos, bem como dos insumos necessários para a realização do teste de genotipagem *RHD* não-invasiva neste laboratório.

4.6.1 Demanda de genotipagens *RHD* no Estado de Minas Gerais

Com o objetivo de calcular a estimativa do número de genotipagens *RHD* fetais a serem realizadas e, portanto, a estimativa da demanda máxima e mínima do laboratório, foi feita uma busca no site do DATASUS e calculada a média do período.

A média anual de nascidos vivos no Estado de Minas Gerais, de 2001 a 2011, foi de 265.115. A média de óbitos fetais nesse mesmo período foi de 3.285. Somando-se esses dados, estima-se que a média do número de gestações no Estado é de 268.400 ao ano.

Considerando-se a frequência do fenótipo RhD negativo na população brasileira, como sendo de 10% (NOVARETTI et al., 1995; MOREIRA et al., 1996; BAIOSCHI et al., 2007), estimou-se que 26.840 destas gestações serão de mulheres RhD negativo, ao ano.

Para fins de cálculo do custo do teste de genotipagem *RHD* fetal não-invasiva, considerou-se que o percentual máximo da demanda do laboratório seria de 75% das gestantes RhD negativo do estado de Minas Gerais e que a demanda mínima seria de 30%. Desta forma, considerando-se o percentual máximo de 75%, a demanda mensal máxima do laboratório seria de 1.678 testes e a mínima seria de 671 testes.

Tabela 13 - Estimativa do número de genotipagens realizadas no Estado de Minas Gerais

Ano	Nascidos vivos	Óbitos fetais	Soma	RhD negativo	75%	30%	Mês (30%)	Mês (75%)	Dia (75%)
2001	298.080	3.844	301.924	30.192	22.644	9.058			
2002	284.342	3.762	288.104	28.810	21.608	8.643			
2003	284.765	3.617	288.382	28.838	21.629	8.651			
2004	277.453	3.470	280.923	28.092	21.069	8.428			
2005	276.651	3.348	279.999	28.000	21.000	8.400			
2006	265.115	3.285	268.400	26.840	20.130	8.052			
2007	258.469	3.176	261.645	26.165	19.623	7.849			
2008	259.924	2.900	262.824	26.282	19.712	7.885			
2009	251.826	2.872	254.698	25.470	19.102	7.641			

2010	254.438	2.792	257.230	25.723	19.292	7.717			
2011	259.141	2.859	262.000	26.200	19.650	7.860			
Média	265.115	3.285	268.400	26.840	20.130	8.052	671	1.678	84
			<i>Tend.</i>	29.504	22128	8851	738	1.844	92

4.6.2 Cálculo dos recursos humanos necessários

A partir da estimativa da demanda máxima, chegou-se ao quantitativo de testes a serem realizados diariamente de 84 testes, numa demanda máxima. Desta forma, estima-se que o laboratório terá que funcionar durante 12 horas por dia, durante 20 dias úteis ao mês, em dois turnos de 6 horas. Será, portanto, necessário um funcionário de nível superior (biólogo, bioquímico ou biomédico) e dois técnicos de Patologia Clínica por turno, no mínimo. Conforme demonstrado na tabela 14.

Tabela 14 - Estimativa do perfil e do número de funcionários para compor a equipe

Equipe necessária		
Horas/dia	Funcionários /Técnicos	Funcionários/Superior
12	4	2

Os valores mínimos e máximos dos salários de cada categoria profissional, bem como a média entre eles e as alíquotas utilizadas para o cálculo dos encargos sociais estão descritas na tabela 15.

Tabela 15 - Estimativa do custo mensal com Recursos Humanos

Item	Parâmetro	Qtde	Custo unitário mensal (R\$)	Custo Mensal (R\$)		Custo mensal total (R\$) (a*b)
		(a)	(b) base	Mínimo	Máximo	
Recursos Humanos (RH)	Farmacêutico, Biólogo, Biomédico ¹	2	2.479,88	1.652,29	3.646,46	4.959,76
	Técnico de Patologia Clínica ¹	4	1.355,14	1.167,81	1.742,56	5.420,56
	Auxiliar Administrativo	1	993,67	803,14	1.017,30	993,67
	Capacitação/Treinamento	7	20,00	10,00	30,00	140,00
	Total recursos humanos					
Encargos sociais	13º salário (9,75%)	1	1.108,96			1.108,96
	Férias (+1/3 das férias) (13,00%)	1	1.478,62			1.478,62
	INSS, FGTS e alimentação (57,00%)	1	6.483,17			6.483,17
	Vale-transporte ²	7	130,00			910,00
	Benefícios (uniforme)	7	100,00			700,00
	Total encargos sociais RH					

4.6.3 Cálculo do Material de Consumo

Para o cálculo do custo estimado com material de consumo foi considerado o custo estimado de um profissional de limpeza e o custo estimado com material de limpeza e de escritório. Os valores encontrados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 16 – Estimativa do custo mensal com Maeriais de consumo

Item	Parâmetro	Qtde	Custo unitário mensal(R\$)	Custo Total mensal(R\$)
Materiais de consumo	Serviços gerais, materiais de higiene e limpeza	1	2.357,13	2357,13
	Materiais de consumo para limpeza e material de escritório	1	353,57	353,57
<i>Total materiais de consumo</i>				2.710,70

4.6.4 Cálculo de Serviços

Para o cálculo de Serviços (energia elétrica), foi considerado o consumo de cada equipamento utilizado no processo e o tempo de utilização mensal, conforme demonstrado abaixo.

Tabela 17 - Cálculo do consumo mensal com energia elétrica

Descrição do equipamento	Nº	Potência (W)	Consumo médio mensal (KWw/h)	Horas mensais	Valor mensal
Ar condicionado 12000 btu	1	1400	504	240	218,80
Microcomputador	2	200	144	240	62,51
Impressora laser	1	360	21,6	20	7,94
Centrífuga sorológica de tubos	1	640	115,2	120	50,01
QIA Simphony	1	1400	252	120	109,4
Centrífuga de microplacas	1	900	1,35	1	0,50
Refrigerador	1	50	36	720	13,24
Freezer -80°C	1	1100	792	720	343,82
Freezer -20°C	1	110	79,2	720	39,38

Real time	2	1080	64,8	40	28,13
Centrífuga de microtubos	1	500	30	40	11,03
Banho-maria seco	1	250	15	40	5,52
Capela de fluxo laminar	1	88	5,28	40	1,94
Capela DNA workstation	1	70	4,2	40	1,54
Total					893,76

Fonte: <http://www.ceee.com.br/pportal/ceee/Component/Controller.aspx?CC=1221>

Para o cálculo do custo com a água, foi considerado o consumo diário de 17 litros por pessoa e 10 litros para serviços de limpeza, conforme especificado na tabela 8 do item 3.14.4. Foi considerado ainda, que o laboratório teria 7 pessoas trabalhando, considerando o pessoal técnico e o de limpeza. Desta forma, o consumo mensal seria de 256 litros ou 2,56 m³.

Segundo simulação realizada no site da Copasa, para um imóvel comercial, o valor mensal pago pelo consumo de água levantado e taxa de esgoto seria de R\$ 42,61 (figura 23).

Para o cálculo do custo com internet e telefonia, segundo estimativa da União Internacional de Telecomunicações, considerando um consumo de 132 minutos de telefone por mês e uma taxa de 4,14% do salário mínimo para a internet banda larga, o custo mensal com esses serviços ficaria em R\$ 212,00.

Página inicial Orientações ao Cliente

Serviços - Cálculo da Conta (Simulação)

Localidade: **BELO HORIZONTE**

	Comercial
Água	1
Esgoto	1

Volume simulado: **3 m3**

Tarifa de **Água:** R\$ 22,42
 Tarifa de **Esgoto:** R\$ 20,19

Data da simulação 01/03/2015.

Figura 23 - Cálculo da taxa de água para estabelecimento comercial

Fonte: <http://www2.copasa.com.br/servicos/calculofatura/valorFatura.asp>

Após a realização dos cálculos acima, foi elaborada a tabela 18, que traz o compilado do custo com serviços como telecomunicações, energia elétrica e água para um período de um mês.

Tabela 18 - Estimativa do custo mensal com Serviços

Item	Parâmetro	Qtdade	Custo unitário base	Custo Mensal
Serviços	Telecomunicações (internet/telefone) ⁴	1	212,00	212,00
	Energia elétrica	1	893,76	893,76
	Água	1	42,61	42,61
Total serviços				1.148,37

4.6.5 Cálculo do Custo com o Imóvel

Considerou-se, após simulação de layout, que o laboratório teria uma metragem 100 m². O valor do m² na região centro sul, segundo o CRECI MG, eestava na faixa de R\$ 5.000,00, no ano em que o levantamento foi realizado (2014). Considerando a taxa de 0,5% para fins de aluguel, o valor do aluguel de um laboratório de 100 m² na região centro sul (0,5%), custaria R\$ 5.000,00. A esse valor foi acrescida a taxa estimada de 4% para manutenção predial, totalizando R\$5.200,00.

Tabela 19 - Estimativa do Custo mensal com imóvel

Item	Parâmetro	Qtde	Custo unitário base	Custo Mensal
Imóvel	Imóvel comercial: ⁵	1	5.000,00	5.000,00
	Manutenção predial (4%)	1	200,00	200,00
<i>Total imóvel</i>				5.200,00

4.6.6 Cálculo do valor gasto com manutenção e depreciação de mobiliário e equipamentos

Para o cálculo com manutenção e depreciação de mobiliário e equipamento, foi calculado o custo com manutenções preventivas/corretivas, calibrações, qualificação térmica de freezers e refrigeradores, bem como a depreciação de equipamentos e mobiliário.

4.6.6.1 Manutenção, calibração e qualificação térmica

A listagem dos equipamentos necessários e o custo mensal estimado com manutenção, calibração e qualificação térmica destes equipamentos está apresentado nas tabelas 20, 21 e 22.

Tabela 20 – Equipamentos necessários e a estimativa do custo mensal com manutenções preventivas/corretivas

Equipamento	Quantidade
Centrífuga sorológica de tubos	01
Centrífuga de microplacas	01
Refrigerador	01
Freezer -80°C	01
Freezer -20°C	01
Real time	01
Centrífuga de microtubos	01
Banho-maria seco	01
Vortex	01
Capela de fluxo laminar	01
Mini-Centrífuga	01
Pipeta 100 – 1000 µL	02
Pipeta 20-100 µL	02
Pipeta 0,5-10 µL	02
Capela DNA workstation	01
Valor total anual	R\$ 15840,00
Valor Mensal	R\$ 1320,00

Fonte: Empresa WF Tecnologia Científica Ltda

Tabela 21 - Valor estimado do custo mensal com a calibração de equipamentos

Equipamento	Número	VALORES UNITÁRIOS ESTIMADOS	VALOR TOTAL ESTIMADOS
Centrífuga sorológica de tubos	2	R\$ 70,00	R\$ 140,00
Centrífuga de microtubos	2	R\$ 70,00	R\$ 140,00
Banho-maria seco	2	R\$ 85,00	R\$ 170,00
Centrífuga de microplacas	1	R\$ 70,00	R\$ 70,00

Capela de fluxo laminar	1	R\$ 690,00	R\$ 690,00
Pipeta 100 - 1000	2	R\$ 45,00	R\$ 90,00
Pipeta 20-100	2	R\$ 45,00	R\$ 90,00
Pipeta 0,5-10	2	R\$ 45,00	R\$ 90,00
Capela DNA workstation	1	R\$ 690,00	R\$ 690,00
TOTAL SEMIANUAL			R\$ 2.170,00
TOTAL ANUAL			R\$ 3.140,00
TOTAL MENSAL			R\$ 361,67

Fonte: Empresa Medição Soluções Metrológicas Integradas

Tabela 22 - Valor estimado do custo mensal com a qualificação térmica dos freezers e refrigeradores

Nº	Equipamento	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
1	Refrigerador	1	R\$750,00	R\$750,00
2	Freezer -80°C	1	R\$750,00	R\$750,00
3	Freezer -20°C	1	R\$750,00	R\$750,00
Total anual				R\$ 2.250,00
Total mensal				R\$ 187,50

4.6.6.2 Cálculo geral da Manutenção de equipamentos analíticos

Após a coleta de valores para as manutenções preventivas/corretivas, calibrações e qualificação térmica, apresentados nas tabelas 20, 21 e 22, chegou-se ao valor de R\$ 1.869,17, conforme demonstrado na tabela 23.

