



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

DETEÇÃO/QUANTIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS COM HEMOGLOBINA FETAL NA GRAVIDEZ E PÓS PARTO UTILIZANDO UM ANALISADOR HEMATOLÓGICO

JOANA PATRÍCIA SANTOS FERREIRA

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

DETEÇÃO/QUANTIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS COM HEMOGLOBINA FETAL NA GRAVIDEZ E PÓS PARTO UTILIZANDO UM ANALISADOR HEMATOLÓGICO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica de Professora Doutora Maria Letícia Ribeiro, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e co-orientação do Mestre Rogério Cerqueira Barreira, Professor Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado decorre de um desafio, construção e amadurecimento de uma experiência única que marca o fim de uma importante etapa da minha vida que passou não só pelo patamar profissional, mas também pela componente humana. Como tal, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Um agradecimento especial à Doutora Letícia Ribeiro por me ter concedido a oportunidade de realizar este trabalho no Serviço de Hematologia do Hospital Geral do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE. Agradeço igualmente a disponibilidade, o empenho, a excelente orientação e sugestões dadas que contribuíram significativamente para a qualidade deste trabalho.

Ao mestre Rogério Barreira pela sua disponibilidade, conhecimentos transmitidos, espírito crítico e capacidade de estímulo durante todo o processo de orientação científica.

Ao Dr Ramon Salvado por toda a sua disponibilidade, apoio incondicional e conhecimentos transmitidos ao longo desta dissertação.

À Susana Santos pela disponibilidade e preciosa ajuda na citometria de fluxo.

Agradeço igualmente a Lurdes Teodósio e a Adelaide Ferreira pela disponibilidade e apoio, e o qual foi importante para a conclusão deste trabalho.

A todos os que me ajudaram com o pouco e com o muito e que depositaram confiança em mim ao longo desta “caminhada”, resta-me expressar...um muito obrigado!

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”,

Antoine de Saint-Exupéry

Júri

Doutor Armando José Cerejo Caseiro

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutora Ana Teresa Almeida Santos

Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Doutora Maria Letícia Ribeiro

Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Mestre Rogério Filipe de Cerqueira Barreira

Professor Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Resumo

Introdução: As células F (CF) são eritrócitos contendo hemoglobina (Hb) F e outros tipos de hemoglobina. São encontradas em indivíduos de todas as idades, ao contrário dos eritrócitos fetais, só encontrados em fetos e recém-nascidos. Nestes eritrócitos fetais, a Hb F é o tipo dominante de Hb. Estudos publicados indicam que a gravidez pode levar a um aumento progressivo de células com Hb F no sangue materno, devido à presença de CF e/ou de células fetais, estas últimas frequentemente associadas a hemorragia feto-materna (HFM).

Objectivo: (1) Determinação da percentagem (%) de células com Hb F em sangue materno, usando um anticorpo Anti-Hb F num analisador hematológico. (2) Quantificação de CF e/ou células fetais na gravidez e pós o parto. (3) Elaboração de algoritmo para a triagem de HFM.

Material e Métodos: Estudadas 168 amostras de sangue materno: 29 no 1º trimestre da gravidez (1ºT); 43 no segundo (2ºT); 82 no terceiro (3ºT), 14 pós-parto (PP) (amostras entre dia 0 e dia 7, após parto); 32 controlos negativos (Ctl N) com homens adultos saudáveis e 30 controlos positivos (Ctl P), obtidos por mistura de sangue do cordão com sangue do adulto, ABO compatíveis. Amostras processadas no analisador hematológico *Cell-Dyn Sapphire™*, em modo *RBC Flow*, após ajuste dos parâmetros IAS, FL1 e FL3, utilizando um reagente com iodeto de propídio e 2,5 uL de anticorpo monoclonal anti-Hb F FITC. Imagens analisadas pelo *software* FCS Express V3. Análise estatística com *Kruskal-Wallis* e teste *t-Student* (significância estatística $p < 0,05$). *Cut-off* para HFM obtido pelo valor mínimo, em%, em que se detetam células fetais nas amostras Ctl P.

Resultados: Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na % células com Hb F ($p < 0,0001$) nos grupos estudados. % CF aumenta com a gravidez: 1ºT vs Ctl N - $p < 0,0217$ e também durante a gravidez 1ºT vs 3ºT - $p = 0,0007$. Mesmo depois do PP a % CF está aumentada Ctl N vs PP: - $p < 0,0001$. Valores médios de % CF residuais em adultos saudáveis: 0,53%. Maioria das amostras nos diferentes grupos estudados apresenta % CF acima do valor residual ($> 0,53\%$): 66% no grupo 1ºT, 83% no 2ºT e 91% no 3ºT. Valor *cut-off* para suspeita de HFM de 1,70% de células com Hb F. Teste preciso ($CV \pm 4\%$) para baixas % de células com Hb F.

Discussão / Conclusão: Há um aumento células com Hb F durante a gravidez e esse aumento permanece no período PP. Em duas amostras do 3ºT obteve-se % células com Hb F elevada, superior ao *cut-off* ($\geq 1,70\%$), sendo detetada uma população de prováveis células fetais. A presença células fetais nestas amostras foi confirmada por citometria de fluxo com Anti-Hb F/ Anti-CA, com subsequente diagnóstico de HFM. Esta metodologia é simples, rápida e não dispendiosa, quando aplicada a um analisador hematológico, representa uma mais-valia no rastreio da HFM. No futuro, pode integrar o protocolo de análises de rotina das grávidas, permitindo detetar as HFM silenciosas, que são a origem de muitas anemias de causa desconhecida em recém-nascidos.

Palavras-chave

Hemorragia Feto Materna, Células F, Anti-HbF/Anti-CA, *FCS Express*, *RBC Flow*

Abstract

Introduction: F Cells (FC) are erythrocytes containing haemoglobin F (HbF) and other types of haemoglobin. They are found in individuals of all ages, in contrast to foetal erythrocytes, only found on foetus and in the newborn. In these foetal erythrocytes, Hb F is the dominant type of Hb. Published studies indicate that pregnancy can lead to a progressive increase of cells with Hb F in maternal blood, due to the presence and increase of FC and/or foetal cells, frequently associated to foeto-maternal haemorrhage (FMH).

Purpose: (1) Determination of cells with Hb F cells percentage (%) in maternal blood using an anti-Hb F antibody in an haematology analyzer. (2) Quantification of FC and/or foetal cells during pregnancy and post-partum. (3) Development of an algorithm for FMH screening.

Patients and Methods: 168 samples of maternal blood studied: 29 in the 1st trimester of pregnancy (1^oT); 43 in the 2nd (2^oT); 82 in the 3rd (3^oT), 14 post-partum (PP) (samples between D0 and D7, after delivery); 32 male healthy adult controls (Ctl N) and 30 pathological controls (Ctl P), obtained by mixing cord blood with adult blood, ABO compatible. Samples processed in *Cell-Dyn Sapphire™* haematology analyzer in *RBC Flow* mode, after adjustment of IAS, FL1 and FL3 parameters and using a reagent with propidium iodide and 2,5 uL of monoclonal antibody Anti-Hb F FITC. Images analyzed by *FCS Express software V3*. Statistical analysis with *Kruskal-Wallis* and *t-Student* tests (statistical significance $p < 0,05$). *Cut-off* for FMH suspicion obtained by the minimum value, in %, that are detected in foetal cells in the Ctl P samples.

Results: Statistically significant differences in the % of cells with Hb F ($p < 0,0001$), between the groups studied. %FC increases with pregnancy: 1^oT vs Ctl N - $p < 0,0217$ and also during pregnancy 1^oT vs 3^oT - $p = 0,0007$. Even after post-partum %FC increases Ctl N vs PP: - $p < 0,0001$. %FC residual values in healthy adults: 0,53%. Most samples in the different groups, present %FC above the residual value ($> 0,53\%$): 66% in the 1^oT group; 83% in the 2^oT and: 91% in the 3^oT. *Cut-off* value of cells with Hb F for suspected HFM is 1.70%. The test was precise ($CV \pm 4\%$) for low % of cells with Hb F.

Discussion/Conclusion: We observed an increase in %FC during pregnancy and post-partum. In two samples from 3^oT pregnant women, we detected a % of cells with Hb F above the *cut-off* value ($\geq 1,70\%$), as well as a population of probable foetal cells. The presence of foetal cells in these samples was confirmed by flow cytometry with Anti-HbF/Anti-CA, with the subsequent FMH diagnosis. This methodology is simple, fast and not expensive. When applied to an haematology analyser it represents an added value for FMH screening. In the future, it could be part of the routine analytical protocol for pregnant women, allowing an early detection of silent FMH, which is the source of many anaemias of unknown cause in the newborn.

Keywords

Fetal Maternal Hemorrhage, F Cells, Anti-HbF/Anti-CA, *FCS Express*, *RBC Flow*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
INTRODUÇÃO	1
Teste de Roseta.....	5
Teste <i>Kleihauer-Betke</i>	6
Citometria de fluxo	7
Métodos alternativos baseados em citometria de fluxo	10
Analisador hematológico	11
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
População	14
Seleção de amostras	14
Controlos.....	14
Anticorpo monoclonal Anti-HbF	15
Reagente com iodeto de propídio.....	15
Preparação do analisador hematológico	15
Preparação inicial da amostra	15
Processamento no analisador hematológico.....	16
Análise e quantificação de células com Hb F.....	16
Valor de células F residuais na população estudada.....	17
Determinação do valor de <i>cut-off</i> para HFM	17
Organização dos dados	17
Análise estatística.....	17
RESULTADOS.....	18
Controlo Normal e Controlo Positivo	18
População Estudada.....	20
Controlo Normal vs 1º Trimestre	23
1º Trimestre vs 3º Trimestre	24
Ctl N vs Pós Parto	25
Amostra Pós Parto.....	26
Amostra 3º Trimestre	27
Teste de Imprecisão	28
Algoritmo.....	30
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	33
BIBLIOGRAFIA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de hemoglobina durante a gestação e após nascimento	1
Figura 2 – Distribuição de Hb F nos eritrócitos adultos	2
Figura 3 – Imagem de esfregaço de sangue periférico de HFM	3
Figura 4 – Teste de Roseta.....	6
Figura 5 – Teste de Kleihauer-Betke.....	6
Figura 6 – Detecção de células fetais por citometria de fluxo (Anti-D)	7
Figura 7 – Detecção de células fetais por citometria de fluxo (Anti-Hb F)	9
Figura 8 – Detecção de células fetais por citometria de fluxo (Anti-Hb F/Anti-CA)	9
Figura 9 – Detecção de HFM usando anticorpos anti-Hb F por CMF num analisador hematológico	10
Figura 10 – Representação dos modos <i>Open Flow</i> do analisador hematológico	11
Figura 11 – Detecção de várias populações de células nos Controlos Normal e Positivo..	18
Figura 12 – Gráficos da amostra de Controlo Normal	19
Figura 13 – Gráficos da amostra de Controlo Positivo	19
Figura 14 – <i>Box plot</i> das células com Hb F nos vários grupos estudados	21
Figura 15 – <i>Box plot</i> Ctl N vs 1ºT	23
Figura 16 – <i>Box plot</i> 1ºT vs 3ºT.....	24
Figura 17 – <i>Box plot</i> Ctl N vs PP	25
Figura 18 – Detecção das várias populações de células numa amostra Pós Parto	26
Figura 19 – Gráficos de uma amostra de Pós Parto	26
Figura 20 – Detecção das várias populações de células numa amostra 3º Trimestre	27
Figura 21 – Gráficos de uma amostra do 3ºTrimestre de gravidez.....	28
Figura 22 – Algoritmo.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Causas e consequências de HFM.	4
Tabela 2 – Dados estatísticos dos vários grupos estudados.	22
Tabela 3 – Comparação entre grupos estudados	23
Tabela 4 – Imprecisão do método	29

LISTA DE ABREVIATURAS

Hb	Hemoglobina
α	Cadeia alfa
γ	Cadeia gama
β	Cadeia beta
δ	Cadeia delta
%	Percentagem
CF	Células F
HFM	Hemorragia feto materna
Ag(s)	Antigénio(s)
GVs	Glóbulos vermelhos
Rh	<i>rhesus</i>
Ig	Imunoglobulina
TKB	Teste <i>Kleihauer-Betke</i>
CMF	Citometria de fluxo
mAc	Anticorpo monoclonal
RhIg	Imunoglobulina profilática Rh
Du	D fraco
CA	Anidrase carbónica
λ	Comprimento de onda
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio
FCS	Ficheiro de citometria de fluxo
1ºT	Primeiro trimestre de gestação
2ºT	Segundo trimestre de gestação
3ºT	Terceiro trimestre de gestação
PP	Pós parto

EDTA K3	Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
IAS	<i>intermediate angle scatter</i> – Complexidade celular
Gate	Seleção de população
Vs	<i>Versus</i>

INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) é formada por dois pares de cadeias polipeptídicas, cada uma com o grupo heme associado. Num indivíduo normal são sintetizados diferentes tipos de hemoglobina ao longo da vida adulta, no período fetal e neonatal (Figura 1).