Tabela 23 - Custo com manutenção, calibração e qualificação térmica dos equipamentos

Descrição	Valor Mensal
Manutenções preventivas/corretivas	R\$ 1.320,00
Calibração	R\$ 361,67
Qualificação Térmica	R\$ 187,50
TOTAL	R\$ 1.869,17

4.6.6.3 Depreciação de equipamentos e mobiliário

Para o cálculo da depreciação anual de equipamentos e mobiliário foi considerado como base, as Instruções Normativas SRF n.ºs. 162/98 e 130/99, que preconizam para os itens abaixo, uma depreciação anual de 10%. A partir deste valor, foi feito o cálculo da depreciação mensal de 10% para os equipamentos e mobiliários listados na tabela 24.

Tabela 24 – Cálculo do custo com a depreciação de equipamentos e mobiliário

Descrição	Nº	Valor	Valor total	Depreciação anual
Ar condicionado 12000 btu	1	R\$ 2.000,00	R\$ 2.000,00	R\$200,00
Microcomputador	2	R\$ 1.797,80	R\$ 3.595,60	R\$359,56
Impressora laser	1	R\$ 500,00	R\$ 500,00	R\$50,00
Centrífuga sorológica de tubos	1	R\$ 17.000,00	R\$ 17.000,00	R\$1.700,00
Centrífuga de microplacas	1	R\$ 9.288,00	R\$ 9.288,00	R\$928,00
Refrigerador	1	R\$ 29.078,00	R\$ 29.078,00	R\$2.907,80
Freezer -80°C	1	R\$ 22.012,50	R\$ 22.012,50	R\$2.201,25

Freezer -20°C	1	R\$ 670,00	R\$ 670,00	R\$67,00
Real time	2	R\$ 90.242,61	R\$ 180.485,22	R\$18.048,52
Centrífuga de microtubos	1	R\$ 4.600,00	R\$ 4.600,00	R\$460,00
Banho-maria seco	1	R\$ 18.000,00	R\$ 18.000,00	R\$1.800,00
Vortex	1	R\$126,00	R\$126,00	R\$12,60
Capela de fluxo laminar	1	R\$ 6.242,00	R\$ 6.242,00	R\$624,20
Pipeta 100 - 1000	2	R\$ 605,00	R\$ 1.210,00	R\$121,00
Pipeta 20-100	2	R\$ 281,90	R\$ 563,80	R\$56,38
Pipeta 0,5-10	2	R\$ 281,90	R\$ 563,80	R\$56,38
Capela DNA workstation	1	R\$ 6.500,00	R\$ 6.500,00	R\$650,00
Cadeira de bancada	4	R\$ 177,74	R\$ 710,96	R\$71,09
Bancada central	1	R\$ 3.000,00	R\$ 3.000,00	R\$300,00
Mesa escritorio	1	R\$ 209,44	R\$ 209,44	R\$20,94
Cadeira de escritório	1	R\$ 423,45	R\$ 423,45	R\$42,34
Total anual				R\$30.677,88
Total mensal				R\$2.556,49

4.6.6.4 Cálculo da estimativa do custo mensal com equipamentos e mobiliário

Após a coleta dos valores estimados para manutenção e depreciação de equipamentos, chegou-se no valor mensal de R\$4.425,66, conforme tabela 25.

Tabela 25- Estimativa do custo mensal com equipamentos e mobiliário

Item	Parâmetro	Qtde	Custo unitário mensal(R\$)	Custo Total mensal (R\$)
Mobiliário e equipamentos				
	Manutenção de equipamentos analíticos	1	1869,17	1869,17

Depreciação do mobiliário e equipamentos	1	2556,49	2556,49
Total mobiliário e equipamentos			4.425,66

4.6.7 Estimativa do custo de Insumos e reagentes por teste de genotipagem fetal não-invasiva

Os insumos e reagentes necessários para a realização da genotipagem RHD fetal e sua contribuição para a composição do custo do teste está demonstrada na tabela abaixo.

Tabela 26 - Custo dos Insumos e Reagentes para a Genotipagem RHD fetal automatizada

Atividade	Descrição	Nº por teste	Unidade	Valor Unitário	Valor/teste
Separação plasma	Tubos Eppendorf	6	Unidade	R\$ 0,07	R\$ 0,40
	Ponteiras	1	Unidade	R\$ 0,06	R\$ 0,06
Purificação de DNA	Kit extração automatizado	1	Unidade	R\$ 27,93	R\$ 27,93
	Álcool 100%	0,5	MI	R\$ 0,37	R\$ 0,18
PCR ALB	Microplaca Albumina	0,01	Unidade	R\$ 20,78	R\$ 0,22
	Adesivo Óptico	0,01	Unidade	R\$ 9,06	R\$ 0,09
	ALB Foward	0,00030	Teste	R\$ 84,00	R\$ 0,03
	ALB Reverse	0,00030	Teste	R\$ 84,00	R\$ 0,03
	ALB Probe	0,00151	Teste	R\$ 598,57	R\$ 0,91
	Kit Taqman mastermix	0,00300	Teste	R\$ 1.688,75	R\$ 5,07
	Água Albumina	8,2	MI	R\$ 0,00001	R\$ 0,00
	Ponteira p100 (20 a 100)	2	Unidade	R\$ 0,14	R\$ 0,27
	Ponteira P10 (0,5 a 10)	3	Unidade	R\$ 0,13	R\$ 0,40
PCR RHD	Microplaca RHD	0,01	Unidade	R\$ 20,78	R\$ 0,23

	Adesivo Óptico	0,01	Unidade	R\$ 9,06	R\$ 0,09
	EX5 Foward	0,00030	Teste	R\$ 84,00	R\$ 0,03
	EX5 Reverse	0,00030	Teste	R\$ 84,00	R\$ 0,03
	EX5 Probe	0,00151	Teste	R\$ 598,57	R\$ 0,91
	EX7 Foward	0,00030	Teste	R\$ 84,00	R\$ 0,03
	EX7 Reverse	0,00030	Teste	R\$ 84,00	R\$ 0,03
	EX7 Probe	0,00151	Teste	R\$ 598,57	R\$ 0,91
	Kit Taqman mastermix	0,00300	Teste	R\$ 1.688,75	R\$ 5,07
	Água RHD	3,2	MI	0,000011	R\$ 0,00
	Ponteira p100 (20 a 100)	2	Unidade	0,14	R\$ 0,27
	Ponteira P10 (0,5 a 10)	6	Unidade	0,13	R\$ 0,81
Aplicação de DNA	Ponteira P10 (0,5 a 10)	1	Unidade	0,13	R\$ 0,13
Total					R\$ 44,10

4.6.8 Planilha geral de custo mensal de um laboratório de genotipagem RHD fetal

O gasto mensal estimado com recursos humanos foi de R\$ 11.513,99. Os encargos sociais gerados, considerando o regime CLT, foi de R\$ 10.680,00.

O gasto mensal estimado com materiais de consumo para a execução de serviços gerais e limpeza foi de R\$2.710,70. O gasto mensal estimado com serviços de telecomunicação, energia elétrica e água foi de R\$1.148,37.

O gasto mensal estimado para um imóvel localizado na região centro-sul de Belo Horizonte foi de R\$5.200,00.

O gasto geral estimado com manutenção e depreciação de equipamentos e mobiliário foi de R\$4.425,66.

A partir das informações acima, foi realizado um compilado do custo mensal de um laboratório de genotipagem RHD fetal, obtendo-se um custo estimado mensal de R\$ 35.679,48, conforme tabela 27 abaixo.

Tabela 27 - Estimativa do custo mensal de um laboratório e genotipagem RHD fetal não-invasiva

Despesas mensais para o funcionamento de um Laboratório de Genotipagem RHD fetal						
Item	Parâmetro	Qtde	Custo unitário mensal (R\$)	Custo Mensal (R\$)		Custo mensal Total (R\$)
				mínimo	máximo	
		(a)	(b) base			(a*b)
Recursos Humanos (RH)	Farmacêutico, Biólogo, Biomédico ¹	2	2.479,88	1.652,29	3.646,46	4.959,76
	Técnico de Patologia Clínica ¹	4	1.355,14	1.167,81	1.742,56	5.420,56
	Auxiliar Administrativo	1	993,67	803,14	1.017,30	993,67
	Capacitação/Treinamento	7	20,00	10,00	30,00	140,00
<i>Total recursos humanos</i>						11.513,99
Encargos sociais	13º salário (9,75%)	1	1.108,96			1.108,96
	Férias (+1/3 das férias) (13,00%)	1	1.478,62			1.478,62
	INSS, FGTS e alimentação (57,00%)	1	6.483,17			6.483,17
	Vale-transporte ²	7	130,00			910,00
	Benefícios (uniforme)	7	100,00			700,00
<i>Total encargos sociais RH</i>						10.680,76
Materiais de consumo	Serviços gerais, materiais de higiene e limpeza	1	2.357,13			2357,13
	Materiais de consumo para limpeza e material de escritório	1	353,57			353,57
<i>Total materiais de consumo</i>						2.710,70
Serviços	Telecomunicações (internet/telefone) ⁴	1	212,00			212,00

	Energia elétrica	1	893,76	893,76
	Água	1	42,61	42,61
Total serviços				1.148,37
Imóvel	Imóvel comercial: ⁵	1	5.000,00	5.000,00
	Manutenção predial (4%)	1	200,00	200,00
Total imóvel				5.200,00
Mobiliário e equipamentos				
	Manutenção de equipamentos analíticos	1	1869,17	1869,17
	Depreciação do mobiliário e equipamentos	1	2556,49	2556,49
Total mobiliário e equipamentos				4.425,66
Total				35.679,48
Notas: ¹ Fonte: RAIS – Elaboração: Estação de Pesquisa de Sinais de Mercado – EPSM/NESCON/FM/UFMG. ; ² Valor de passagem: ida e volta de ônibus para o município de Belo Horizonte; ³ Valor calculado a partir do contrato da SES-MG para manutenção e desenvolvimento do SIGAF; ⁴ Fonte União Internacional de Telecomunicações; ⁵ Fonte: Conselho Regional de Corretores de Imóveis – CRECI-MG				

4.6.9 Cálculo do custo do teste de Genotipagem RHD fetal não-invasiva automatizada

Considerando-se a demanda máxima de 1.678 testes (75% da demanda) e a demanda mínima de 671 testes (30%), o custo do teste foi calculado a partir da média desses valores, que é de 1.175 testes. Desta forma, dividiu-se o custo mensal total de R\$35.679,48 por esse valor, obtendo-se o valor de R\$ 30,37, o qual foi acrescido ao valor do material de consumo necessário por testes, que é de R\$ 44,10. Sendo assim, o custo médio do teste de genotipagem fetal não-invasiva é de R\$ 74,47.

4.7 Cálculo do Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas

A idade gestacional mínima das gestantes participantes do presente estudo, foi de 5. Sendo assim, foi considerado um período de atendimento entre 5 e 40 semanas, totalizando 35 semanas de acompanhamento para gestantes não-sensibilizadas.

4.7.1 Cenário 1

Conforme especificado na tabela abaixo, o custo estimado do acompanhamento de uma gestante não sensibilizada no cenário 1 foi de R\$ 522,78.

Tabela 28 Custo do Protocolo de Atendimento a Gestante não sensibilizada com feto RhD negativo no cenário 1

Gestante Não Sensibilizada no Cenário 1			
Procedimento	Qtde	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Consulta Médica(USB)	9	39,00	351,00
Coombs Indireto	6	28,63	171,78
Total			522,78

4.7.2 Cenário 2

Para o cenário 2 foram calculados dois custos: o custo em caso de feto RhD positivo e o custo em caso de feto RhD negativo.

Conforme especificado abaixo, o custo do acompanhamento de uma gestante não sensibilizada gestando feto RhD negativo foi de R\$ 382,94 e gestando feto RhD positivo foi de R\$ 914,34.

Tabela 29 - Custo do Protocolo de Atendimento a Gestante Não Sensibilizada com feto RhD negativo

Gestante Não Sensibilizada com feto RhD negativo no Cenário 2			
Procedimento	Qtde	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Genotipagem RHD fetal	2	74,47	148,94
Consulta Médica(USB)	6	39,00	234,00
Total			382,94

Tabela 30 - Custo do Protocolo de Atendimento a Gestante com feto RhD positivo

Gestante Não Sensibilizada com feto RhD Positivo no Cenário 2			
Procedimento	Qtde	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Genotipagem RHD fetal	1	74,47	74,47
Consulta Médica(UBS)	9	39,00	351,00
Coombs Indireto	9	28,63	257,67
Imunoprofilaxia RhD antenatal	1,00	231,20	231,20
Total			914,34

4.8 Cálculo do Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D

Para o cálculo do Protocolo para Atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D, foi considerado o cenário 3, que é o protocolo atualmente utilizado pelo CEMEF/UFMG e o cenário 4, que é o protocolo com a inclusão do teste de genotipagem *RHD* não-invasiva.

4.8.1 Gestante sensibilizada no Cenário 3

Para gestantes sensibilizadas foi considerado um período de acompanhamento entre 5 e 37 semanas, totalizando, portanto, 32 semanas de acompanhamento.

O custo estimado do Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D, no Cenário 1, de alto Risco, não considerando ainda, a Transfusão Intrauterina, é de R\$ 18,952,37. O custo estimado para gestantes sensibilizadas de Baixo Risco foi de R\$21.827,84, conforme demonstrado nas tabelas 31 e 32.

Tabela 31 – Custo do Protocolo de Gestante Sensibilizada com Feto de Alto Risco no cenário 3

Gestante Sensibilizada com feto RhD Positivo de Alto risco			
Procedimento	Qtde	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Consulta Médica (Especialista)	15	227,25	3.408,75
Coombs Indireto com titulação	8	286,30	2.290,40
ICF	13	169,68	2.205,84
PVS	13	824,16	10.714,08
Cordocentese	1	333,30	333,30
Total			18.952,37

Tabela 32 - Custo do Acompanhamento de Gestante sensibilizada com feto de Baixo Risco no Cenário 3

Gestante Sensibilizada com feto RhD Positivo de Baixo risco			
Procedimento	Qtde	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Consulta Médica (Especialista)	16	227,25	3.636,00
Coombs Indireto com titulação	8	286,30	2.290,40
ICF	16	169,68	2.714,88
PVS	16	824,16	13.186,56
Total			21.827,84

4.8.2 Gestante sensibilizada no Cenário 4

No cenário 4, considera-se a introdução do teste de genotipagem RHD não-invasiva no protocolo para atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D. Desta forma, calculou-se o custo estimado do protocolo para atendimento para gestantes com fetos genotipados como *RHD* negativo, conforme tabela 33.

Para fins de cálculo do impacto da introdução do testes na rotina para gestantes sensibilizadas com feto RhD positivo, será considerado o custo já calculado anteriormente, para gestantes sensibilizadas com fetos que evoluíram para alto e baixo risco para anemia.

4.8.2.1 Gestante Sensibilizada com feto RhD negativo

No cenário 4, conforme demonstrado na tabela abaixo, o custo estimado do Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizada com anti-D com feto RhD negativo foi de R\$ 632,72.

Tabela 33 - Custo do Protocolo de Atendimento a gestante sensibilizada por anti-D com feto RhD negativo no cenário 4

Gestante Sensibilizada por anti-D com feto RhD negativo			
Procedimento	Qtde	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Genotipagem RHD fetal	2	74,47	148,94
Consulta Médica(UBS)	8	39,00	312,00
Coombs Indireto	6	28,63	171,78
Total			632,72

4.9 Avaliação do Impacto Financeiro da Introdução da Genotipagem RHD fetal no Protocolo de Acompanhamento a Gestantes RhD negativo

A avaliação do impacto financeiro da introdução do teste de Genotipagem *RHD* no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo será dado pela diferença do impacto entre os protocolos 1 e 2, para gestantes não-sensibilizadas e 3 e 4, para gestantes sensibilizadas.

Para gestantes sensibilizadas, foi considerado um período de um ano. Para gestantes não-sensibilizadas, considerou-se o impacto na gestação atual e numa gestação futura, pois levou-se em conta a chance de aloimunização dessa gestante, caso a imunoprevenção anti-D antenatal seja administrada ou não.

4.9.1 Cálculo do impacto do Cenário 1 – Gestante não sensibilizada

Conforme esquema abaixo, o quantitativo A foi o número estimado de gestantes RhD negativo num período de um ano, no estado de Minas Gerais, que foi de 26.840 gestantes.

A frequência de gestantes RhD negativo não-sensibilizadas obtida no presente estudo foi de 81,3%. Desta forma, o quantitativo B foi de 21.821 gestantes. O custo do atendimento de gestantes RhD negativo não-sensibilizadas foi de R\$522,78. Multiplicando-se esse valor a B, obteve-se o valor B', que foi de R\$11.407.582,38.

Considerando que 70% das gestantes estarão gestando fetos RhD positivos, calculou-se o quantitativo B1, que foi de 15.275 gestantes. Obteve-se, então, o valor B1', multiplicando-se a C o valor da imunoprevenção anti-D pós natal, que foi estimada em R\$231,20. Desta forma, B1' foi R\$3.531.580,00.

Considerando que no cenário 1 não é administrada a imunoprevenção anti-D antenatal, calculou-se o quantitativo C, multiplicando-se o quantitativo B à frequência estimada de gestantes que se tornariam sensibilizadas num segundo evento (1,5% de B). O quantitativo C foi de 327 gestantes.

Considerando-se que 42,4% dessas gestantes terão fetos que evoluirão para Alto risco, obteve-se o quantitativo de 139 gestantes (C1). Multiplicando-se o valor deste protocolo, que foi de R\$18.952,37 a C1, obteve-se o valor C1' que foi de R\$2.634.379,43. Considerando-se que 57,6% dessas gestantes terão fetos que evoluirão para Baixo risco, obteve-se o quantitativo de 188 gestantes (C2). Multiplicando-se o valor deste protocolo, que foi de R\$21.827,84 a C2, obteve-se o valor C2' que foi de R\$4.103.633,92.

O impacto total do cenário 1 para gestantes sensibilizadas foi obtido pela soma $B'+C'+D1'+D2'$, que foi de R\$21.677.175,73, conforme demonstrado na figura 24.

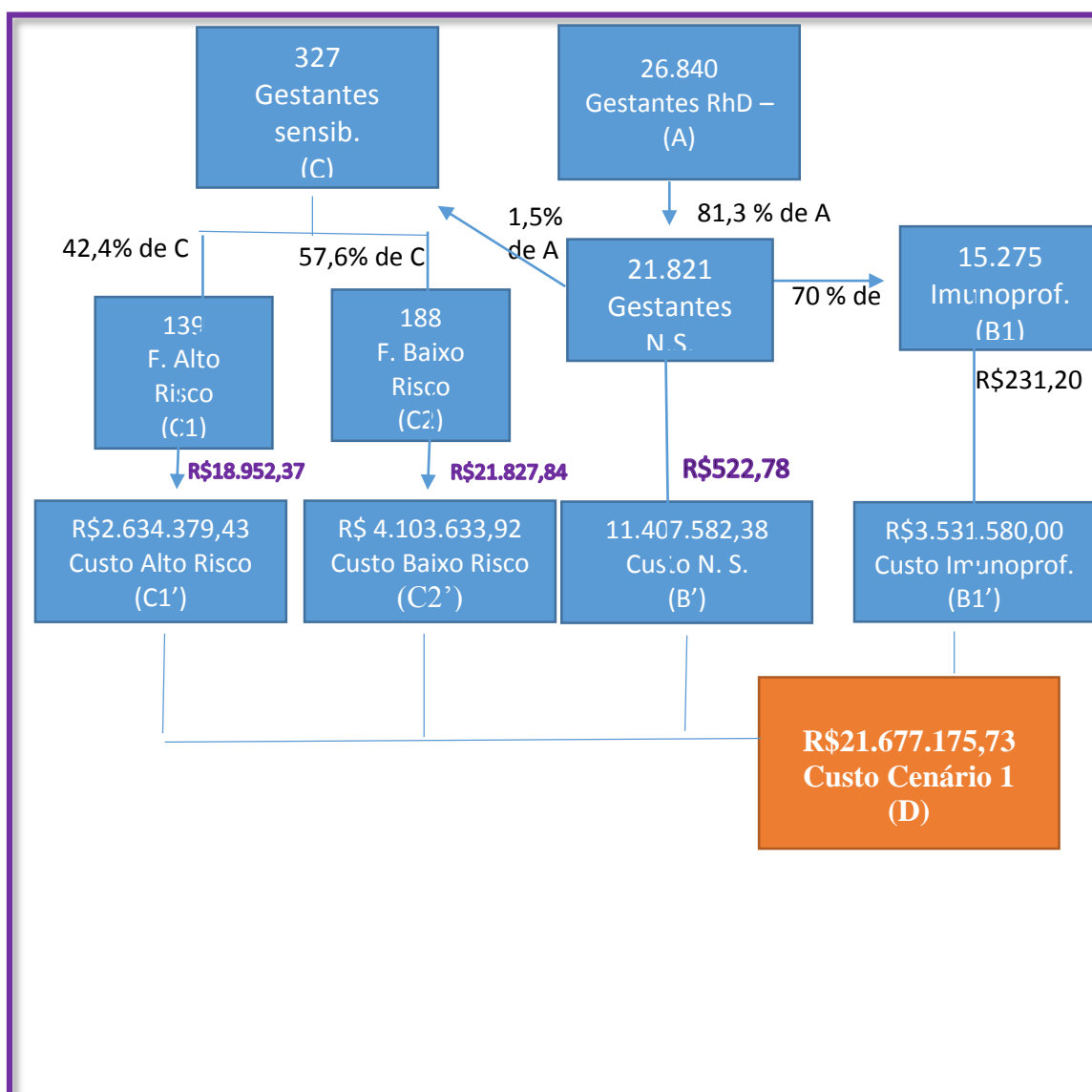


Figura 24 - Impacto do cenário 1- Gestante não sensibilizada

Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão não-sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes não-sensibilizadas do presente estudo (81,3%A).