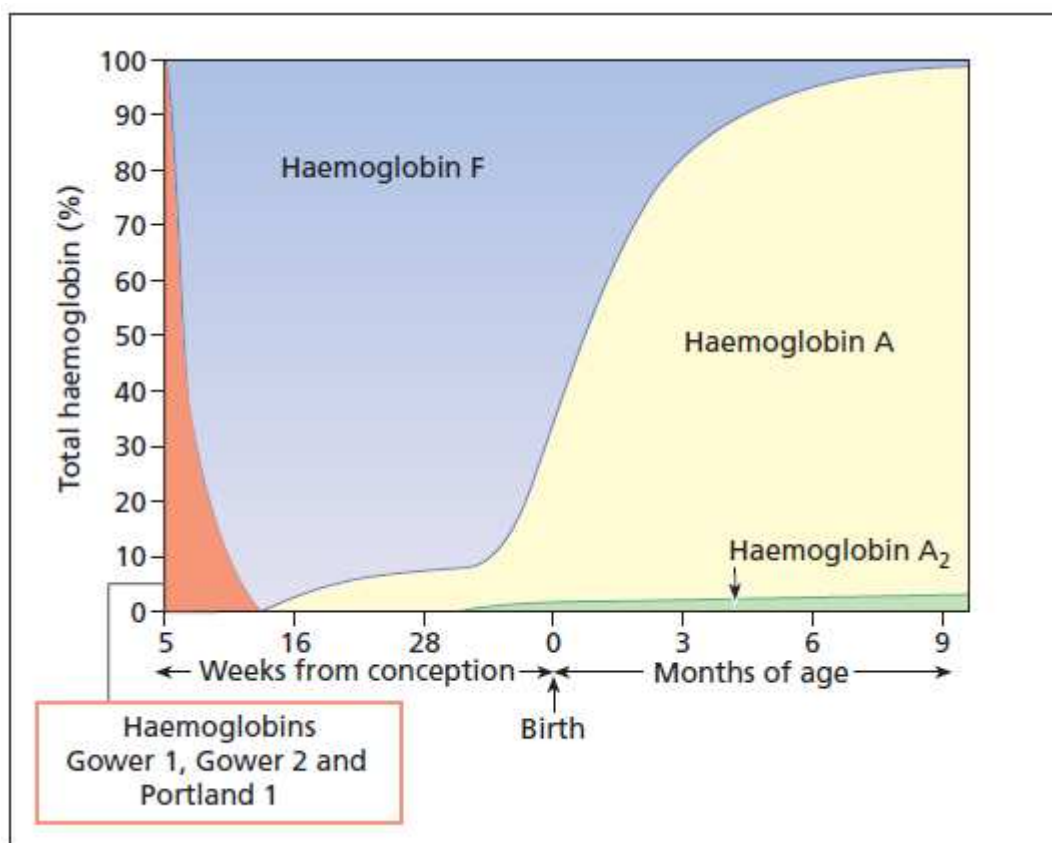


Figura 1 - Tipos de hemoglobina durante a gestação e após nascimento – A Hb F é a hemoglobina predominante na vida fetal e compreende a maior proporção de hemoglobina encontrada no nascimento. A Hb A ($\alpha_2\beta_2$) corresponde a mais de 96-98% da hemoglobina do adulto. A Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) são encontradas em pequenas quantidades durante a vida adulta (cerca de 3% e 1%, respectivamente). As proporções adultas de Hb A, A₂ e F são normalmente atingidas aos 6-12 meses de idade (Adaptado de Barbara Bain, 2006).

A Hb Gower 1, Hb Gower 2 e Hb Portland 1 são hemoglobinas embrionárias, sendo substituídas, no feto, pela Hb fetal (F). A Hb F é a hemoglobina predominante no feto e é formada por duas cadeias α e duas cadeias γ ($\alpha_2\gamma_2$) (1 – 3).

Dependendo do tipo de cadeia γ podem existir duas espécies de Hb F, constituídas por $^G\gamma$ e $^A\gamma$, com glicina e alanina, respetivamente, na posição 136 da cadeia γ (9). Durante a vida intrauterina e no momento do nascimento, a Hb F contém cadeias $^G\gamma$ e $^A\gamma$ com um ratio de 70:30 (70% de $^G\gamma$ e 30% de $^A\gamma$, no feto e recém nascido). Alguns meses

após o nascimento, são adquiridos os níveis residuais adultos para a Hb F com o ratio das cadeias γ a inverter para 40:60 (40% de $G\gamma$ e 60% de $A\gamma$, no adulto normal) (3,4)

No adulto saudável, para além da Hb A, a mais frequente, formada por duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$) existe também a Hb A₂, com duas cadeias α e duas cadeias δ ($\alpha_2\delta_2$), e a Hb F mas, estas últimas, encontradas em pequenas quantidades (3).

Ao nascimento a Hb F é a predominante, sendo gradualmente substituída por Hb A no primeiro ano de vida. No entanto, quantidades residuais de Hb F continuam a ser sintetizadas durante a vida adulta, sendo apenas 0,2 a 1 por cento (%) (5) do total da Hb contida nos eritrócitos.

A Hb F pode ser homogeneamente distribuída entre os eritrócitos, ou seja, todos os eritrócitos possuem uma pequena quantidade de Hb F (distribuição pancelar). Por outro lado, a Hb F pode ter uma distribuição irregular, aparecendo somente em alguns eritrócitos (distribuição heterocelular) (4,6,7).

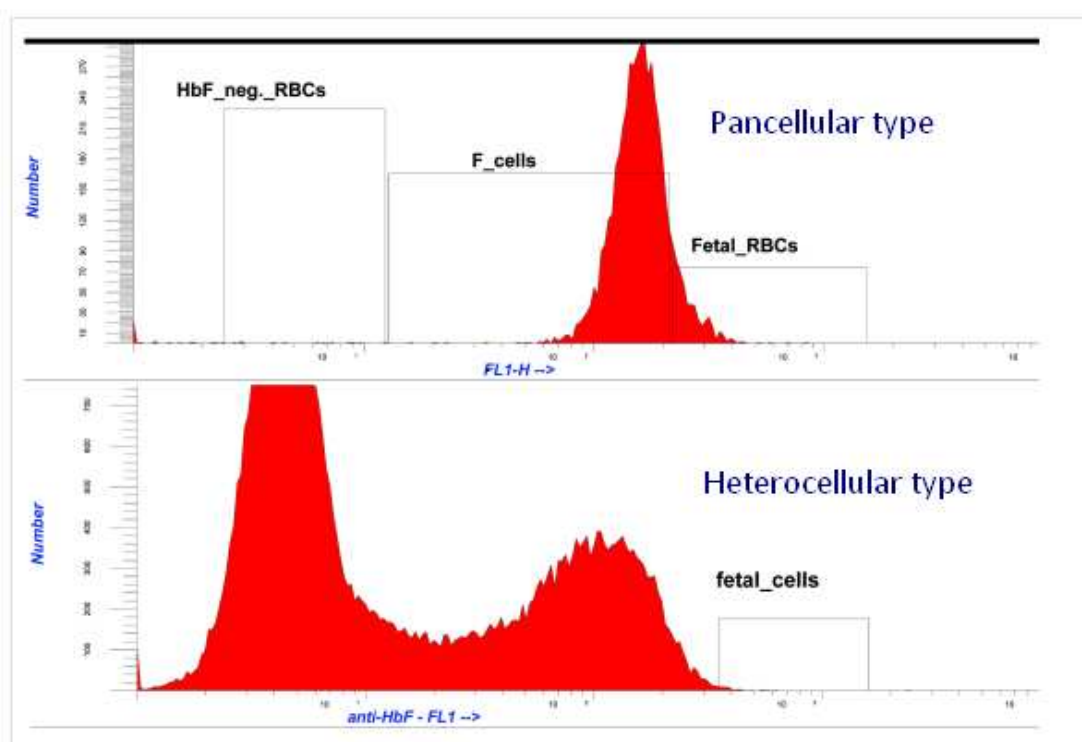


Figura 2 – Distribuição de Hb F nos eritrócitos adultos – Estudo de citometria de fluxo utilizando um anticorpo monoclonal Anti-Hb F, onde pode ser observado a distribuição da Hb F nos eritrócitos. Em cima apresenta uma distribuição pancelar, em que todos os eritrócitos contêm Hb F; Em baixo observa-se uma distribuição do tipo heterocelular, onde existe uma subpopulação de eritrócitos que não contêm Hb F, e outra população com Hb F (Adaptado de Davis et al, 2007).

Segundo Barbara Bain, Bruce Davis e outros autores, todos os adultos têm quantidades residuais de Hb F, presentes num subconjunto de eritrócitos que para além da Hb A também possuem Hb F, sendo designados por “Células F” (CF) (3,8,9).

Um aumento anormal de Hb F por célula pode estar associado a várias patologias hematológicas, tais como, talassémias, persistência hereditária de Hb fetal, drepanocitose, anemia de Fanconi, anemia Blackfan-Diamond e algumas síndromes mielodisplásicas (10,11). O *stress* eritropoiético, como a perda de sangue aguda ou hemólise, a recuperação de aplasia da medula óssea ou de células vermelhas ou logo após a administração de eritropoietina, pode levar também a um aumento da Hb F. Um pequeno mas importante aumento de Hb F, pode estar associado à gravidez, onde existe um rápido aumento da produção eritroide, com uma maior produção de CF (3).

Durante a gravidez, a circulação de sangue materno e fetal está totalmente separada, mas é comum existir a passagem transplacentária de células fetais para o sangue materno. Autores referem que as CF podem ser detetadas no sangue materno durante o primeiro trimestre, sendo que o volume de CF aumenta com a progressão da gravidez (12). Não existe significância clínica na maior parte dos casos, no entanto, quando existem células fetais no sangue materno suspeita-se de hemorragia feto materna (HFM) (13).

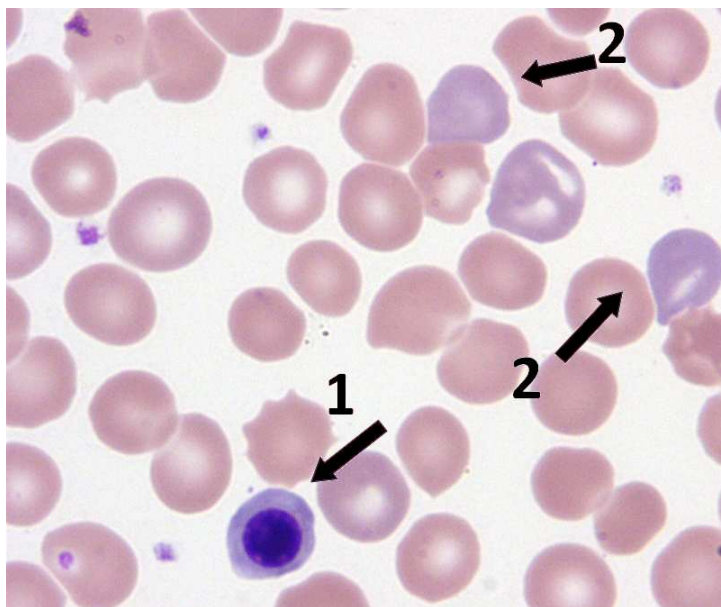


Figura 3 – Imagem de esfregaço de sangue periférico de HFM – Presença de células fetais em sangue materno: observa-se eritroblasto (1), policromasia (2), características comuns de um esfregaço de sangue periférico de uma grávida com HFM. Imagem obtida de ASH Image Bank.

O risco de hemorragia transplacentar depende do volume de sangue envolvido na circulação placentar e da integridade do sistema circulatório materno-fetal. Um aumento do volume está associado a um aumento de risco de hemorragias feto maternas espontâneas, nem sempre associados a episódios clinicamente identificáveis (hemorragia silenciosa) (14,15).

Como já referido, a HFM é a passagem de sangue fetal para o compartimento intravascular materno, devido á rutura da membrana placentária. O gradiente de pressão entre a circulação arterial do feto e a circulação venosa da mãe permite a entrada de células fetais na circulação materna (2,15).

Durante a gravidez, os traumas abdominais, as infeções intrauterinas e deslocamento da placenta, entre outros, podem resultar em HFM (13).

Tabela 1 – Causas e consequências de HFM (Adaptado de Bakker-Jonges et al, 2008).

Causas de hemorragia feto materna
Trauma abdominal
Infeção
Rutura da placenta
Desconhecidas
Consequências da hemorragia feto materna
Anemia no feto
Morte intrauterina
Formação de aloanticorpos

Existem complicações importantes para o feto que podem surgir da HFM (Tabela 1); a perda de sangue, anemia, pode levar à descompensação cardíaca, o que leva a hidropsia e consequentemente, morte fetal intrauterina (16). Estima-se que 3-14% dos nados mortos devem-se a HFM graves (2). Outra complicação deve-se à incompatibilidade entre os antígenos (Ags) da superfície dos glóbulos vermelhos (GVs) da mãe e do feto, que pode resultar na aloimunização da mãe, com formação de aloanticorpos contra os GVs do feto (17,18). As reações mais graves devem-se a anticorpos do sistema *rhesus* (Rh), são aloanticorpos do tipo IgG que atravessam facilmente a placenta induzindo doença hemolítica do feto (19).

Os Ags do sistema Rh exprimem-se nos GVs fetais desde as 6 semanas gestacionais, estando bem documentada na literatura casos de hemorragia

transplacentar nesta idade gestacional. Numa mulher Rh (D) negativa (e imunocompetente), estas situações têm o risco acrescido de sensibilização ao Ag Rh (D), bastando o contacto com 0,1 mL de sangue Rh (D) positivo para iniciar a sua sensibilização (15).