B': Custo do Acompanhamento de Gestantes RhD negativo não-sensibilizadas no Cenário 1.

B1: Estimativa do número de Gestantes RhD negativo com fetos RhD positivos, calculada a partir da frequência de gestantes RhD negativo, com fetos RhD positivo, encontrada no presente estudo (70%B).

B1': Custo da Administração da Imunoprofilaxia pós natal a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas, com feto RhD positivo.

C: Quantitativo estimado de gestantes RhD negativo, que se tornariam sensibilizadas num segundo evento, calculado a partir de 1,5% de A.

C1: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Alto risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Alto risco para anemia fetal (42,4%) relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C2: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Baixo risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Baixo risco para anemia fetal (57,6%), relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C1': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Alto risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Alto risco.

C2': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Baixo risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Baixo risco.

D: Soma dos valores $B'+B1'+C1'+C2'$, que é o valor do Acompanhamento de Gestantes RhD negativo, não-sensibilizadas, no cenário 1.

4.9.2 Cálculo do impacto do Cenário 2 – Gestante não sensibilizada

Da mesma forma que o cenário 1, o quantitativo A foi o número estimado de gestantes RhD negativo num período de um ano, no estado de Minas Gerais, utilizado para o cálculo do impacto do cenário 1 foi de 26.840 gestantes (A).

A frequência de gestantes RhD negativo não-sensibilizadas obtida no presente estudo foi de 81,3%. Desta forma, o quantitativo B foi de 21.821 gestantes (B).

Considerando-se que 73,5% e 26,5% dos fetos serão genotipados como RHD positivo ou inconclusivo e RHD negativo, respectivamente, chegou-se aos quantitativos de 16.038 (B+) e 5.783 (B-). A B+ foi multiplicado o custo do protocolo de acompanhamento a gestantes não-sensibilizadas com fetos RhD positivo (R\$914,34) e a B-, o custo do Acompanhamento a gestante não sensibilizada com feto

RHD negativo (R\$ 382,94) no cenário 2, obtendo-se os valores de R\$14.664.184,92 (B+) e R\$2.214.542,02 (B-).

Assim como no cenário 1, temos que avaliar o impacto da administração ou não da imunoprofilaxia antenatal. Desta forma, considerando que no cenário 2, a imunoprofilaxia anti-D antenatal é administrada, calculou-se a frequência de gestantes que se tornariam sensibilizadas num segundo evento (0,2% de B), obtendo-se o quantitativo de 44 gestantes (C).

Considerando-se que 42,4% e 57,6% das gestantes estarão gestando fetos de alto e baixo risco, respectivamente, chegou-se aos quantitativos de 19 (C1) e 25 (C2). A esses valores multiplicou-se o custo do protocolo de gestantes sensibilizadas com fetos de alto risco (R\$ 18.952,37) e baixo risco (R\$ 21.827,84), respectivamente, obtendo-se os valores de R\$ 360.095,03 (C1') e R\$ 545.696,00 (C2').

O impacto do cenário 2 (D), foi então obtido, somando-se os valores $C1'+C2'+B+B'$.

Desta forma, o impacto do protocolo 2 para gestantes não-sensibilizadas foi de R\$ 17.784.517,97.

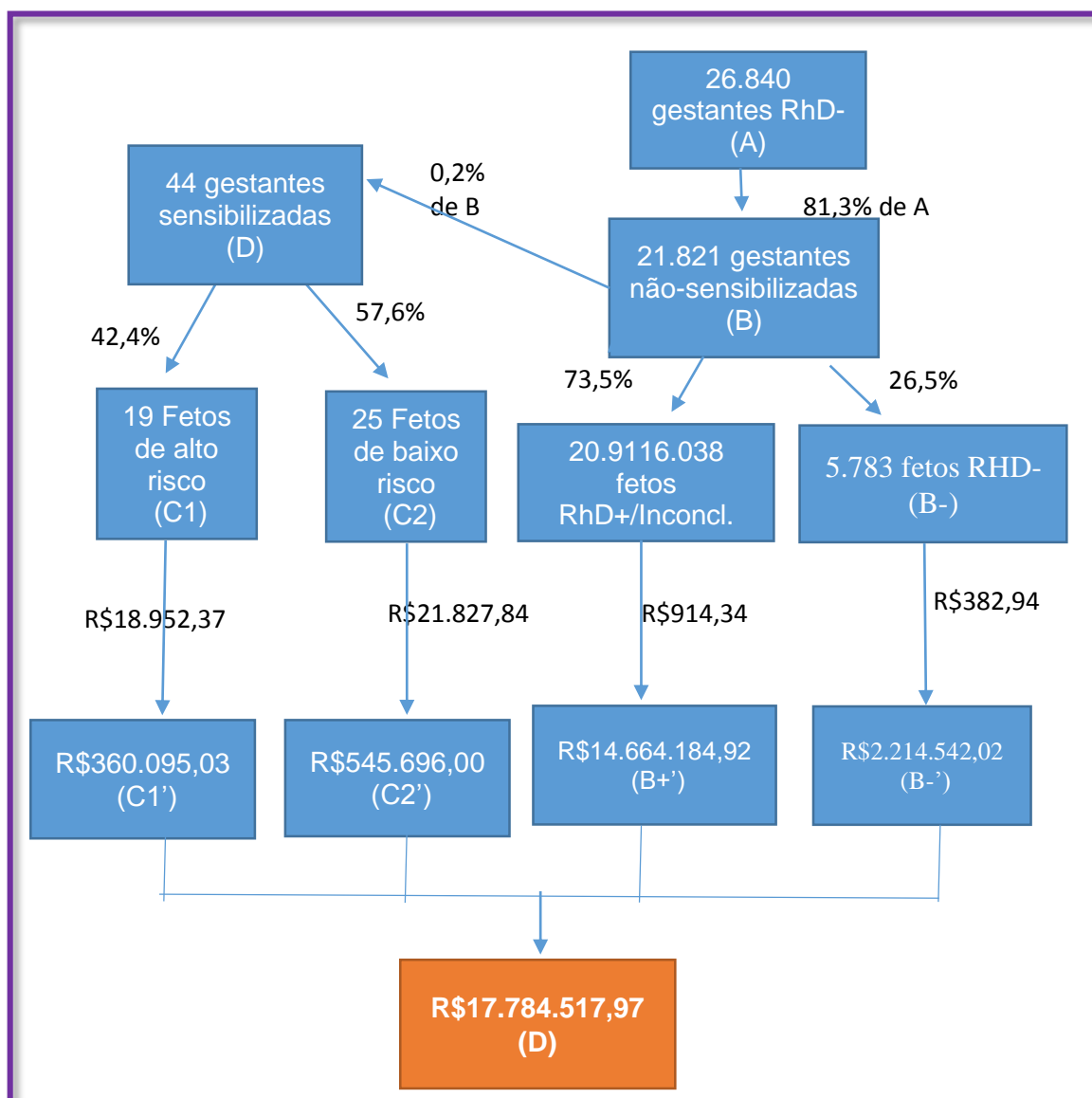


Figura 25 - Impacto do cenário 2 – Gestante não sensibilizada

Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão não-sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes não-sensibilizadas do presente estudo (81,3%A).

B+: Estimativa do quantitativo de fetos que serão *RHD* positivos e inconclusivos (73,5%B) na genotipagem *RHD* fetal não-invasiva, calculado a partir da frequência de fetos *RHD* positivos e inconclusivos do presente estudo.

B-: Estimativa do quantitativo de fetos que serão *RHD* negativos (26,5%B) na genotipagem *RHD* fetal não-invasiva, calculado a partir da frequência de fetos *RHD* negativos do presente estudo.

B+': Estimativa do custo do Protocolo para Atendimento a gestantes RhD negativo, com fetos RHD positivos ou inconclusivos.

B-': Estimativa do custo do Protocolo para Atendimento a gestantes RhD negativo, com fetos RHD negativos.

C1: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Alto risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Alto risco para anemia fetal (42,4%) relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C2: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Baixo risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Baixo risco para anemia fetal (57,6%), relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C1': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Alto risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Alto risco.

C2': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Baixo risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Baixo risco no cenário 3.

D: Valor obtido pela soma de $B+'+B-'+C1'+C2'$, que é o valor do Acompanhamento de Gestantes RhD negativo, não-sensibilizadas, no cenário 2.

4.9.3 Avaliação do impacto da introdução do teste de genotipagem RHD fetal no Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo não-sensibilizadas

A adoção do teste de genotipagem RHD fetal no Protocolo para Atendimento a gestantes RhD negativo no estado de Minas Gerais, num período de 1 a 2 anos, considerando-se o impacto de cada cenário numa próxima gestação, levaria a uma economia de R\$ 3.892.723,76.

4.10 Cálculo do Impacto da Genotipagem RHD fetal não-invasiva no Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo Sensibilizada

Para o cálculo do impacto da introdução do teste de genotipagem *RHD* fetal não-invasiva no Protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas levou em conta o impacto dos cenários 3 e 4, que são, o protocolo hoje utilizado no CEMEF/UFMG e o protocolo proposto a partir da introdução do teste de genotipagem RHD negativo no acompanhamento de gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D, respectivamente, no período de 1 ano.

4.10.1 Cálculo do impacto do Cenário 3 – Gestante sensibilizada

Conforme esquema abaixo, o quantitativo A, número estimado de gestantes RhD negativo num período de um ano, no estado de Minas Gerais, foi de 26.840 gestantes.

A frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D, obtida no presente estudo foi de 16,5%. Desta forma, o quantitativo B foi de 4.429 gestantes.

A frequência estimada de gestantes sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para baixo risco utilizada foi de 57,6%. Desta forma, o valor C foi de 2.551 gestantes. Considerando o custo estimado do protocolo de atendimento a gestantes aloimunizadas com fetos de baixo risco de R\$ 21.827,84, o valor C' foi de R\$55.682.819,84.

A frequência estimada de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para alto risco utilizada foi de 42,4%. Desta forma, o valor D foi de 1.878 gestantes. Considerando o custo estimado do protocolo de atendimento a gestantes aloimunizadas com fetos de Alto risco de R\$ 18.952,37, o valor D' foi de R\$ 35.592.550,86.

Considerando que, 41,3% dos fetos de alto risco irão necessitar de TIU, calculou-se o quantitativo de 776 fetos (D1). A esse valor multiplicou-se o custo de uma TIU, R\$363,60, e obteve-se o valor de R\$ 282.153,60 (D1').

Considerando-se que 45,3% das gestantes com fetos de alto risco irão necessitar de EXT, obteve-se o quantitativo D2 de 850 RN. A partir das frequências de 64,7%, 14,7%, 14,7%, 2,9% e 2,9% para fetos que necessitarão de 1, 2, 3, 4 e 5 EXT, respectivamente, obteve-se os quantitativos 550 (D2a), 125 (D2b), 125 (D2c), 25 (D2d) e 25 (D2e). A esses quantitativos multiplicou-se o custo do respectivo número de EXT (1, 2, 3, 4 e 5), cujo valor estimado foi de R\$363,60, obtendo-se os valores D2a', D2b',

D2c', D2d', D2e', que foram R\$199.980,00; R\$90.900,00; R\$136.350,00; R\$36.360,00 e R\$45.450,00, respectivamente.

Somando-se os valores C'+D'+D1'+ D2a'+ D2b'+ D2c'+ D2d'+ D2e', obteve-se o valor de R\$92.066.564,30.