Se a mãe tem anticorpos contra os GVs fetais existe destruição imunológica destas células reduzindo o tempo para a deteção da HFM (19). Autores defendem, por isso, que a quantificação exata da HFM pode ser importante para calcular a dose de imunoglobulina (Ig) anti-D necessária para o sucesso da profilaxia imune nas grávidas Rh (D) negativas (12,15,20,21).

Mollison (1972) propôs uma fórmula para quantificar o volume de HFM (22):

$$\frac{\text{Percentagem de Células Fetais}}{100} \times 1800^* \times \frac{122^*}{100}$$

*- Esta fórmula tem em conta o volume de glóbulos vermelhos maternos que é de 1800 mL e que as células fetais são 22% maiores do que as células maternas.

Devido à possibilidade da passagem de células fetais para o sangue materno tornou-se cada vez mais importante dispor de técnicas especializadas que permitam detetar e/ou quantificar as células fetais, tanto para efeito de diagnóstico de HFM como para a profilaxia Ig anti-D (22–24).

Teste de Roseta

O teste de roseta é um método barato, simples, de fácil execução e não requer equipamento especial. Usa anticorpos anti-D que aderem às células fetais Rh (D) positivas em sangue materno Rh (D) negativo com a formação de rosetas (Figura 4) (12,25). É um teste de rastreio que só se aplica a grávidas Rh (D) negativas com fetos Rh (D) positivos.

Tratando-se de um teste qualitativo, na suspeita de HFM deve ser utilizado um teste quantitativo (13).

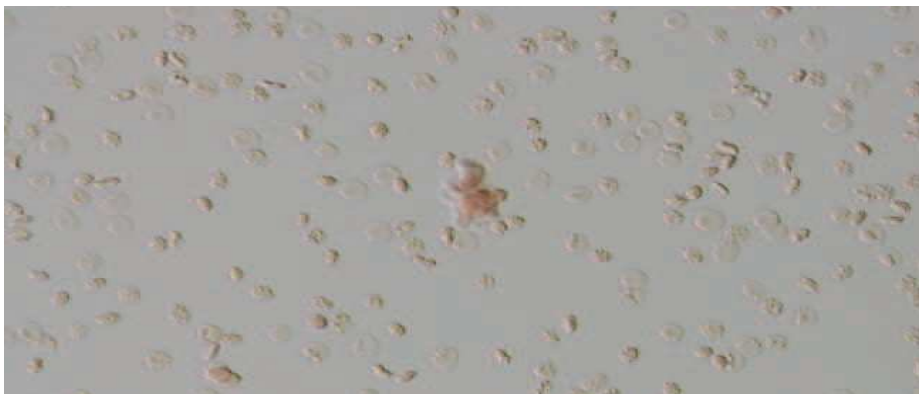


Figura 4 - Teste de Roseta – Teste de Roseta positivo com formação de roseta no centro do campo observado. Utilizou-se uma suspensão a 2-4% de GVs constituído por 99,4% células do grupo O Rh (D) negativo e 0,6% células do grupo O Rh (D) positivos células. Imagem observada com ampliação de x500 (Kim et al, 2012).

Teste *Kleihauer-Betke*

O teste *Kleihauer-Betke* (TKB) foi durante muito tempo, o método de referência para a quantificação da HFM. Este teste baseia-se na contagem células fetais presentes num esfregaço sanguíneo de sangue materno.

A Hb F, principal componente das células fetais, é relativamente resistente à eluição ácida quando comparada com a Hb A do adulto (20, 21). Ao microscópio são observados as células fetais coradas de rosa brilhante, enquanto as células com Hb do adulto aparecem como células fantasmas ou incolores (Figura 5) (2,13,17,19).

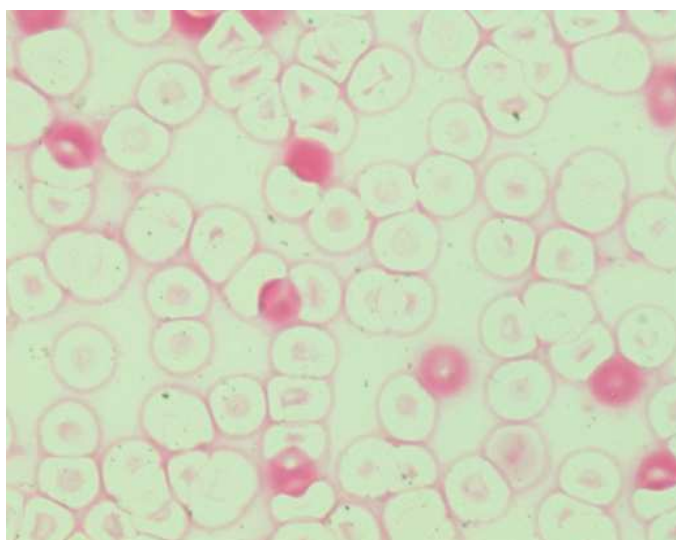


Figura 5 - Teste de Kleihauer-Betke - As células que contêm Hb F são coradas a rosa brilhante com eosina, enquanto aquelas sem Hb F aparecem como fantasmas incolores (Bakker-Jonges et al, 2008).

O TKB é usado na maior parte dos laboratórios, não necessita de equipamentos sofisticados e é bastante barato (18,20). No entanto, é um teste semi-quantitativo, e com fraca reprodutibilidade. A sua realização requer alguma experiência e pode levar a falsos positivos com sobrevalorização da quantidade da HFM, pois o teste não consegue distinguir corretamente as células fetais das células do adulto que contêm alguma Hb F, as CF (2,13).

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CMF) é um teste de diagnóstico com maior sensibilidade e precisão que o TKB eliminando alguns problemas associados a este último (26,27).

Os primeiros métodos de CMF para a avaliação da HFM eram baseados na detecção do Ag Rh (D) na superfície dos eritrócitos (12,28,29). Visto que o Ag Rh (D) é expresso na superfície dos eritrócitos, o método para a sua detecção e quantificação é simples. É realizado por incubação com um anticorpo monoclonal (mAc) anti-D marcado fluorescentemente, permitindo a distinção entre as CF, nas grávidas com Ag D negativo e as células fetais no feto, com presença de Ag D.

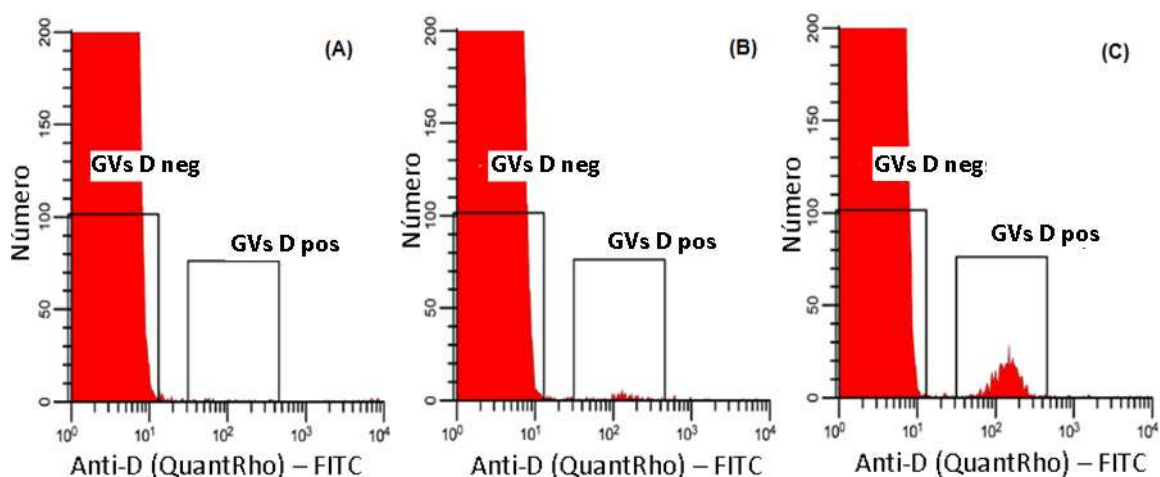


Figura 6 – Detecção de células fetais por citometria de fluxo (Anti-D) – Usando o anticorpo Anti-D (Quant-Rho) que identifica e permite quantificar os eritrócitos Rh (D) positivos, neste caso, as células fetais: (A) - Amostra sem células fetais; (B) valores baixos de células fetais com 0,15%; (C) 1,45%, de células fetais Rh (D) positivas (Adaptado de Davis et al, 2007).

A obtenção da amostra de sangue antes da administração de imunoglobulina profilática (RhIg) na grávida Rh (D) negativa pode complicar a análise por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-D porque a RhIg pode ligar-se e bloquear os sítios de ligação do anticorpo nos eritrócitos fetais, impedindo sua detecção (23). Kumpel et al propôs uma dupla marcação com anticorpos anti-D e com anti-IgG humana para assegurar a ótima marcação das células Rh (D) fetais, independentemente dos efeitos de bloqueio, in vivo, da ligação RhIg (30,31).

Inicialmente houve alguma preocupação no uso clínico do método anti-D em casos de fetos com Ags D fraco (Du) e mães Rh (D) negativas. A quantificação das células fetais nestes casos pode ser problemática, pois alguns tipo de anti-D, não detetam eritrócitos Du. Alguns autores desvalorizam o Ag Du, pois na prática consideram que este não é imunogénico (18), no entanto outros autores consideram que, embora os eritrócitos Du sejam menos imunogénicos do que os eritrócitos Rh D normais, o Ag Du é usado para a resposta imune, e como tal não deve ser desvalorizado (32).

Os métodos baseados no anti-D para a detecção e quantificação de células fetais possuem algumas limitações, pois não podem ser efetuados em grávidas Rh (D) positivas nem em grávidas Rh (D) negativas com fetos Rh (D) negativos, ou seja, a aplicabilidade destes métodos está limitada à incompatibilidade do Ag D entre a mãe e o feto (25).

Devido às limitações referidas anteriormente para a avaliação da HFM, a CMF baseou-se num novo parâmetro: a presença de Hb F em células fetais (2).

Este método quantifica as células fetais presentes na circulação materna através do uso de um mAc anti-Hb F marcado com flurocromos que deteta a Hb fetal dentro dos eritrócitos. Para isto ser possível, é necessário a fixação e permeabilização das células para que o mAc possa penetrar nos eritrócitos e ligar-se à Hb F.

As células fetais são exclusivamente identificadas com base no seu elevado teor intracelular de Hb F e podem ser facilmente distinguidas das CF (que têm níveis intermediários de Hb F) e outros GVs adultos (que não possuem Hb F) com base na expressão de Hb F quantitativa (Figura 7) (13,18,19).

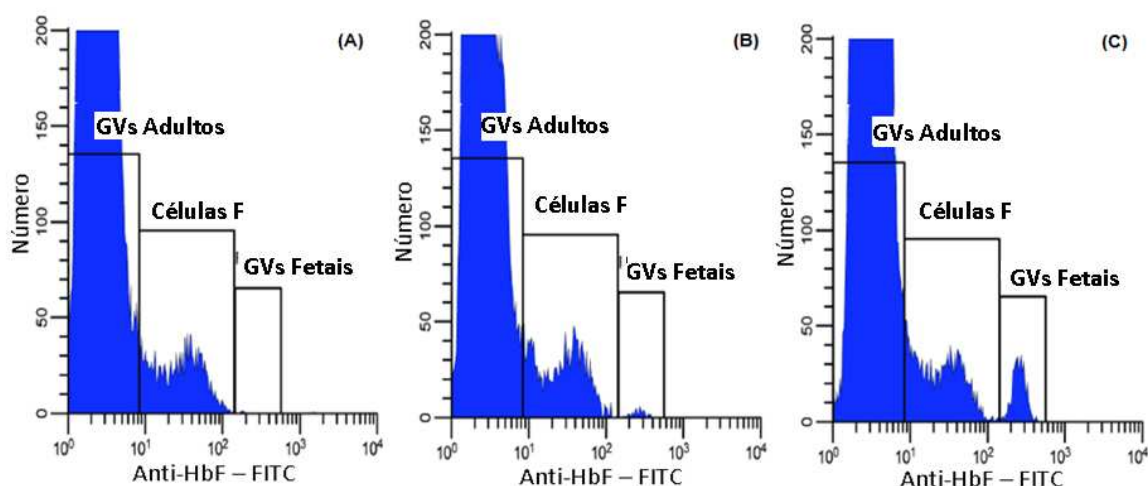


Figura 7 – Detecção de células fetais por citometria de fluxo (Anti-Hb F) – Usando o anticorpo Anti-F FITC para distinção dos vários grupos de células: (A) - Amostra sem células fetais; (B) valores baixos de células fetais com 0,15%; (C) 1,45%, de células fetais (Adaptado de Davis et al, 2007).

Outros métodos de CMF foram descritos, incluindo a utilização de um mAc anti-Hb F e um anticorpo policlonal para detectar a enzima anidrase carbônica (CA) nos eritrócitos (14). Uma vez que as células fetais têm pouca ou nenhuma CA em comparação com células adultas que mostram expressão abundante desta enzima, as células fetais podem ser facilmente distinguidas das CF e células normais do adulto (33). Uma abordagem semelhante pode ser aplicada para os antígenos i e I, que são expressos por eritrócitos fetais e adulto, respectivamente (2,13,25).

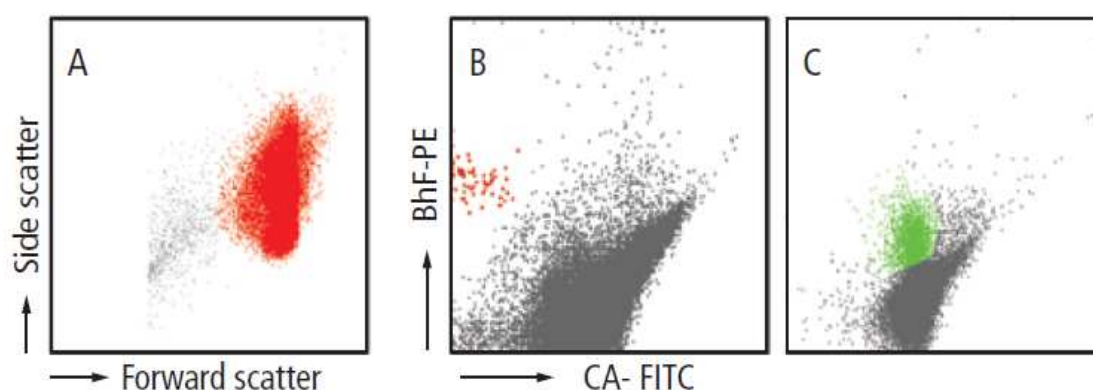


Figura 8 – Detecção de células fetais por citometria de fluxo (Anti-Hb F/Anti-CA) - (A) Os eritrócitos são obtidos por *gate* com base em tamanho e dispersão. (B) Dentro do *gate* dos eritrócitos detecta-se as células fetais (vermelho) com Hb F positiva e anidrase carbônica (CA) negativa, sendo as restantes células, eritrócitos maternos (cinza). (C) Os eritrócitos maternos Hb F positivos ou CF, são definidos por HbF positivo/CA positivo (verde) (Adaptado de Bakker-Jonges et al, 2008).

No entanto, existem desvantagens para a execução da técnica de CMF pois não está disponível em todos os hospitais nem 24 horas por dia, requer pessoal especializado e os equipamentos são de elevado custo.

Métodos alternativos baseados em citometria de fluxo

Inerente aos custos elevados dos equipamentos necessários para CMF, tornou-se cada vez mais importante automatizar a técnica de CMF e rentabilizar os equipamentos já utilizados na rotina laboratorial. Já foram efetuados estudos em automatização da CMF com um analisador hematológico para a quantificação de HFM por imunofluorescência utilizando um mAc anti-D marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). O desempenho foi alegadamente comparável ao de um citómetro de fluxo normal (14). Estudos mais recentes utilizam outros anticorpos, como anti-Hb F numa técnica semelhante à CMF, mas aplicada a analisadores hematológicos que permitem detetar e quantificar a HFM (Figura 9) (12,25).

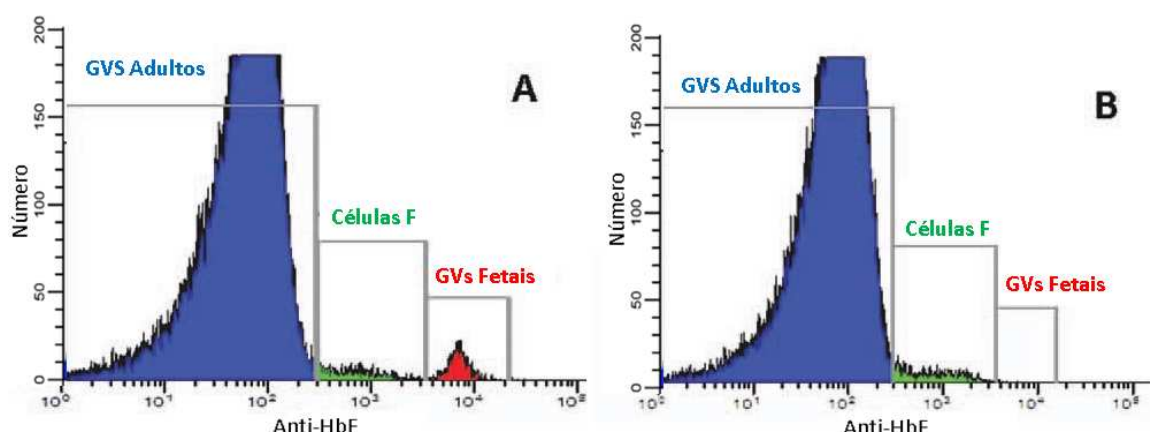


Figura 9 - Detecção de HFM usando anticorpos anti-Hb F por CMF num analisador hematológico - (Ensaio FMH QuikQuant, Trillium Diagnostics, Bangor, Maine) - Dependendo da intensidade de fluorescência do anticorpo anti-Hb F, podem ser distinguidas células Hb F negativas (eritrócitos adultos), CF e células fetais. (A) Células fetais foram detetadas, evidenciando HFM. (B) Não foram detetadas células fetais, excluindo HFM, (Adaptado de Kim et al, 2012).

A utilização de um analisador hematológico para a quantificação de HFM é especialmente interessante, uma vez que é totalmente automatizado e preciso.

Analizador hematológico

O analisador, *Cell-Dyn Sapphire™* (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA), é um aparelho sofisticado de rotina com capacidades incorporadas de CMF (33,34). É equipado com um laser (sólido) de cor azul, comprimento de onda (λ) de 488 nm, 4 detectores de luz difusa, e 3 detectores de fluorescência: **FL1**- Fluorescência verde, isotiocianato de fluoresceína (FITC) com um λ de aproximadamente 530 nm (No *Cell-Dyn Sapphire™*, a gama de detecção é de 515 nm a 545 nm); **FL2** - Fluorescência laranja, com ficoeritrina (PE), com um λ de aproximadamente 570 nm (No *Cell-Dyn Sapphire™*, a gama de detecção é de 555 nm a 585 nm); **FL3** - Fluorescência vermelha, com iodeto de propídio (PI) com um λ de aproximadamente 630 nm (No *Cell-Dyn Sapphire™*, a gama de detecção é de 615 nm a 645 nm) (35,36).

O analisador oferece 3 modos de funcionamento de citometria aberta -“*Open Flow*” (pode utilizar qualquer tipo de monoclonal, independentemente da casa comercial) adicionais para os ensaios de fluorescência em eritrócitos (*RBC Flow*), leucócitos (*WBC Flow*), e plaquetas (*Platelet Flow*), permite desenvolver ensaios celulares utilizando anticorpos marcados com um corante fluorescente, semelhantes aos de um citômetro de fluxo. São vários os fabricantes que já produzem reagentes com anticorpos monoclonais para executar em *Open Flow* (35,37).

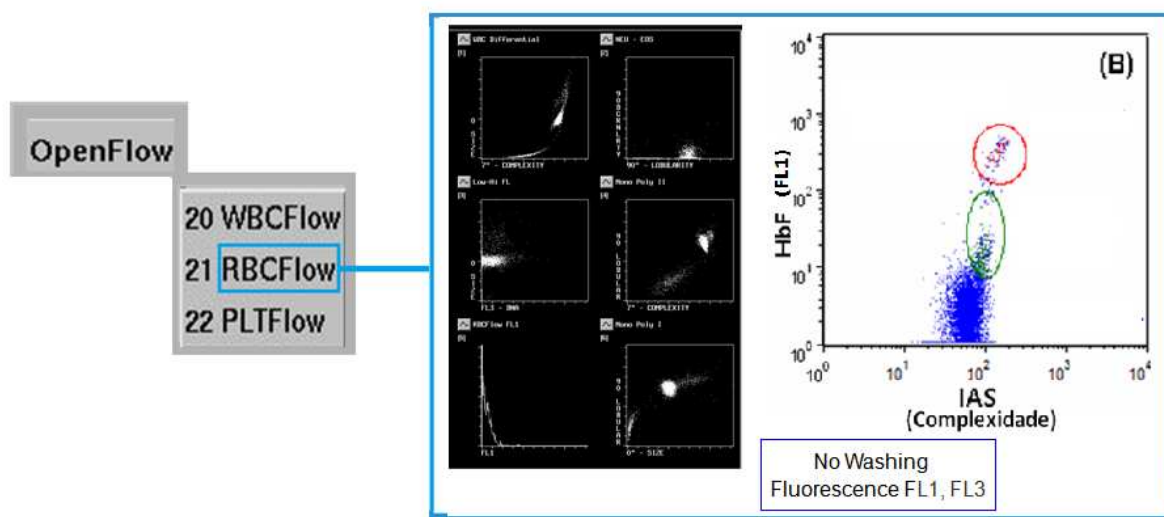


Figura 10 – Representação dos modos *Open Flow* do analisador hematológico – O analisador oferece os modos de abertura em *Open Flow*: *RBC Flow*, *WBC Flow* *Plt Flow*. O *RBC Flow* permite a utilização de anticorpos marcados com um corante fluorescente, aplicado a eritrócitos. Dispensa a lavagem de células para ensaio de amostras neste tipo de modo (Adaptado de Abbott Diagnostics, 2008).

Com a possibilidade de executar testes em *Open Flow* e a capacidade de descarregar ficheiros de citometria de fluxo (FCS), analisados em programas de *software* externos para determinar a concentração do parâmetro desejado, os laboratórios podem expandir a utilidade do analisador através da realização de vários ensaios com anticorpos monoclonais.

OBJETIVOS

- 1- Determinação da percentagem de eritrócitos com Hb F (células F e/ou células fetais) no sangue materno, utilizando como método a imunofluorescência direta por citometria de fluxo aplicada ao analisador hematológico, *Cell-Dyn Sapphire™* através da marcação com anticorpo monoclonal ligado a um fluorocromo.
- 2- Quantificação de células F e/ou células fetais durante a gestação e no pós parto.
- 3- Elaboração de algoritmo para a triagem de amostras com suspeita de hemorragia feto materna.

MATERIAL E MÉTODOS

População

Durante os meses de Abril a Julho de 2012, foram processadas 168 amostras de sangue periférico de grávidas saudáveis com idades entre os 16 e 42 anos: 29 amostras do primeiro trimestre (1ºT), 43 do segundo trimestre (2ºT), 82 do terceiro trimestre (3ºT) e 14 amostras pós parto (PP). As amostras PP são de um período de 0 a 7 dias após parto. Foram realizadas 32 amostras controlo de sangue periférico de homens adultos saudáveis (Grupo Normal), com idades entre os 20 e 40 anos, e 30 amostras de controlo positivas (Grupo Positivo), preparadas com misturas de células fetais e células do adulto.

Todas as amostras foram colhidas em tubos com ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA K3) a 1,2 mg/mL e armazenadas 2 a 8°C no prazo 72 horas após colheita.

Seleção de amostras

A partir do *software* de base de dados Clinidata XXI (*MaxData Copyright©*) foram obtidas as informações clínicas referentes às amostras, de modo a possibilitar a sua introdução nos grupos em estudo e garantir que estas não tinham qualquer patologia associada que pudesse interferir com a quantificação de células com Hb F.

Controlos

As amostras de controlo grupo normal (Ctl N) foram colhidas a indivíduos saudáveis sem histórico de patologias subjacentes. Para o controlo grupo positivo (Ctl P) efetuaram-se diferentes misturas de sangue de adulto com sangue do cordão, AB0 compatíveis. O sangue do cordão foi colhido imediatamente após o parto a recém-nascidos saudáveis, sem transfusões intrauterinas. O sangue de adulto pertenceu a indivíduos saudáveis sem histórico de transfusões sanguíneas.

Para deteção de valores baixos, médios e elevados de células fetais, foram realizadas diferentes misturas de sangue do cordão com sangue do adulto entre os 10% (10µL de sangue do cordão + 90µL sangue de adulto) e os 90% (90µL de sangue do cordão + 10µL sangue de adulto). Este controlo para além de permitir obter o valor de *cut-off* para a deteção de células fetais e consequente suspeita de HFM, permite também

localizar com exatidão os vários grupos de células Hb F positivas nos histogramas e gráficos.

Anticorpo monoclonal Anti-HbF

O mAc da Hb fetal *Invitrogen* (*Invitrogen Corporation*, Camarillo, CA) é conjugado com FITC. Estes reagentes são destinados para a identificação e quantificação das células com Hb F. O λ de excitação para este mAc é de 488 nm e o λ de emissão é 525 nm e é detetado no canal de fluorescência FL1.

Reagente com iodeto de propídio

É usado um reagente do analisador hematológico contendo iodeto de propídio: *WBC Reagent -Part A*. Este reagente estabiliza rapidamente o ácido desoxirribonucleico (ADN) dos núcleos expostos dos eritroblastos e dos leucócitos frágeis ou destruídos presentes na amostra e permite a marcação das células nucleadas no canal de fluorescência FL3.

Preparação do analisador hematológico

Foi necessário calibrar os parâmetros do analisador hematológico, *Cell-Dyn Sapphire™* para o processamento das amostras em *Open Flow: RBC Flow* (38):

- 1- Selecionar *Setup* para entrar nos conjuntos de parâmetros (*Parameter Sets*), a fim de desenvolver um conjunto de gráficos: *RBCFlow FL1-7º*; *Low-Hi FL*; *EOS I*; *RBCFlow FL1*; *NRBCs*; *Mono Poly II*;
- 2- Selecionar “*Analyzer*” e escolher “*Setpoints*” para ajuste dos referidos parâmetros.