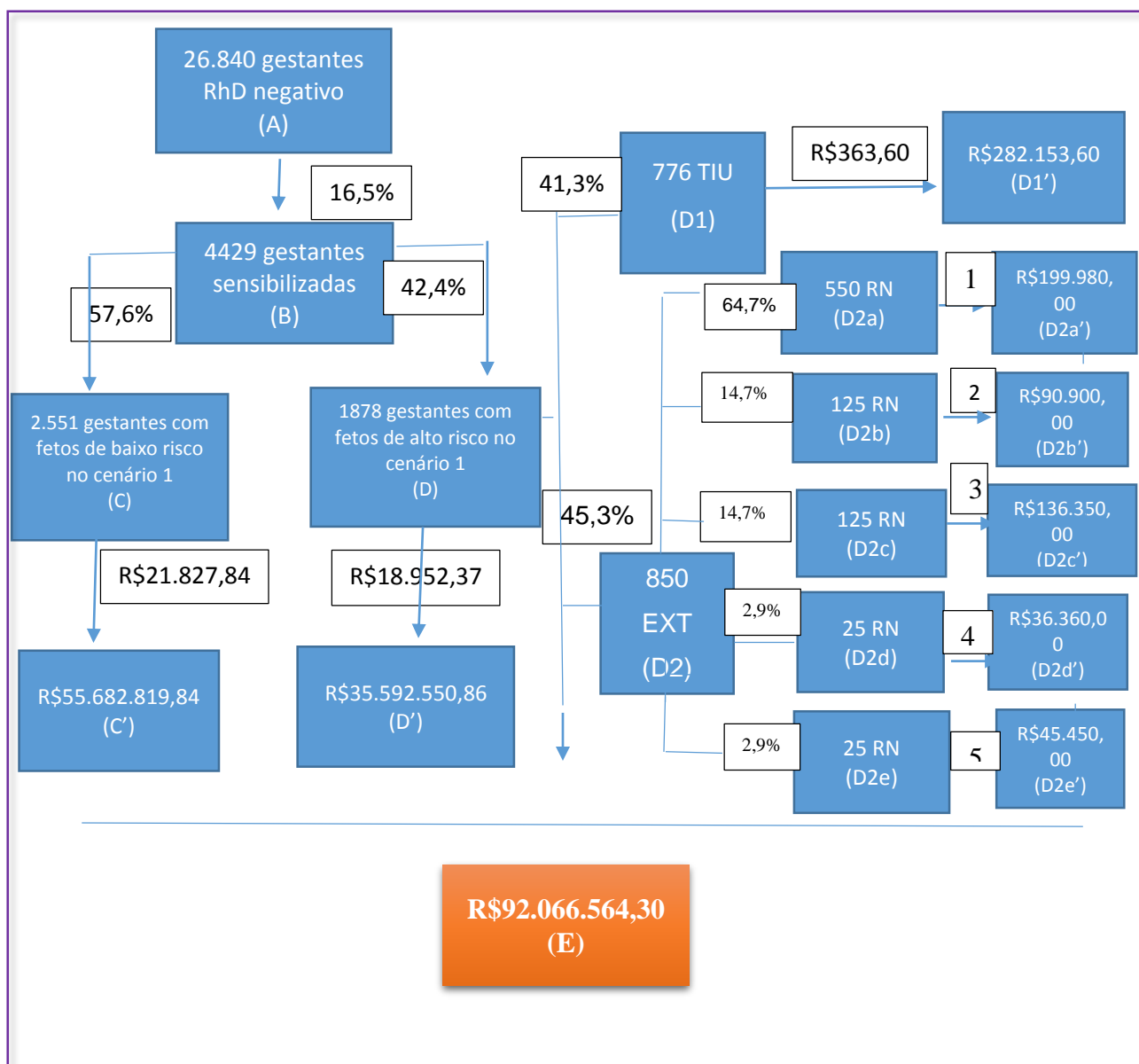


Figura 26 - Impacto do cenário 3 – Gestante sensibilizada
Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes sensibilizadas do presente estudo (16,5%A).

C: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Baixo risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Baixo risco para anemia fetal (57,6%), relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

D: Quantitativo estimado da frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas, cujos fetos evoluirão para o status de Alto risco para anemia. Valor estimado a partir da frequência de gestantes, cujos fetos evoluíram para o status de Alto risco para anemia fetal (42,4%) relatado por Osanan e colaboradores (OSANAN, 2010).

C': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Baixo risco, obtido após multiplicar C ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Baixo risco.

D': Valor estimado do custo do Acompanhamento de Gestantes com fetos de Alto risco, obtido após multiplicar C1 ao Custo do Protocolo para Acompanhamento de Gestantes Sensibilizadas com fetos de Alto risco.

D1: Quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de TIU, calculada, multiplicando-se o número de fetos que poderão se tornar de alto risco para anemia, pela frequência de fetos que necessitaram de TIU (41,3%), encontrada em estudo realizado no CEMEFÉ/MG (VILLASCHI, 2012).

D1': Valor estimado do custo com o procedimento de TIU para gestantes com fetos de alto risco para anemia. Para se obter esse valor, foi multiplicado o quantitativo D1 ao custo da TIU, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 363,60.

D2: Quantitativo estimado de RN de alto risco que necessitarão de EXT, calculada multiplicando-se o número de fetos que poderão se tornar de alto risco para anemia, pela frequência de RN que necessitaram de EXT (45,3%), encontrada em estudo realizado no CEMEFÉ/MG (VILLASCHI, 2012).

D2a: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 1 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 64,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 1 EXT ao nascimento..

D2b: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 2 EXT ao nascimento.

D2c: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 3 EXT ao nascimento.

D2d: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 4 EXT ao nascimento.

D2e: Quantitativo estimado de RN que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 5 EXT.

D2a': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 1 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2a ao valor de 1 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 363,60.

D2b': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2b ao valor de 2 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 727,20.

D2c': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2c ao valor de 3 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.090,80.

D2d': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2d ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.454,40.

D2e': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2e ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.818,00.

E: Valor obtido pela soma dos custos $C'+D'+D1'+D2a'+D2b'+D2c'+D2d'+D2e'$, que é o custo total do impacto previsto para o acompanhamento de gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 3.

4.10.2 Cálculo do impacto do Cenário 4 – Gestante sensibilizada

A média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano (A) estimada foi de 26.840 gestantes.

A frequência de gestantes RhD negativo sensibilizadas por anti-D, obtida no presente estudo foi de 16,5%. Desta forma, o quantitativo B foi de 4429 gestantes.

A estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos serão RHD negativo (B-) foi de 1174 fetos e dos fetos que serão RHD positivo ou inconclusivo (B+) foi de 3.255 fetos. O valor a ser gasto com os fetos RhD negativo (B-) foi de R\$742.813.

A estimativa de fetos que evoluirão para o perfil de fetos de Baixo risco (C) foi de 898 fetos e a de fetos que evoluirão para o perfil de fetos de Alto risco (D) foi de 1380 fetos. Os valores C' e D' estimados foram de R\$19.601.400,32 e R\$26.154.270,60, respectivamente.

O quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de TIU (F), foi de 570 fetos e o custo total estimado deste procedimento para esses fetos foi de R\$207.252,00.

O quantitativo estimado de gestantes com fetos de alto risco que necessitarão de exsanguineotransfusão (F2) foi de 625 fetos. A partir desse quantitativo, estimou-se que 405 fetos necessitarão de 1 EXT, 92 necessitarão de 2, 92 necessitarão de 3, dezoito, necessitarão de 4 e 18 necessitarão de 5 exsanguineotransfusões. Os valores respectivos a esses protocolos foram de de R\$147.258,00; R\$66.902,40; R\$100.353,60; R\$26.179,20 e R\$32.724,00.

O valor do impacto do cenário (G) foi de R\$47.079.153,82.

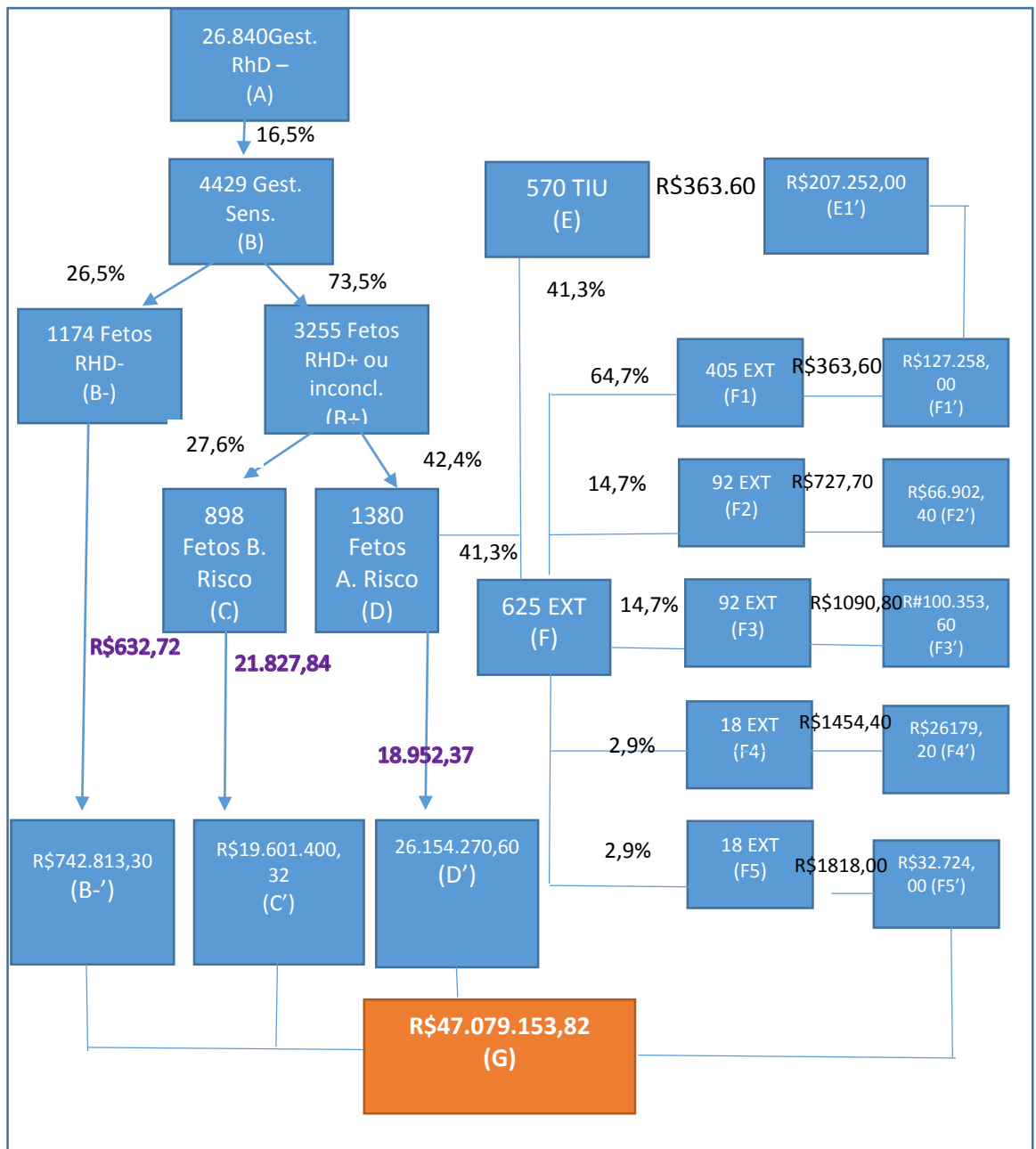


Figura 27 - Impacto do cenário 4 – Gestante sensibilizada

Legenda:

A: Média das gestações de mulheres RhD negativo no Estado de Minas Gerais num período de 01 ano.

B: Estimativa do número de gestantes RhD negativo que serão sensibilizadas, calculado a partir da frequência de gestantes sensibilizadas do presente estudo ($X\%A$).

B-: Estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos serão RHD negativo na genotipagem RHD e foi obtida, calculando $X\%$ de B, que foi a frequência de fetos RHD negativos do presente estudo.

B-': Valor obtido multiplicando-se B- ao custo do protocolo do Acompanhamento de uma gestante RhD negativo, sensibilizada, gestando feto com resultado *RHD* negativo na genotipagem *RHD*.

B+: Estimativa de gestantes sensibilizadas, cujos fetos serão *RHD* positivo ou inconclusivo e foi obtida, calculando-se Y% de B, que é a frequência de fetos *RHD* positivos e inconclusivos do presente estudo.

C: Quantitativo estimado do número de gestantes RhD negativo, aloimunizadas, com fetos RhD positivo, que evoluirão para o perfil de fetos de Baixo risco. Valor obtido, calculando-se 27,6% de B+.

D: Estimativa de gestantes sensibilizadas, com fetos RhD positivo, cujos fetos evoluirão para o perfil de fetos de Alto risco, o qual foi obtido calculando-se 42,4% de B+.

C': Custo do Protocolo para Atendimento a gestantes sensibilizadas, com feto de Baixo risco.

D': Custo do Protocolo para Atendimento a gestantes sensibilizadas com fetos de Alto Risco.

E: Quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de TIU

E': Custo estimado do acompanhamento de fetos que necessitarão de TIU.

F: Quantitativo estimado de fetos de alto risco que necessitarão de EXT ao nascimento, calculada multiplicando-se o número de fetos que poderão se tornar de alto risco para anemia, pela frequência de fetos que necessitaram de EXT (45,3%), encontrada em estudo realizado no CEMEFE/MG (VILLASCHI, 2012).

F1: Quantitativo estimado dos RN que necessitarão de 1 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 64,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 1 EXT.

F2: Quantitativo estimado dos RN que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 2 EXT.

F3: Quantitativo estimado dos RN que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 3 EXT.

F4: Quantitativo estimado dos RN que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 2,9%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 4 EXT

F5: Quantitativo estimado dos RN que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2 a 14,7%, que é a frequência de fetos de alto risco para anemia que necessitaram de 5 EXT.

F1': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 1 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2a ao valor de 1 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 363,60.

F2': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 2 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2b ao valor de 2 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 727,20.

F3': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 3 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2c ao valor de 3 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.090,80.

F4': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 4 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2d ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.454,40.

F5': Valor estimado o custo com os RN que necessitarão de 5 EXT, obtido, multiplicando-se o quantitativo D2e ao valor de 4 EXT, que, segundo a tabela AMB 92 é de R\$ 1.818,00.

G: Valor obtido pela soma dos custos B-' + C'+D'+E'+F1'+F2'+F3'+F4'+F5', que é o custo total do impacto previsto para o acompanhamento de gestantes RhD negativo sensibilizadas no cenário 4.

4.10.3 Avaliação do impacto da introdução do teste de genotipagem RHD fetal no Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo sensibilizadas

Estima-se que a implantação do teste de genotipagem *RHD* fetal no Protocolo de Atendimento a gestantes RhD negativo no estado de Minas Gerais, num período de 1 ano, levaria a uma economia de R\$ 44.987.410,50.

5. Discussão

A genotipagem *RHD* fetal não-invasiva permite a predição do fenótipo RhD do feto a partir da análise de DNA fetal livre no plasma materno. Essa abordagem fornece uma total segurança ao feto e à gestante, do ponto de vista da coleta de material para o teste, ao contrário das genotipagens *RHD* invasivas, que não são isentas de risco ao feto ou à gestante. Além disso, não é influenciada por gestações prévias, já que o DNA fetal livre desaparece da circulação materna poucas horas após o parto. Todavia, o sucesso do teste está relacionado à quantidade de DNA fetal presente na amostra, que em geral é muito baixa, o que pode causar resultados falso-negativos.

Para as gestantes participantes do presente estudo, a idade média gestacional à época da coleta de sangue foi de 27 semanas, semelhante à de outros estudos previamente publicados (FINNING et al., 2008; BROJER et al., 2005; AVENT & REID, 2000). A idade gestacional mínima foi de cinco semanas e mesmo neste período precoce foi possível detectar a presença do gene *RHD* fetal na amostra de plasma materna coletada, evidenciando a sensibilidade do teste.

A frequência de gestantes na primeira gestação (33,9%) foi inferior à frequência de gestantes com mais de uma gestação (66,1%). Dentre estas, quase metade delas (45,7%) tinham histórico de aborto em gestações passadas, mostrando uma taxa relativamente alta de abortos. Dentre as gestantes com histórico de aborto, 62,7% tinham coombs indireto negativo e 37,3% tinham coombs indireto positivo, como resultado de aloimunização. Destas, 85,6% tinham produzido o anti-D, o que mostra a alta morbidade associada ao anti-D (MOLLISON et al., 1997) e a importância da determinação precoce do fenótipo RhD fetal, ainda durante a gestação, para o adequado acompanhamento gestacional.

O anti-C foi o segundo aloanticorpo mais frequente, sendo que em todos os casos estava acompanhado do anti-D. Entretanto, devido ao fato de hemácias contendo os antígenos D e C também conterem o antígeno G (Reid & Lomas-Francis, 2012), há uma grande chance destas gestantes terem produzido o anti-G e não a associação anti-D +C. Nesse caso, uma gestante não sensibilizada poderia deixar de receber a imunoprofilaxia, devido a um diagnóstico errôneo da presença do anti-D. Desta forma, é de suma relevância que o laboratório que realize a identificação dos anticorpos irregulares em gestantes, tenha o protocolo de diferenciar anti-D+ anti-C de anti-G.

Entre as gestantes aloimunizadas, sete (13,9%) estavam em sua primeira gestação, quando não se espera aloimunização. Todavia, três delas (42,9%) tinham recebido transfusão sanguínea previamente, sendo que três delas (66,6%)

desenvolveram anti-D e uma (33,4%), o anti-M. Esse fato leva à observação de que mulheres RhD negativo têm recebido transfusão de componentes RhD positivo, comprometendo gestações futuras. Provavelmente, esses hemocomponentes foram erroneamente fenotipados como RhD negativo, ilustrando as discrepâncias de fenotipagem causadas pelo antígeno D (WESTHOFF, 2007). Por outro lado, 4 (57,1%) das gestantes aloimunizadas em sua primeira gestação, não tinham recebido transfusões sanguíneas prévias, tinham histórico de aborto. Esse fato leva à discussão sobre como essas gestantes se tornaram aloimunizadas, já que as maiores chances de aloimunização ocorrem por conta de transfusões incompatíveis ou gestação. Uma explicação para o fato pode ser a de que algumas mulheres engravidam e sofrem abortos espontâneos sem perceberem.

O aloanticorpo mais frequente entre as gestantes aloimunizadas ainda é o anti-D (CORREA, 2004), embora, com a introdução da imunoprofilaxia anti-D há cerca de 40 anos, era de se esperar que a frequência de DHPN associada a esse anticorpo fosse diminuir. Essa realidade sugere que possivelmente as gestantes RhD negativo não estejam sendo apropriadamente acompanhadas, nem estejam recebendo a imunoprofilaxia anti-D adequadamente (NARDOZZA, 2005). Isto é reforçado pela alta incidência de DHPN por nascidos vivos, relatada no Brasil. Em 2006, essa incidência era de 10,5:21.000 e em 2010, foi para 18,4: 21.000 (DATASUS). Esse valor é cerca de quase vinte vezes a incidência encontrada na Europa em 2004, que era de 1:21.000 (FIINNING et al., 2008).

A frequência encontrada de 70% de fetos com fenótipo RhD positivo e 30% com fenótipo RhD negativo está em consonância com os dados relatados na literatura, que estão em torno de 60% para o fenótipo RhD positivo e 40% para o RhD negativo (FINNING et al., 2008; MARTINE et al., 2006; AVENT & REID, 2000). Considerando-se essa frequência, cerca de 70% das gestantes RhD negativo deveriam receber a imunoprofilaxia anti-D antenatal, caso não estivessem sensibilizadas, como forma de reduzir a probabilidade de aloimunização. Por outro lado, cerca de 30% delas poderiam ser acompanhadas numa Unidade Básica de Saúde (UBS).

Outro aspecto relevante é que, segundo a FEBRASGO, as gestantes com coombs indireto positivo não precisam receber a imunoprofilaxia anti-D. Esse protocolo é questionável, já que nem toda gestante RhD negativo com coombs indireto positivo tem o anti-D. Nesse estudo, verificou-se que 10 (15,6%) das gestantes aloimunizadas tinham outros anticorpos, que não o anti-D e por isso, deveriam receber a imunoprofilaxia anti-D. Desta forma, a exemplo do que ocorre no CEMEFE/UFMG, toda gestante com coombs indireto positivo deve realizar a identificação do anticorpo

irregular (painel de hemácias) para se ter certeza para qual anticorpo está sensibilizada.

Quanto à fenotipagem RhD, tanto para a fenotipagem materna quanto para a dos recém nascidos, houveram discrepâncias. Três gestantes foram excluídas de genotipagem *RHD* fetal por serem, na verdade, RhD positivas e um dos recém nascidos teve a fenotipagem do sangue de cordão divergente da fenotipagem do sangue venoso. Esses casos nos levam a uma necessária discussão sobre as metodologias e os reagentes que têm sido utilizados para a fenotipagem RhD. Em relação à tipagem das gestantes, tem sido recomendado, utilizar reagentes anti-D IgM que não detectem o D parcial, como o DVI-, um dos D parciais mais frequentes na nossa população, com o intuito de considerá-las, para fins de protocolo pré-natal e de administração da imunoprofilaxia anti-D, como gestantes RhD negativo. Em relação aos recém-nascidos, o uso de reagentes anti-D IgM e IgG, que detectem o antígeno D, fracamente expresso, se faz necessária e obrigatória, segundo a portaria ministerial 2712, de novembro de 2013. Entretanto, essas condutas, extremamente necessárias, nem sempre têm sido adotadas no Brasil.

Por ser altamente polimórfico, a análise do gene *RHD* envolve a pesquisa de mais de uma região do gene, pois numerosas variantes *RHD* já foram descritas, como *RHD Ψ* e genes híbridos *RHD-CE-D*. Devido à ocorrência dessas variantes, o fenótipo RhD do recém-nascido pode ser positivo ou negativo, dependendo do reagente ou da metodologia utilizada e do genótipo dos pais. Por isso, no teste desenvolvido neste estudo, se na genotipagem *RHD* fetal houve amplificação de apenas uma região do gene *RHD*, esta foi considerada inconclusiva, a fim de evitar inferências errôneas, que poderão impactar de forma drástica o acompanhamento clínico das gestantes RhD negativo. Neste estudo, houveram nove resultados inconclusos de genotipagem *RHD* fetal devido à amplificação de apenas um exon do gene *RHD*, o que implica em uma taxa de 3,7% de resultados inconclusivos. Essa taxa é concordante com as relatadas em estudos realizados no Reino Unido, China e Estados Unidos, que variou de 3,4 a 6% (FINNING et al., 2008; ATAMANIUK et al., 2009; GEIFMAN-HOLZMAN et al., 2006). A maioria (88,9%) dos resultados inconclusivos foi devido à amplificação apenas do exon 7 e um deles (11,1%) à amplificação apenas do exon 5. Esse perfil de genótipo pode estar associado ao genótipo *RHD Ψ* ou ao gene híbrido *RHD-CE-D*. Em africanos, 67% de portadores do fenótipo RhD negativo têm o *RHD Ψ* e em 15% deles, o *RHD-CE-D* (Cde^s) (AVENT & REID, 2000). Em brasileiros, apesar de 87% dos casos de fenótipo RhD negativo estarem relacionados à deleção do gene *RHD*, 11% se devem ao *RHD Ψ* e 15% deles, ao *RHD-CE-D* (Cde^s). Isto provavelmente se deve ao alto nível de miscigenação encontrada em nosso país, o que aumenta a frequência de

alelos *RHD* variantes, raros em outros países (RODRIGUES, 2002). No entanto, esta frequência não invalida a grande utilidade do teste de genotipagem *RHD* fetal na prática clínica, mesmo em países com população miscigenada.