Preparação inicial da amostra

A 100 microlitros (μ L) de amostra foram adicionados 200 μ L do reagente glutaraldeído (0,05%), incubação à temperatura ambiente 5 minutos, (as células são fixadas com este último reagente), adicionando depois 100 μ L de Triton X100 (0,1%), (reagente utilizado para permeabilização facilitando a entrada do mAc no interior das células) e incubando 10 minutos também à temperatura ambiente. Aproveitando os recursos existentes, adicionou-se 100 μ L de *WBC Reagent - Part A*, reagente do analisador hematológico contendo iodeto de propídio para permitir a exclusão das células

nucleadas e, por fim, 2,5 µL de Anti-Hb F, incubação de 20 minutos no escuro. As células fixadas e permeabilizadas são incubadas com o mAc que se liga especificamente à Hb fetal. A amostra está preparada para ser processada no analisador hematológico em modo aberto (*Open Flow – RBC Flow*) (38).

Processamento no analisador hematológico

O processamento da amostra é efetuado em *RBC Flow* e envolveu os seguintes passos:

- 1- Preparação do analisador para o processamento de amostras em *Run Open*;
- 2- Inserção do tubo da amostra na seringa do analisador;
- 3- Pressão da tecla para aspiração da amostra; o sistema aspirou a amostra e procedeu à dispensa de 3000 µL de *Diluent/Sheath* para uma diluição da amostra a 1:161 na câmara; a amostra 1:161 diluída foi transportada para a célula de fluxo ótico para medição; uma vez que o ciclo do teste esteja concluído, o sistema gera um arquivo (FCS) para análise em programas externos.

Análise e quantificação de células com Hb F

O arquivo FCS gerado após processamento no analisador hematológico é descarregado e analisado no programa *FCS Express V3* (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Canada) O *FCS Express V3* permite analisar os dados obtidos do processamento das amostras no analisador. No tratamento dos ficheiros FCS, a autofluorescência das células nucleadas pode ter a mesma intensidade que as células fetais e interferir na sua deteção, portanto é necessário excluir as células nucleadas selecionando essa população (*gate*) sobre o IAS (ângulo de 7º para a complexidade celular) versus FL3 (iodeto de propídio), excluindo FL3 positivos (células nucleadas). Os eritrócitos Hb F positivos detetaram-se por *gate* com base em IAS/FL1 (Anti-HbF). Visto que o método utilizado não requer a lavagem da amostra entre as incubações e com a adição dos reagentes utilizados na preparação da amostra, procedeu-se à diluição da mesma, sendo necessário após quantificação das células com Hb F, a multiplicação do valor obtido pelo factor de diluição (x5).

Valor de células F residuais na população estudada

O valor de CF residuais na população estudada foi obtido pela média das amostras do controlo normal, ou seja, o valor médio de células com Hb F em adultos saudáveis. Este valor permite evidenciar se existiu realmente um aumento de células com Hb F na gravidez em comparação com os valores dessas células em adultos saudáveis.

Determinação do valor de *cut-off* para HFM

O valor de *cut-off* foi obtido através dos valores do controlo positivo, ou seja, valores das diferentes misturas das células do cordão com células do adulto.

Considerou-se o valor de *cut-off*, o valor mínimo de células com Hb F em que se detetaram células fetais nas amostras do controlo positivo com concentração mais baixa (10%).

Organização dos dados

Os dados obtidos foram organizados e arquivados, de forma anónima, numa base de dados usando o *software Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Office Professional Edition 2007, Microsoft Corporation Copyright© 1985-2007)*.

Análise estatística

Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (25^o-75^o quartis) e desvio padrão. O teste *Kruskal-Wallis* de análise da variância unidireccional (ANOVA) foi utilizado para comparar as diferenças na percentagem das células com Hb F nos vários grupos estudados. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste *t-student* (não emparelhado).

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 (*GraphPad*, San Diego, CA). Valores estatisticamente significativos quando valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os histogramas e gráficos que se seguem são representativos de dados gerados a partir de amostras marcadas com iodeto de propídio e um mAc dirigido especificadamente para a Hb F. Visto que as células nucleadas têm a mesma intensidade de fluorescência que o anticorpo Anti-Hb F, elas podem interferir na detecção e quantificação de células com Hb F, sendo por isso necessário excluí-las. São excluídas pelo iodeto de propídio que as identifica no canal de fluorescência FL3. Por sua vez o mAc Anti-Hb F é detetado no canal de fluorescência FL1.

CONTROLO NORMAL E CONTROLO POSITIVO

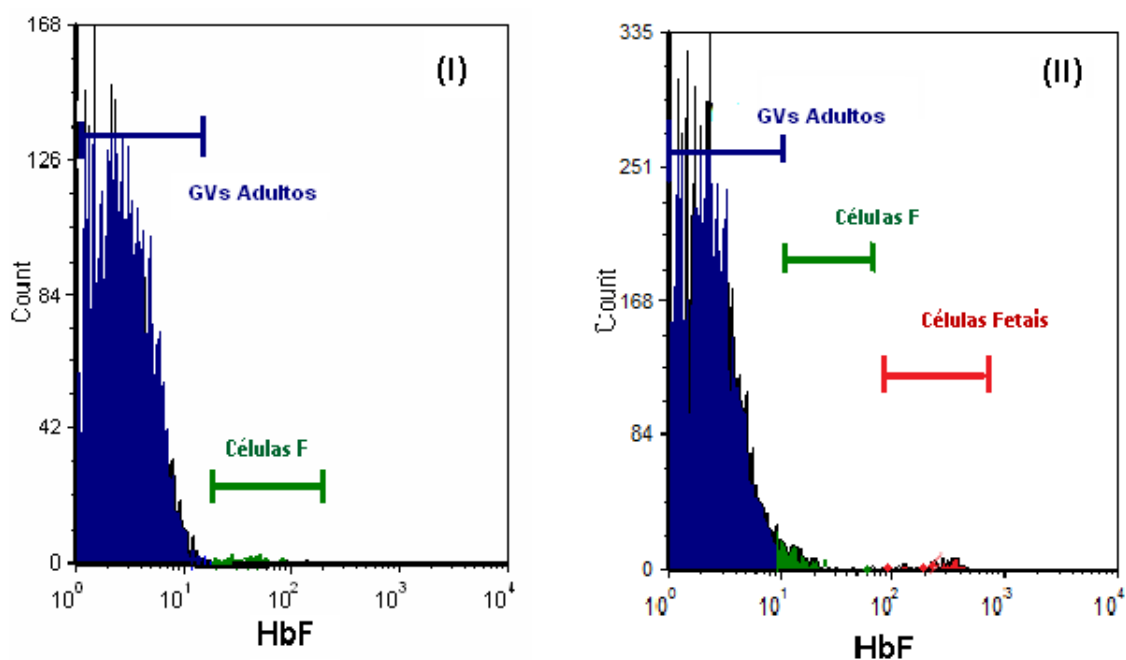


Figura 11 – Detecção de várias populações de células nos Controlos Normal e Positivo – (I) – Amostra controlo normal com indivíduos adultos masculinos saudáveis. (II) – Amostra controlo positivo obtida pela mistura de sangue do cordão com sangue do adulto.

No controlo Normal, a distinção entre os GVs adultos e as CF foi obtida pela positividade das CF a partir da primeira década (Figura 11 – I). Por sua vez, no controlo Positivo foi possível distinguir três populações de células distribuídas quantitativamente: GVs adultos (HbF-), CF (Hb F+) e uma última população de células (à direita no histograma), onde consideramos que possui uma maior quantidade de Hb F por célula (Hb F++) em relação às outras populações, e que sejam provavelmente células fetais (Figura 11 – II).

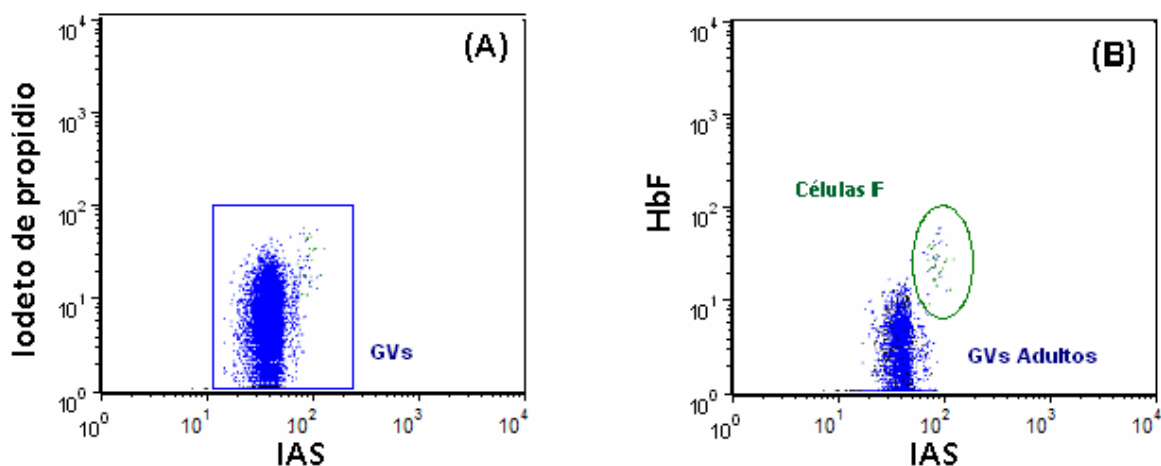


Figura 12 – Gráficos da amostra de Controlo Normal – (A) Exclusão de células nucleadas com *gate* em IAS/Iodeto de propídio; (B) Marcação das células Hb F positiva em IAS/Hb F, após exclusão de células nucleadas.

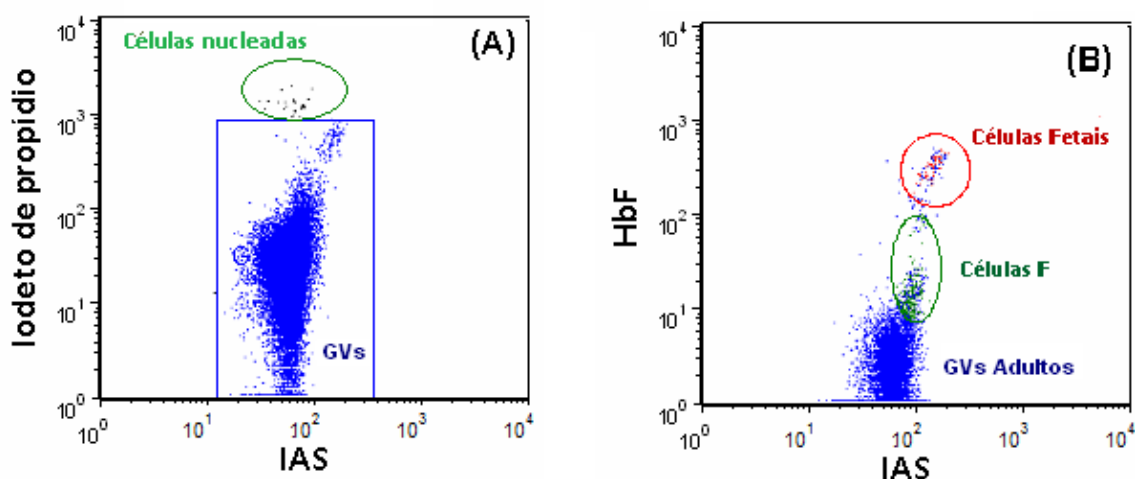


Figura 13 – Gráficos da amostra de Controlo Positivo – (A) Exclusão de células nucleadas com *gate* em IAS/Iodeto de propídio; (B) Marcação das células Hb F positiva em IAS/Hb F, após com exclusão de células nucleadas. A distinção entre as várias populações de células faz-se pela quantidade de Hb F: RBCs adultos (HbF-), CF (HbF+) e “células fetais” (HbF++).

No controlo Normal (Figura 12 – B) foram observadas duas populações de células, os GVs adultos e em menor quantidade, as CF (0.52%). Por sua vez, o controlo Positivo (Figura 13 – B) obtido pela mistura de sangue do cordão com sangue do adulto, permitiu detetar três populações de células distintas: GVs Adultos, CF (1,24%) e “células fetais” (2,12%).

A colocação do *gate* nas células fetais no gráfico B do controlo Positivo permitiu localizar as “células fetais” nos gráficos das restantes amostras.

POPULAÇÃO ESTUDADA

Os valores de CF considerados normais numa população de adultos saudáveis foram obtidos através da média de valores no grupo controlo normal. Assim, os valores residuais de CF na população de adultos saudáveis encontram-se no intervalo [0,00 - 0,53%].

A maioria das amostras nos diferentes grupos estudados apresentou % CF acima do valor residual ($> 0.53\%$). No 1ºT, 66% das amostras apresentaram % de CF superiores à média CF no Ctl N, no 2ºT são 83% e no 3ºT, 91% das amostras. Evidenciado já pela literatura, o que podemos também afirmar que a gravidez leva ao aumento das CF, no entanto, nem todas as grávidas dos vários grupos estudados apresentam CF acima do valor residual.