Neste estudo, a concordância da genotipagem *RHD* fetal realizada a partir de DNA fetal livre no plasma materno com o fenótipo do recém-nascido foi de 93,1%. A concordância obtida foi similar aos dados de estudos previamente publicados, conforme mostrado na tabela 4 da introdução.

A sensibilidade encontrada no presente estudo foi de 97,3%, sendo que houve 4 resultados falso negativos. Em metade dos casos de falso negativo, as gestantes estavam no segundo trimestre e na outra metade, no terceiro trimestre de gestação, nos levando a acreditar que os falso negativos não ocorreram devido à baixa quantidade de DNA fetal, mas a problemas na execução da técnica ou nos reagentes, principalmente devido ao grande período de estocagem dos iniciadores e sondas no final do estudo.

A especificidade foi de 82,1%, devido a 12 falso positivos. Acreditamos que esse número se deve à contaminação nas amostras ou ao grande período de estocagem dos iniciadores e sondas, repercutindo em ampliações inespecíficas.

O valor preditivo positivo encontrado para a genotipagem *RHD* foi de 92,4% e o valor preditivo negativo foi de 93,2%. Entretanto, é importante ressaltar que a proporção de resultados falso negativos foi relativamente baixa, não impedindo que a genotipagem *RHD* não-invasiva seja utilizada como uma ferramenta bastante útil no acompanhamento de gestantes RhD negativo. Todavia, seria prudente, em casos de genotipagem *RHD* fetal negativa, repetir o teste em estágios mais avançados da gestação e manter os coombs indireto trimestralmente, conforme considerado para o cálculo do impacto do protocolo a gestantes não-sensibilizadas com resultado negativo na genotipagem *RHD* fetal, a fim de se detectar precocemente a DHPN. Essa conduta não traria um aumento significativo no custo do protocolo de atendimento a essas gestantes, principalmente quando comparado à alta morbidade associada a fetos de alto risco atendidos em estágio avançado da doença.

Por outro lado, resultados falso-positivos poderiam levar a um acompanhamento mais minucioso de uma gestante portando feto RhD negativo e a administração desnecessária da imunoprofilaxia antenatal, mas mesmo assim, não representariam um grande impacto no protocolo, já que esse feto não evoluiria para alto risco, não demandando, durante o acompanhamento, procedimentos invasivos de alto custo e de alta morbidade.

A estimativa da frequência de gestantes sensibilizadas do presente estudo, que foi de 16,5%, levou em consideração apenas a frequência encontrada para gestantes

da segunda parte do estudo, já que na primeira parte foram colhidas amostras de gestantes do CEMEFE/UFMG, onde grande parte delas era sensibilizada e na segunda parte do estudo foram colhidas amostras de gestantes do Ambulatório de risco habitual também.

Durante a avaliação do custo dos protocolos aplicados para gestantes sensibilizadas, observa-se que o custo do protocolo de gestantes com fetos que evoluem para o baixo risco foi maior que o de gestantes com fetos de alto risco. Essa diferença se fez presente, devido ao maior tempo de acompanhamento de gestantes com fetos de baixo risco, que foi considerado de 37 semanas, enquanto que para as de alto risco seria de 34 semanas. Essa observação poderia ser levada em conta por parte da equipe médica, responsável pela elaboração dos protocolos para gestantes com fetos de baixo risco, podendo haver redução do número de testes realizados ou um maior espaçamento entre eles. Além disso, é importante ressaltar que o custo maior com gestantes de alto risco é evidenciado quando se leva em conta o número de TIU e EXS que se seguirão a esse protocolo.

Só no Estado de Minas Gerais, a avaliação do impacto financeiro da introdução do teste de genotipagem *RHD* fetal no protocolo de acompanhamento de gestantes RhD negativas, não-sensibilizadas, demonstrou que haveria uma economia de aproximadamente R\$4.000.000,00 em um período médio de um ano. O impacto financeiro não foi tão significativo. Entretanto, haveria um significativo impacto assistencial, pois, cerca de 6.000 mulheres estariam gestando fetos RhD negativo e, portanto, poderiam ser atendidas em Unidades Básicas de Saúde (UBS), desafogando os serviços secundários. Isso levaria a um melhor acompanhamento das gestantes de fetos RhD positivos, além de reduzir a ansiedade de milhares de gestantes. Todavia, o aspecto mais importante é a possibilidade de se administrar a imunoprofilaxia antenatal a mulheres gestando fetos RhD positivo, reduzindo a chance de sensibilização de cerca de 1,5% para 0,2%, o que demonstrou ter um grande impacto numa próxima gestação, tanto do ponto de vista assistencial quanto do financeiro, já que o custo do acompanhamento de uma gestante sensibilizada é muitas vezes maior do que o de uma gestante não sensibilizada.

Caso a genotipagem RHD fetal fosse introduzida no acompanhamento pré-natal a gestantes sensibilizadas, geraria uma economia de cerca de R\$45.000.000,00, a cada ano, só no estado de Minas Gerais. Esse impacto é muito superior ao impacto para gestantes não-sensibilizadas, o que reforça ainda mais a necessidade de implantação do teste de genotipagem RHD fetal para gestantes sensibilizadas. Além do significativo impacto financeiro, ainda haveria o impacto assistencial, pois, cerca de 1.200 gestantes de fetos RhD negativo poderiam ser atendidas em Unidades Básicas

de Saúde (UBS), desafogando os serviços secundários. Isso levaria a um melhor acompanhamento das gestantes de fetos RhD positivos, à redução no custo do atendimento e à redução da ansiedade das gestantes, médicos e familiares.

A avaliação do impacto dos protocolos não levou em conta o custo com internação hospitalar, fototerapia e demais procedimentos relativos ao acompanhamento do neonato.

Testes moleculares são geralmente considerados como de alto custo para os gestores de saúde pública, que muitas vezes associam inovação com grandes investimentos em equipamentos e insumos. No entanto, a análise do custo da genotipagem *RHD* fetal não-invasiva revelou que o teste pode ser realizado a um baixo custo (em torno de R\$ 74,47) e a introdução desse teste no protocolo de atendimento, tanto de gestantes sensibilizadas quanto não-sensibilizadas, demonstrou que haveria uma grande economia de recursos na área da saúde caso o teste fosse implantado na rotina de pré-natal de gestantes RhD negativo.

6 Conclusão

Conclui-se que cerca de 25,8% das gestantes RhD negativo do presente estudo, estavam sensibilizadas, sendo que 21,8% delas tinham produzido o anti-D e 74,2% não estavam aloimunizadas. Destas, 70% estavam gestando fetos RhD positivo e, portanto, deveriam receber a imunoprofilaxia anti-D antenatal, associado à imunoprofilaxia pós-natal e 30% estavam gestando fetos RhD negativos e poderiam ser consideradas sem risco, evitando seu desnecessário acompanhamento em serviço médico especializado.

A genotipagem *RHD* fetal não-invasiva, desenvolvida e analisada neste estudo, apresentou uma boa sensibilidade, podendo ser realizada a partir da 5ª semana de gestação. Por ser uma metodologia sensível, de baixo custo e não-invasiva, o teste da genotipagem *RHD* fetal a partir do plasma materno tem grande potencial de uso na prática clínica, podendo ser considerada uma importante ferramenta no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo.

A introdução do teste de genotipagem *RHD* fetal não-invasiva no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo, não-sensibilizadas, representaria um grande impacto financeiro e assistencial, principalmente pela possibilidade de administração da imunoprofilaxia anti-D antenatal, reduzindo drasticamente a chance de sensibilização dessas gestantes.

A introdução do teste de genotipagem *RHD* fetal não-invasiva no protocolo de atendimento a gestantes RhD negativo, sensibilizadas, representaria um impacto financeiro e assistencial maior ainda, devido ao alto custo do acompanhamento a essas gestantes.

7 Referências bibliográficas

AABB Technical Manual. 15th edition. Bethesda: Mark E. Brecher. 2005

ALA, S.; LEEZA, O.; REEMAN K. A new fetal RHD genotyping test: Costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy and Childbirth*, v.11, n.5, p. 3-8, 2011.

AMARAL, D.R.T.; CREDIDIO, D.C.; PELLEGRINO JR, J.; CASTILHO, L. Fetal RHD Genotyping by Analysis of Maternal Plasma in a Mixed Population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Brazil, v.25, p.100-104, Nov., 2011.

ALIZADEH, M. et al.. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*, Rennes, v.99, n.12, p. 4618-4625, Jun., 2002.

ALLEN, C. et al.. Hypermethylated RASSF1A em Maternal Plasma: A Universal fetal DNA Marker that Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Clinical Chemistry*, v. 52, p. 2211-2218, Oct., 2006.

ATAMANIUK, J. et al.. Comparison of PCR Methods for Detecting Fetal RHD in maternal Plasma. *Clin. Lab. Anal.*, Vienna, v. 23, n.1, p. 24-28, 2009.

AVENT, N.D. et al.. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, Bristol, v.21, n.2, p. 175-179, April, 2009.

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.

AVENT, N.D.; REID, M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood*, Bristol, v. 95, n. 2, p. 375-387, Jan., 2000.

BELIARD, R. Monoclonal anti-D antibodies to prevent alloimmunization: lessons from clinical trials. *Transfus Clin Biol.*, França, v. 13, n. 1-2, p. 58-64, Mar-Apr. 2006.

BENNET, P.R. et al.. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *New England Journal Medicine*, London, v. 329, n.9, p. 607-610, Aug. 1993.

- BIANCHI, D.W. et al.. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc National Academy of Science USA*, Boston, v.93, n.2, p.705-708, Jan., 1996.
- BOWMAN, J. M. The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. *Semin Perinatol*, Manitoba, v. 21, n. 1, p. 39-44, Febr. 1997.
- BOWMAN, J.M. Treatment options for the fetus with alloimmune hemolytic disease. *Transfus Med Rev*, Manitoba, v. 4, n.3, p. 191-207, Jul. 1990.
- 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.
- CABRAL, A.C.V. et al. Cardiofemoral index as an ultrasound marker of fetal anemia in isoimmunized pregnancy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, Brazil, v.100, p. 60-64, 2008.
- CARBONNE, B. et al.. Non invasive fetal RhD genotyping using maternal blood: time for use in all RhD negative pregnant women. *Gynecol Obstet Fertil*, Paris, v. 36, n. 2, p. 200-203, Feb., 2008.
- CHAN, L.Y. et al. Serial analysis of fetal DNA concentration in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem*, v.49, n.4, p.678-680, 2003.
- CHAN K. et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem*. V. 52, p. 2211-2218, 2006.
- CHAN, K.C. et al.. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*., Hong Kong, v.50, n. 1, p. 88-92, Jan., 2004.
- CHEN, Q.; FLEGEL, W.A. Random survey for RHD alleles among D+ European persons. *Transfusion*, Ulm v. 45, n. 7, p. 1183-1191, Jul. 2005.
- 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.