O valor de *cut-off* usado para a suspeita de HFM foi calculado como o valor mínimo em que se detetou células fetais nas misturas de sangue do cordão com sangue do adulto (Ctl P). O valor mínimo foi detetado numa diluição de 10% de sangue do cordão em sangue do adulto e foi de 1,70% de células com Hb F. Assim, para este método, nas amostras com valores superiores a 1,70% de células com Hb F, deve-se suspeitar de HFM e enviar as amostras para confirmação de HFM por citometria de fluxo pelo método Anti-Hb F/Anti-CA.

A figura seguinte apresenta a percentagem de células com Hb F nos diferentes grupos de população estudados.

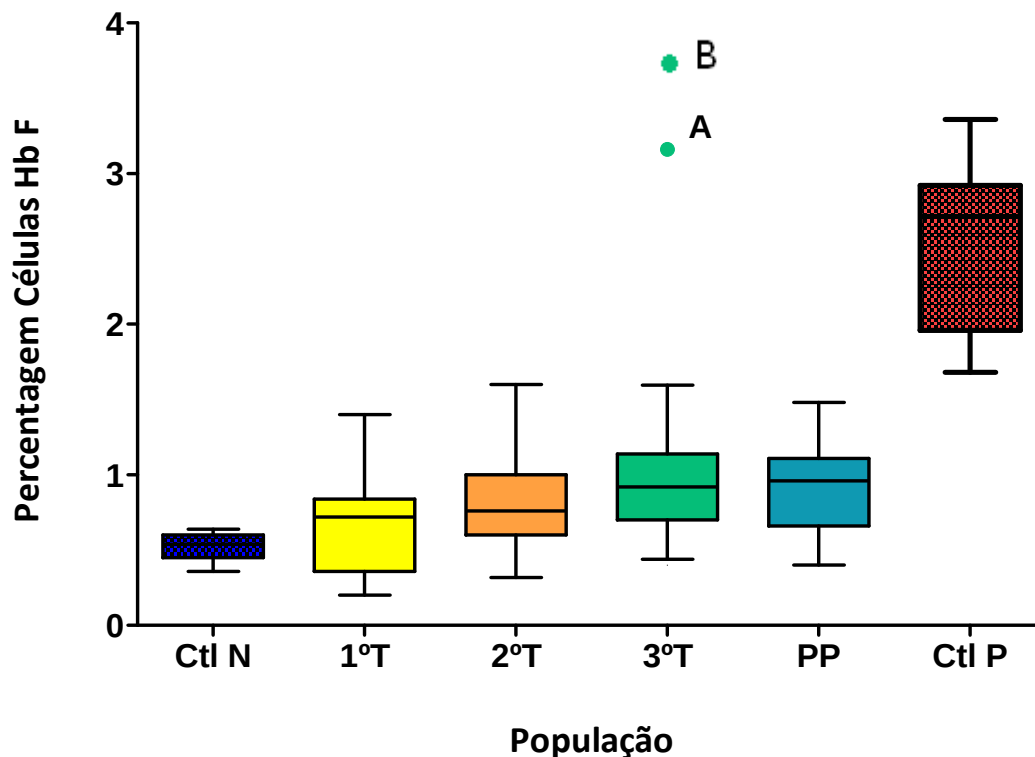


Figura 14 – Box plot das células com Hb F nos vários grupos estudados – Representação dos vários grupos estudados: 1ºT, 2ºT, 3ºT, Ctl N e Ctl P. As *box plot* apresentam o 25-75º quartil, a linha da *box plot* é o valor da mediana, enquanto os limites superior e inferior indicam o máximo e o mínimo, respectivamente. **Ponto A e B** – Amostras do 3º T da gravidez com valores de células com Hb F muito elevados (3,16% e 3,68%, respectivamente). Diferenças significativas nas populações estudadas ($p < 0.0001$) segundo o teste de *Kruskal-Wallis*.

Observou-se um aumento na percentagem de células com Hb F no sangue materno durante a gravidez e pós parto. Como era esperado, a população controlo Positivo é a população com maior percentagem de células com Hb F em relação às restantes populações. Por sua vez, o Ctl N evidenciou valores residuais de células com Hb F numa população adulta saudável. Comparado com a restante população apresentou níveis inferiores de células com Hb F, comprovando que o estado de gravidez leva ao aumento dessas células na circulação materna. No entanto, duas amostras pertencentes ao 3ºT da gravidez (Ponto A e B) atingiram valores elevados de células com

Hb F (3,16% e 3,68%, respectivamente). Nestas amostras foi obtido o diagnóstico de HFM por CMF com Anti-HbF/Anti-CA..

Tabela 2 – Dados estatísticos dos vários grupos estudados.

	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Teste de Kruskal-Wallis Valor p *
1º T N=29	0.20	1.40	0.65	0.72	0.29	<0.0001
2º T N=43	0.32	1.60	0.81	0.76	0.28	
3º T N=82	0.40	3.68**	0.98	0.94	0.47	
PP N=14	0.40	1.48	0.92	0.96	0.34	
Ctl N N=32	0.36	0.64	0.53	0.54	0.1	
Ctl P N=30	1.70	3.36	2.57	2.72	0.54	

*- Estatisticamente significativo se $p \leq 0,05$.

** - Valor máximo alto à custa de amostras com diagnóstico de HFM.

A tabela 2 fornece dados estatísticos sobre a média, mediana, valor máximo e mínimo de cada população estudada. Ao comparar os vários grupos estudados, 1ºT, 2ºT, 3ºT, PP, Ctl N e Ctl P verificaram-se diferenças significativas ($p < 0.0001$ pelo teste de *Kruskal-Wallis*).

Após estudar as várias populações, decidiu-se evidenciar alguns exemplos de resultados obtidos que podem ter algum significado para a conclusão deste trabalho.

Tabela 3 – Comparação entre grupos estudados

	Valor p *	Teste <i>t-student</i> não emparelhado
Ctl N vs 1º T	0,0217	2.358
1º T vs 3º T	0,0007	3.475
Ctl N vs PP	<0,0001	6.110

*- Estatisticamente significativo se $p \leq 0,05$.

CONTROLO NORMAL vs 1º TRIMESTRE

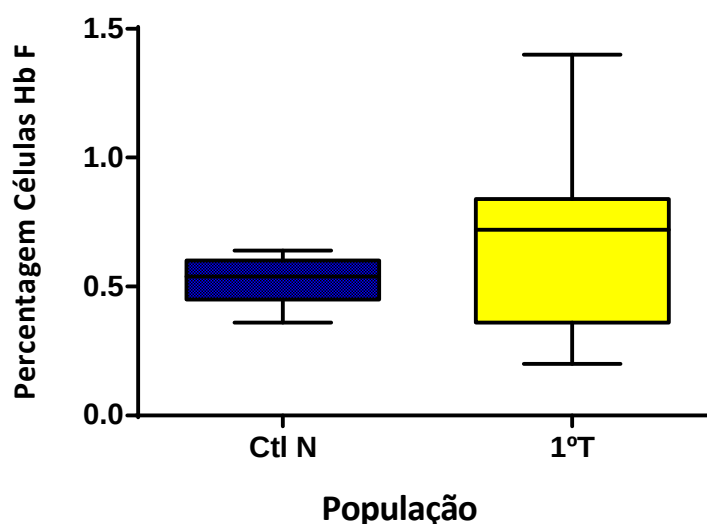


Figura 15 – Box plot Ctl N vs 1ºT - Comparação de células com Hb F no adulto saudável com o 1º Trimestre de gestação. A box plot apresenta o 25-75º quartil, a linha é o valor da mediana, enquanto os limites superior e inferior indicam o máximo e o mínimo, respectivamente. Pequenas diferenças significativas entre as populações estudadas ($p = 0.0217$) segundo o teste *t-student* não emparelhado.

Constatou-se que o estado de gravidez leva a um aumento de células com Hb F, evidenciado logo no 1ºT da gravidez que apresenta percentagens mais elevadas destas células que na população adulta saudável (Figura 15). Verificaram-se pequenas diferenças, mas significativas ($p=0.0217$; $t=2.358$) entre a população do controlo Normal e a população do 1ºT da gravidez (Tabela 3).

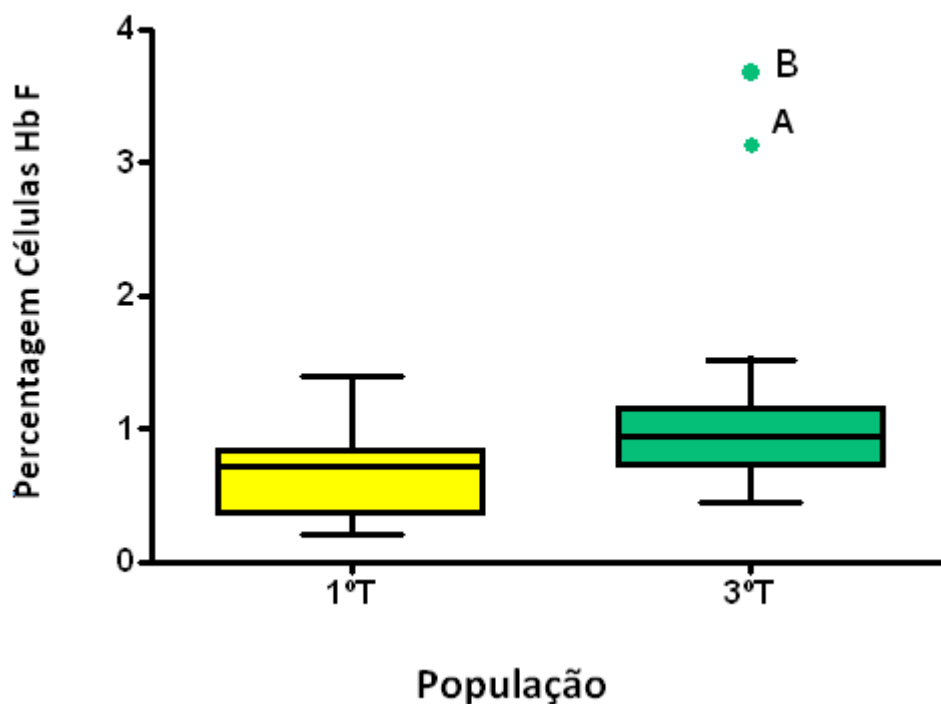
1º TRIMESTRE vs 3º TRIMESTRE

Figura 16 – Box plot 1ºT vs 3ºT - Comparação de células com Hb F no 1º Trimestre com o 3º Trimestre. A *box plot* apresenta o 25-75º quartil, a linha da *box plot* é o valor da mediana, enquanto os limites superior e inferior indicam o máximo e o mínimo, respectivamente. Ponto A e B – Amostras do 3º T da gravidez com valores de células com Hb F muito elevados (3,16% e 3,68, respectivamente). Diferenças significativas entre as populações estudadas ($p = 0.0002$) segundo o teste de t-student não emparelhado.

Comprovado o aumento de células com Hb F na gravidez, podemos verificar que esse aumento é ao longo da gravidez, tendo valores mais elevados no último trimestre da gravidez em relação ao primeiro (Figura 16). Neste caso, existem diferenças significativas ($p=0,0007$; $t=3.475$) entre o 1ºT e o 3ºT da gravidez (Tabela 3).

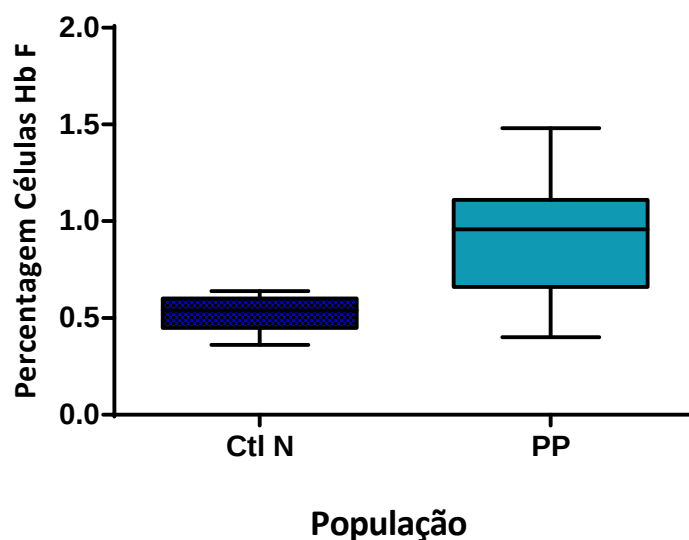
CTL N vs PÓS PARTO

Figura 17 – Box plot Ctl N vs PP - Comparação de células com Hb F no Ctl N com pós parto. A *box plot* apresenta o 25-75º quartil, a linha da *box plot* é o valor da mediana, os limites superior e inferior indicam o máximo e o mínimo, respectivamente. Há diferenças significativas entre as populações estudadas ($p < 0,0001$) segundo o teste de t-student não emparelhado.

No período pós parto as células com Hb F mantiveram valores elevados no sangue materno em relação ao grupo sem gravidez, Ctl N (Figura 17). Há diferenças significativas ($p < 0,0001$; $t = 6.110$) na população do Ctl N e PP (Tabela 3).

Não nos foi possível determinar por quanto mais tempo as células com Hb F se mantêm elevadas após o parto, devido à inexistência de amostras após 7 dias do parto.

Foi efetuada uma seleção de alguns exemplos de resultados obtidos relevantes para uma melhor compreensão do estudo, descritos a seguir.

AMOSTRA PÓS PARTO

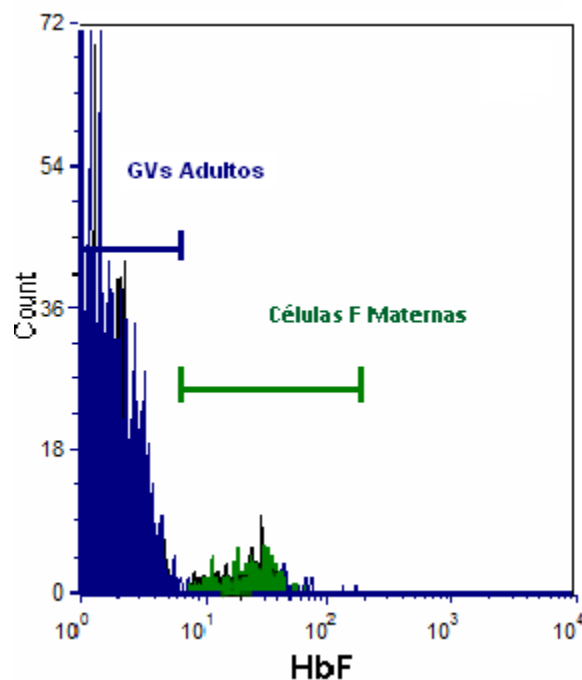


Figura 18 – Detecção das várias populações de células numa amostra Pós Parto - Amostra de PP, onde se observa duas populações distintas de células: RBCs adultos e CF maternas.

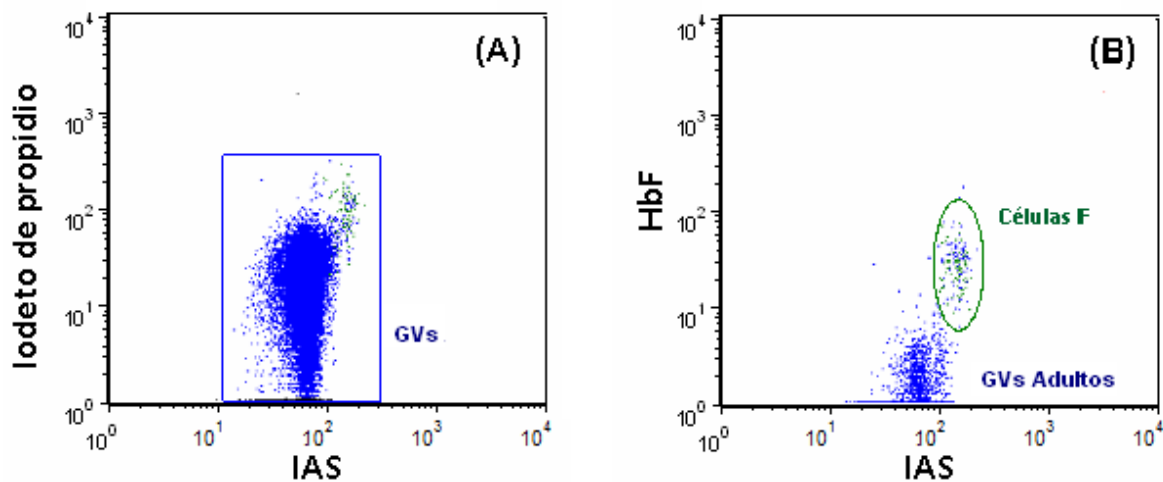


Figura 19 – Gráficos de uma amostra de Pós Parto – (A) Exclusão de células nucleadas com *gate* em IAS/Iodeto de propídio; (B) Marcação das células Hb F positiva em IAS/Hb F, após *gate* com exclusão de células nucleadas.

Existem casos de partos traumáticos em que há passagem de sangue fetal para a circulação materna, tornando importante a detecção de HFM nestes casos.

Nesta amostra pós parto detetaram-se duas populações de células: GVs adultos e CF (1,2%), mas não se observaram “células fetais” no sangue materno, não havendo por isso contaminação do sangue materno com o sangue fetal.

AMOSTRA 3º TRIMESTRE

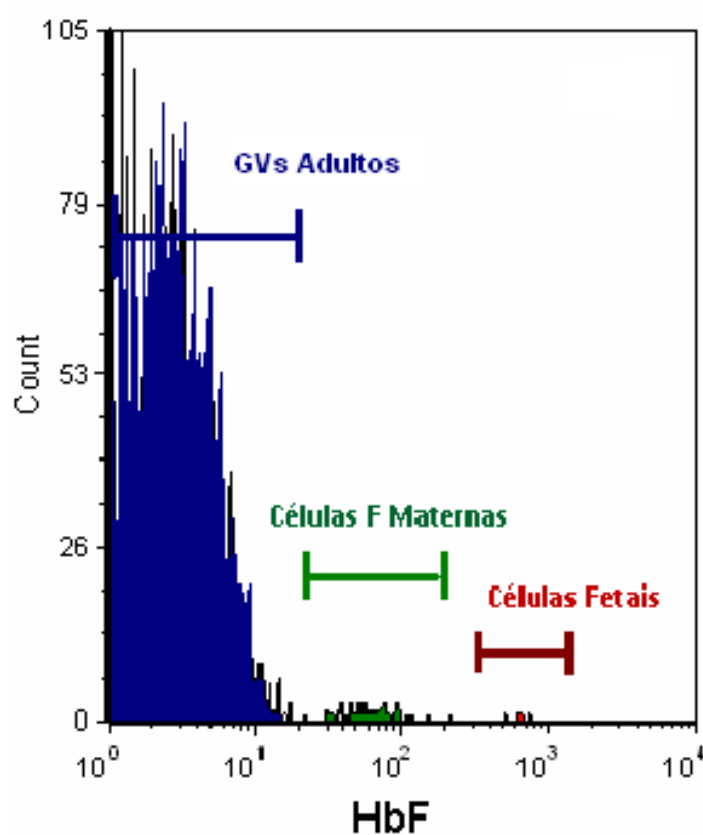


Figura 20 – Detecção das várias populações de células numa amostra 3º Trimestre - Amostra do 3ºT da gravidez, onde se observaram três populações distintas de células: GVs adultos, CF maternas e “células fetais”.

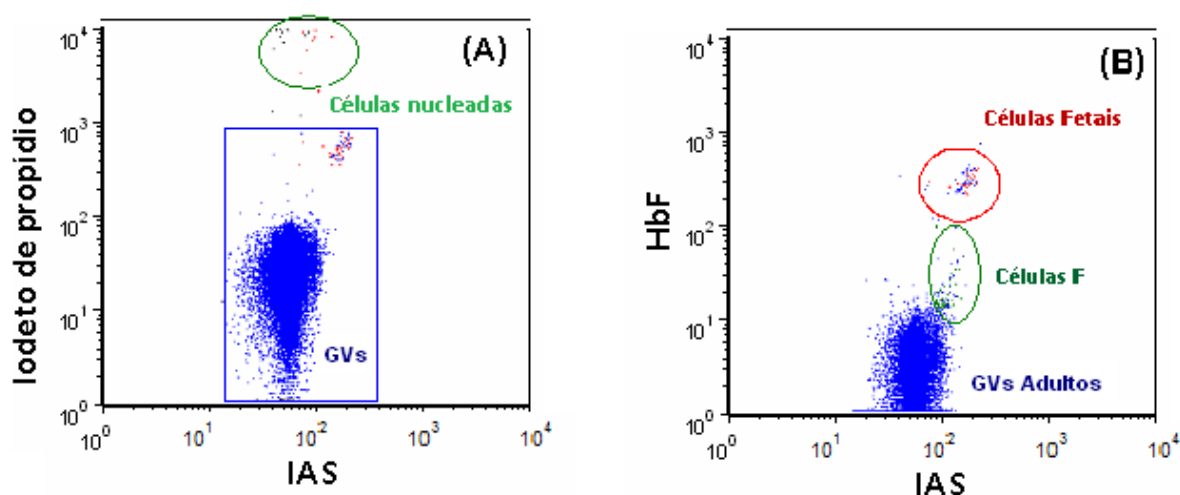


Figura 21 – Gráficos de uma amostra do 3ºTrimestre de gravidez – (A) Exclusão de células nucleadas com *gate* em IAS/Iodeto de propídio; **(B)** Marcação das células Hb F positiva em IAS/Hb F, após *gate* com exclusão de células nucleadas. Identificação de três populações: GVs adultos (HbF-), CF (HbF+) e “células fetais” (HbF++).

Nesta amostra do 3ºT da gravidez foram detetadas três populações de células: GVs adultos, CF (1,16%) e prováveis “células fetais” (2%). Através do *gate* efetuado à população de células que suspeitamos ser as células fetais no gráfico do controlo positivo (Figura 12 – B) podemos detetar com exatidão a mesma população de “células fetais” nesta amostra (Figura 21 – B), pois ambas têm a mesma localização nos gráficos.

TESTE DE IMPRECISÃO

A determinação da imprecisão do método em estudo foi realizada com cinco amostras com % variáveis de células com Hb F, obtidas pela mistura de diferentes quantidades de sangue do cordão e sangue do adulto, à exceção da Amostra 1, que pertence a uma amostra do controlo normal. Efetuaram-se leituras consecutivas da mesma amostra no analisador.

Tabela 4 – Imprecisão do método – Amostras processadas cinco vezes consecutivas no analisador hematológico.

Repetições	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
1	0,52	1,71	2.52	2.82	3.28
2	0,56	1,74	2.60	2.88	3.36
3	0,52	1,72	2.70	2.90	3.33
4	0,56	1,75	2.55	2.90	3.32
5	0.52	1,72	2.62	2.84	3.30
Média	0.54	1.73	2.60	2.87	3.32
Desvio Padrão	0.02	0.02	0.07	0.04	0.03
CV	4.09%	0.95%	2.67%	1.27%	0.91%

As amostras com valores baixos de células com Hb F, como por exemplo, 0.52%, têm um coeficiente de variação (CV) $\pm$ 4%. O teste foi, portanto, preciso para pequenas % de células com Hb F (Tabela 4).

ALGORITMO

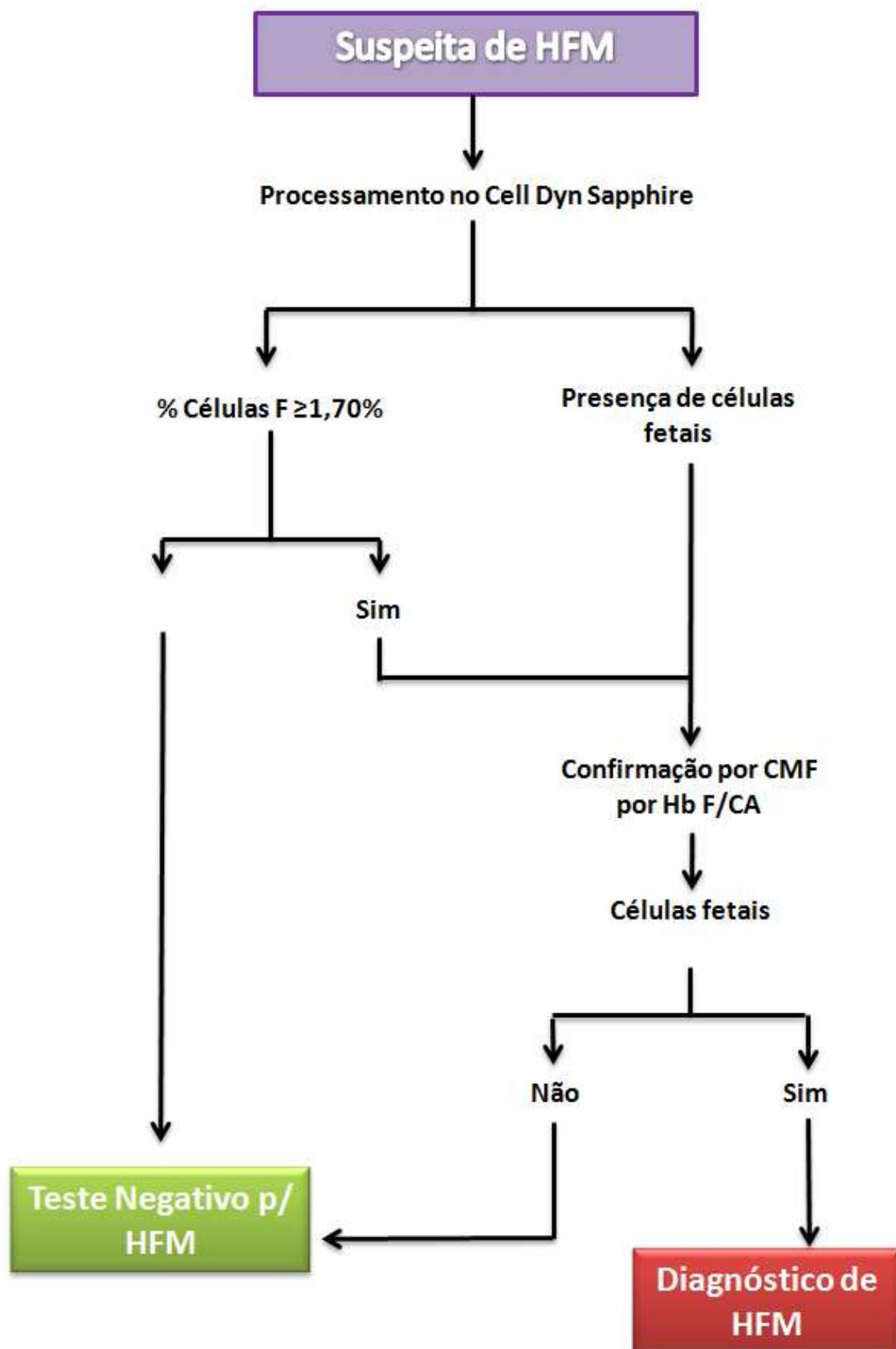


Figura 22 – Algoritmo – Para despiste de amostra com suspeita de HFM.