CHIU, RW; MURPHY, MF; FIDLER, C. et al.. Determination of RhD zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion* 2003; 43: 335-9.

COLIN, Y. et al.. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. *Blood*, Paris, v. 78, n. 10, p. 2747-2752, Nov. 1991.

CORREA, M. et al.. *Noções práticas de Obstetrícia*. 3. ed. Belo Horizonte: Coopmed; 2004. 915 p.

COSTA, J.M et al.. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *British Journal of Haematology*, França, v. 119, n. 1, p. 255-260, Oct. 2002.

DANIELS, G. et al.. Fetal blood group genotyping from DNA plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn (Review). *Vox Sanguinis*, Bristol, v. 87, n.4, p. 225-232, Nov. 2004.

DATASUS. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php>>. Acesso em 06 ago.2014.

DENOMME, G.A; FERNANDES, B.J. Fetal blood group genotyping. *Transfusion*, Toronto, v.47, n.1S, p.64-68S, Jul., 2007.

DOVC-DRNOVSEK, T. et al. Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD genotyping from Maternal Plasma. *Transfusion Medicini and Hemotherapy*. Slovenia, v.40, p. 37-43, Ap., 2013.

FAAS, BH; BECKERS, EA; WILDOER P, et al. Molecular back-ground of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion* 1997; 37:38-44.

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

FINNING, K.; MARTIN, P.; DANIELS, G. A Clinical Service in the UK to Predict Fetal Rh (Rhesus) D Blood Group Using Free Fetal DNA in Maternal Plasma. *Ann. NY. Acad. Sci.*, Bristol, v. 1022, p. 119 – 123, Jun., 2004.

FINNING, K.M et al.. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, Bristol , v.42, n. 8, p.1079-1085, Aug. 2002.

FLEGEL WA. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion* (47S): 47-53S, 2007.

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab*, Germany, v. 48, n. 1-2, p. 53-58, 2002

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.

GEIFMAN-HOLTZMAN, O.; GROTEGUT, C.A.; GAUGHAN, J.P. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood- a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.*, Philadelphia, v. 195, n. 4, p. 1163-1173, Oct., 2006.

GOODSTEIN, M. *Neonatal red cell transfusion*. In: HERMAN JH, MANNO CS. *Pediatric transfusion therapy*. Bethesda: MD: AABB Press, 2002. p. 39-91.

GROOTKERK-TAX, M.G. et al.. The highly variable RHD locus in non white persons hampers RHD zygosity determination but yields more insight into RH-related evolutionary events. *Transfusion*, Amsterdam, v. 45, n. 3, p.327-337, Mar., 2005.

GROOTKERK-TAX, M.G.H.M. et al.. Evaluation of prenatal *RHD* strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*, Amsterdam, v. 46, n. 12, p. 2142-2148, Dec., 2006.

GUPTA, A.K. et al.. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles in vitro. *Clin Chem.*, Basel, v.50, n.11, p. 2187-2189, Nov., 2004.

HARMENING, D.M. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. In: KENNEDY MS, KRUGH D. *Hemolytic Disease of Newborns and Fetus*. 15th edition Philadelphia: , F>A> Davis Company, 2005. Cap. 20, p. 383-395.

<http://www.anvisa.gov.br/sangue/legis/resolucoes.htm>. Acesso em 21 de jun.2010.

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-vs-traditional-pcr.html>

ISBT-Blood Group Allele Terminology. Available at: [http:// www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogeneticsand-blood-group-terminology/blood-group-terminology/ blood-group-allele-terminology/](http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogeneticsand-blood-group-terminology/blood-group-terminology/blood-group-allele-terminology/). Accessed on 05/11/2013. 11) Wagner F, Flegel WA.

JOHNSON, K.L. et al.. Interlaboratory Comparison of Fetal Male DNA detection from Common Maternal Plasma samples by Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*, v. 50, n.3, p. 516-521, 2004.

KUMPEL, B.M. Monoclonal anti-D development programme. *Transpl Immunol.*, Reino Unido, V. 10, N. 2-3, p. 199-204, Aug. 2002.

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.

LEGLER. T.J. et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.*, v.27, n.9., p.824-829, Jun., 2007.

LO, D. et al.. Prenatal Diagnosis of Fetal RhD Status by Molecular Analysis of Maternal Plasma. *N. Eng. J Med.*, Hong Kong, v. 339, n. 24, p. 1734-1738, Dec., 1998.

LO, Y.M. et al.. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, Reino Unido, v.350, n.9076, p.485-487, Aug., 1997.

LOBATO, M.M. et al.. Blood group genotyping to solve inconclusive phenotyping cases of patients from the Hemominas Foundation. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 252-259, Aug. 2009.

MAASKANT-VAN W.P.A. et al.. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*, Rotherdan, v.38, n. 11-12, p.1015-1021, 1998.

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.

MANNIING, F. *Medicina Fetal: Perfil Biofísico. Princípios e aplicabilidade*. 1.ed. São Luiz: Revinter; 2000.

MARTINE, G.H.M. et al.. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*, Amsterdam, v.46, n.12, p.2142-2148, Dec., 2006.

MATHESON, K.A., DENOMME, G.A. Novel 3' Rhesus box sequences confound RHD zygosity assignment. *Transfusion*, Ontario, v. 42, n. 5, p. 645-650, May., 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Informações de saúde [Internet]. [cited 2011 Nov 20]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/fet10uf.def>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Caderno de Atenção Básica – Atenção ao Pré Natal de Baixo Risco. Série A. Normas e Manuais Técnicos Cadernos de Atenção Básica, nº 32 – 2012. Disponível em http://www.medlearn.com.br/ministerio_saude/atencao_basica/cadernos_atencao_basica_32_atencao_pre_natal_baixo_risco.pdf

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.

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. *Blood Transfusion In Clinical Medicine*. In: *Haemolytic disease of the fetus and the newborn*. 10th edition. Oxford: England: Blackwell Science, 1997. Cap. 12, p. 390-424.

MOREIRA G., BORDIN J.O., KURODA A., KERBAUY J.; Red Blood cell alloimmunization in sickle cell disease: The influence of racial and antigenic pattern differences between donors and recipients in Brazil. *Am J Hematol.*, v. 52, p. 197-200, 1996.

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.

NARDOZZA, L.M.M. et al. Pregnancy outcome for Rh-alloimmunized women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 90, p. 103-106, 2005.

NOVARETTI MCZ. *Estudo dos grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo*. 2010. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 1995.

OSANAN, G.C. *Análise multivariada dos fatores determinantes da mortalidade perinatal de fetos submetidos à transfusão sanguínea intraútero por anemia decorrente da isoimunização materna*. 2010. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós graduação Saúde da Mulher, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

PAGE-CHRISTIAENS, G.C. et al. Use of bi-allelic insertion-deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience. *Ann N Y Acad Sci.*, v.1075; p.123-129, 2006.

PEREIRA, A.K.; CABRAL, A.C.V.; LEITE, H.V. *Manual de Protocolos em Medicina Fetal*. 1ª edição. São Paulo: Brasil: Editora Ateneu, 2012. Cap.4, p. 27-32.

PERCO, P. et al.. Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion*, Vienna, v. 43, n. 3, p. 335-339, Mar., 2003.

REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C. *Blood Group Antigen Facts Book*. 2nd ed. New York: Elsevier Academic Press, 2012. 561 p.

REIS, Z.S.N. et al. Diagnosis of Severe Fetal Anemia Based on Perinatal Outcomes: A Comparative Analysis of the Current Reference Values. *Hindawi Publishing Corporation*, v. 2013, p.1-6, 2013.

RhesusBase V2. Available at: <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>. Accessed on 05/11/2013.

RODRIGUES, A. Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-Ds gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res*, Brazil, v.35, n.7, p.767-773, 2002.

SZCZEPURA, A; OSIPENKO, L.; FREEMAN, K. A new fetal RHD genotyping test: Costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy & Childbirth*, v.11, n.5, p.1-8, 2011.

SCHMIDT, L.C. et al. Updates in the prophylaxis of the Rh isoimmunization Review Article. *Femina*, v. 38, n.7, p.345-352, Jul. 2010.

SCHMIDT, L.C. et al. Non invasive Fetal RHD Genotyping in management of pregnant RhD negative women. Review Article. *Femina*, v. 39, n. 7, p. 337-344, Jul. 2011.

SCHMIDT, L.C. et al. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian population. *Genetics and Molecular Research*, v.13, n.1, p.799-805, Feb. 2014.

SCOTT, M.L. Monoclonal anti-D for immunoprophylaxis. *Vox Sang.*, Bristol, v. 81, n. 4, p. 213-218, Nov. 2001.

SEARINI, C. et al.. Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. *Arch Argent Pediatr*. v.107, n.5, p. 405-409, Buenos Aires, Sep./Oct., 2009.

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.

SIPPERT, E. et al. Variant RH alleles and Rhimmunisation in patients with sickle cell disease. *Blood Transfusion*, Brazil, v. 13, p.72-77, 2015.

TABOR, A.; BANG, J.; NORGAARD-PEDERSEN, B. Feto-maternal haemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trial. *Br J Obstet Gynaecol*, v. 94, n.6, p. 528-534, Jun, 1987.

TANNIRANDORN, Y., RODECK, C. H., Management of Immune Haemolytic Disease in the Fetus. *Blood Reviews*, V. 5, P. 5-14, 1991.

VAUGHN, J.I. et al.. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med*, London, v. 338, n.12, p. 798-803, March. 1998.

VILLASCHI, J.F. *Avaliação da Evolução dos Recém nascidos com Doença Hemolítica Perinatal por Aloimunização Materna, submetidos e não à Transfusão Intrauterina*; 2012. 107 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Saúde da Mulher, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2012

WAGNER, F.F. et al.. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*, Ulm, v.93, n.1, p. 385-93, Jan. 1999.

WAGNER, F.F. et al.. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*, Ulm, v. 95, n. 8, p. 2699-2708, Apr., 2000.

WAGNER, F.F.; LADEWIG, B.; FLEGEL, W.A. The RHCE allele ceRT: D epitope 6 expression does not require D-specific aminoacids. *Transfusion*, Ulm, v. 43, n,9, p.1248-1254, Sep., 2003.

WEINER, C.P.; OKAMURA, K. Diagnostic fetal blood sampling-technique related losses. *Fetal Diagn Ther*, Iowa, v. 11, n.3, p.169-175, 1996.

WESTHOFF, C. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion*, Philadelphia, v.94, n. 11 , p. 1663-1673, Dec., 2004.

WESTHOFF, C.M. Rh complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion*, Pennsylvania, v. 47, n. 1 S, p. 17-22 S, Jul. 2007.

WHITE, H.E. et al. Evaluation of a Novel Assay for Detection of the Fetal Marker RASSF1A: Facilitating Improved Diagnostic Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *PLOS ONE*, United Kingdom, v.7, n. 9, p.1-5, Sept. 2012.

WILSON, R.D. Amniocentesis and chorionic villus sampling. *Curr Opin Obstet Gynecology*, Vancouver, v. 12, n.2, p. 81-86, Apr. 2000.

Yu X, Wagner FF Witter B, Flegel WA. Outliers in RhD membrane integration are explained by variant RH haplotypes. *Transfusion* 2006; 46:1343-51.

ZHOU, L. et al.. Noninvasive prenatal *RHD* genotyping by real time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, MI, v. 193, n. 6, p. 1966-1971, Dec., 2005.