DISCUSSÃO

Apesar da circulação do sangue materno e fetal estar totalmente separada é comum, durante a gravidez, existir a passagem transplacentária de células fetais para o sangue materno. Estudos são necessários e importantes para detetar e quantificar as células fetais que entram na circulação sanguínea materna. Vários métodos, já descritos, podem ser utilizados (2,18,24,25).

No presente estudo, utilizando um analisador hematológico usado na rotina laboratorial, explorando a capacidade de CMF que o analisador dispõe através do uso de anticorpos monoclonais e o processamento de amostras em modo *RBC Flow*, foi possível detetar de forma rápida e sensível os eritrócitos com Hb F.

Tratando-se de um estudo de rastreio e não de diagnóstico, pretendeu-se somente detetar e quantificar as células com Hb F no sangue materno. As misturas de sangue do cordão com o sangue de adulto (Controlo Positivo) forneceram uma preciosa ajuda, permitindo localizar com exatidão as várias populações de células (GVs adultos, CF e células fetais) nos gráficos e histogramas das amostras e assim, distinguir as CF das células fetais.

Os valores de CF na gravidez foram maiores que no adulto saudável, comprovando-se, nos resultados obtidos, que o estado de gravidez leva ao aumento destas células.

As CF aumentaram com a progressão da gravidez, apresentando valores mais elevados no final em comparação com o início da gravidez.

Depois do parto os valores tendem a aumentar ou a manter-se elevados durante as primeiras semanas após parto, notando-se diferenças significativas na % de células com Hb F entre o grupo do PP e o Ctl N. Devido à inexistência de amostras num período mais tardio (> 1 semana) após o parto não foi possível comprovar se os valores de CF atingem a normalidade, mas segundo a literatura prevê-se que entre 6 a 8 semanas, os valores de CF atinjam os valores de adultos saudáveis.

Como nos indivíduos adultos saudáveis existe uma quantidade residual de CF em circulação, optou-se por determinar o valor médio para essas células usando o grupo controlo constituído por adultos masculinos saudáveis. Os valores residuais de CF num adulto saudável são de 0,00 a 0,53%.

Apesar de a gravidez ser uma condição para o aumento de células com Hb F no sangue materno, na população de grávidas estudadas, verificou-se que nem todas apresentam uma % de células com Hb F superior ao valor residual de CF.

Em duas das amostras estudadas pertencentes ao terceiro trimestre da gravidez, foram detetadas células fetais num gráfico de fluorescência bi-paramétrica de IAS vs anti-Hb F (Exemplo Figura 21 – B), e num histograma de fluorescência de parâmetro único de Hb F (Exemplo figura 20). Nestas amostras, foi possível detetar e quantificar células fetais na amostra de sangue materno. Como o método utilizado é um método de rastreio, as amostras foram enviadas para quantificação de células fetais por citometria de fluxo para despiste de HFM. Esta quantificação efetuou-se pela distinção de CF da mãe e células fetais do feto através do uso do mAc Anti-Hb F e do anticorpo policlonal Anti-CA. Nestas amostras, correlacionando os dados obtidos com a história clínica da paciente, foi obtido o diagnóstico de HFM. Para além das duas amostras do terceiro trimestre com valores elevados de células com Hb F, até ao final deste estudo não foram detetadas células fetais em mais nenhuma amostra.

A análise de misturas de sangue do cordão com sangue de adulto junto com a investigação de amostras de mulheres grávidas permitiu validar o teste utilizado como um método seguro e eficiente, tal como a elaboração de um algoritmo para o rastreio de HFM.

CONCLUSÃO

Um aumento anormal de células com Hb F na circulação sanguínea pode estar associado a várias patologias hematológicas, a estados de stress hematológico ou a gravidez.

Durante a gravidez, traumas abdominais, infecções intrauterinas e deslocamento da placenta podem resultar na passagem de células fetais para o sangue materno, apesar de a circulação de sangue materno e fetal estar totalmente separada, resultando em HFM, nem sempre com sinais clínicos visíveis (2).

Por tudo isto, tornou-se é indispensável dispor de técnicas especializadas que permitem detetar e/ou quantificar a HFM. Mas inerente aos custos elevados dos equipamentos necessários para CMF, tornou-se cada vez mais importante automatizar a técnica e rentabilizar os equipamentos já utilizados, como os analisadores hematológicos já utilizados na rotina laboratorial (25).

O uso do *Cell-Dyn Sapphire*[™] foi uma ferramenta importante para este estudo. Ao executar testes em *Open Flow* com o uso de anticorpos monoclonais, permitiu expandir a utilidade do analisador, a um custo significativamente reduzido.

Com este estudo comprovou-se que durante a gravidez existe um aumento de eritrócitos com Hb F na circulação materna, e que esse aumento é ao longo da gravidez, tendo valores mais elevados no último trimestre gravidez, o que está de acordo com a literatura (2,8). Este aumento de células com Hb F, para além de ser uma consequência do estado de gravidez, que poderá nem sempre se verificar, mas na maioria dos casos ser algo mais e ameaçar a sobrevivência do feto. Nestes casos, tornou-se necessário verificar se o aumento se deve, somente à custa de CF ou se de células fetais. Este estudo apesar de permitir a distinção inicial de CF e prováveis células fetais, funcionou como um teste de rastreio, e portanto todas as amostras de sangue materno em que haja a deteção de prováveis células fetais ou uma % de células com Hb F superior ao *cut-off* ($\geq 1,70\%$), estas devem ser encaminhadas para confirmação de HFM por citometria de fluxo usando anticorpos anti-Hb F e anti-CA.

O uso do analisador hematológico, implementado na rotina laboratorial, em conjunto com o algoritmo elaborado, permitiram de uma forma rápida, barata e fiável a obtenção de resultados que poderão direcionar para HFM.

Existem casos, como trauma abdominal, que com a indicação de emergência, requer a realização de testes rápidos de despiste de HFM (24). O estudo de HFM aplicado a um analisador hematológico foi realizado e analisado em uma hora para uma

série de 10 amostras, incluindo controlos Normal e Positivo, o que é compatível com as exigências cada vez maiores de eficiência do laboratório e pode ser uma ferramenta interessante em casos de emergência, como uma avaliação preliminar de amostras com suspeita de HFM.

Numa visão futura, a quantificação exata de CF num analisador hematológico poderá ser útil em doenças de hemoglobina, persistência hereditária de Hb F e síndromes mielodisplásicas (24).

Devido ao custo reduzido e rápida e fácil execução, este método de rastreio poderá, no futuro, integrar o protocolo das análises de rotina efetuado nas grávidas, permitindo detetar as HFM silenciosas que são a origem de muitas anemias de causa desconhecida em recém-nascidos.

BIBLIOGRAFIA

1. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood*. 2006 Jan 15; 107(2):435–43.
2. Bakker-Jonges L, Grootfaam D, Duvekot J. The Detection of Foetal Red Blood Cells in Maternal Blood Samples by Dual Flow Cytometry. *Haematology*. 2008; 58–61.
3. Bain BJ. *Haemoglobinopathy Diagnosis*. 2nd ed, Blackwell Publishing Ltd; 2006.
4. Manca L, Masala B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB Life*. 2008 Feb;60(2):94–111.
5. Bain BJ, Lewis SM. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier Ltd; 2011.
6. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 15;18(R2):R216–23.
7. Mosca A, Paleari R, Leone D, Ivaldi G. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies. *Clin Biochem*. 2009 Dec ;42(18):1797–801.
8. Franco RS, Yasin Z, Palascak MB, Ciralo P, Joiner CH, Rucknagel DL. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. *Blood*. 2006 Aug 1; 108(3):1073–6.
9. Musielak M. Genetically based states of elevated quantity of foetal haemoglobin (Hb F) in healthy individuals and patients. *Pol Merkur Lekarski*. 2011 Jan; 30 (175):62-5.
10. Edoh D, Antwi-Bosaiko C, Amuzu D. Fetal hemoglobin during infancy and in sickle cell adults. *Afr Health Sci*. 2006 Mar; 6(1):51–4.
11. Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, Chan V, Davis B, Fucharoen S, et al. ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin F. *Int J Lab Hematol*. 2012 Feb; 34 (1):14–20.

12. Wit H, Nabbe KC, Kooren JA, Adriaansen HJ, Roelandse-Koop EA, Schuitemaker JH, et al. Reference values of fetal erythrocytes in maternal blood during pregnancy established using flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2011 Oct; 36(4):631–6.
13. Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal hemorrhage. *Obstet Gynecol*. 2010 May; 115(5):1039–51.
14. Little BH, Robson R, Roemer B, Scott CS. Immunocytometric quantitation of foeto-maternal haemorrhage with the Abbott Cell-Dyn CD4000 haematology analyser. *Clin Lab Haematol*. 2005 Feb; 27(1):21–31.
15. Vicente LF, Pinto G, Serrano F, Soares C, Alegria AM. Profilaxia da isoimunização Rh D+: uma proposta de protocolo. *Acta médica portuguesa* 2003; 16: 255-60
16. Solomon N, Playforth K, Reynolds EW. Fetal-Maternal Hemorrhage□: A Case and Literature Review. *Am J Perinatol Rep*. 2012; 2(01): 7–14.
17. Baioch E. Avaliação da hemorragia feto-materna em puérperas com indicação para ministração de imunoglobulina anti-D. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 2005; 21(5):1357-65.
18. Davis BH, Davis KT. Laboratory Assessment of Fetomaternal Hemorrhage is Improved Using Flow Cytometry. *Lab Medicine*. 2007 Jun; 38(6): 365–71.
19. Dziegiel MH, Nielsen LK, Berkowicz A. Detecting fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Curr Opin Hematol*. 2006 Nov; 13(6):490–5.
20. Augustson BM, Fong EA, Grey DE, Davies JI, Erber WN. Postpartum anti-D: can we safely reduce the dose? *Med J Aust*. 2006 Jun 19; 184(12):611–3.
21. Studnickova M, Lubusky M, Simetka O, Petros M, Ordeltova M, Prochazka M, et al. The influence of maternal age, parity, gestational age and birth weight on fetomaternal haemorrhage during spontaneous delivery. *Ceska Gynekol* .2012 Jun; 77(3):256–61.
22. Austin E, Bates S, Silva MD, Howarth D, Rowley M, Scott M et al. Guidelines for the Estimation of Fetomaternal Haemorrhage. *BCSH*. 2009: 1–23.
23. Davis BH, Ben-Ezra J, Bohmer MB, Clark-Stuart M, Lowder J, Mahoney W et al. Fetal Red Cell Detection; Approved Guideline Serving the World ' s Medical

-
- Science Community Through Voluntary Consensus. NCCLS document H52-A. 2001: Vol. 21 No. 26
24. Pastoret C, Priol JL, Fest T, Roussel M. Evaluation of FMH QuikQuant for the Detection and Quantification of Fetomaternal Hemorrhage. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012 Oct:1.
 25. Kim YA, Makar RS. Detection of fetomaternal hemorrhage. *Am J Hematol.* 2012 Apr; 87(4): 417–23.
 26. Agarwal P, Sekhar Das S, Gupta R, Khetan D, Chaudhary R. Quantification of fetomaternal hemorrhage: selection of techniques for a resource-poor setting. *Gynecol Obstet Invest.* 2011 Jan; 71(1): 47–52.
 27. Wong L, Hunsberger BC, Bruce Bagwell C, Davis BH. Automated quantitation of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry for HbF-containing fetal red blood cells using probability state modeling. *Int J Lab Hematol.* 2013 Mar.
 28. Das SS, Agarwal P, Chaudhary R. Gel Technology: An Easy and Useful Method for Estimating Fetomaternal Hemorrhage in the Blood Banks of Developing Nations. *Lab Medicine.* 2010 Mar; 41(3):147–9.
 29. Oneal PA, Gantt NM, Schwartz JD, Bhanu NV, Lee YT, Moroney JW, et al. Fetal hemoglobin silencing in humans. *Blood.* 2006 Sep 15;108(6):2081–6.
 30. Kumpel B. Are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion.* 2006 Jun; 46(6):1061–2.
 31. Kumpel BM. Labeling D+ RBCs for flow cytometric quantification of fetomaternal hemorrhage after the RBCs have been coated with anti-D. *Transfusion.* 2001 Aug; 41(8):1059–63.
 32. Fong EA, Finlayson J, Robins F, Davies J, Joseph J, Rossi E, et al. Evaluation of a new rapid anti-HbF FITC assay, Trillium QuikQuant, for detection and quantitation of foetomaternal haemorrhage. *Int J Lab Hematol.* 2012 Aug 14.
 33. Merz WM, Patzwaldt F, Fimmers R, Stoffel-Wagner B, Gembruch U. Dual-colour flow cytometry for the analysis of fetomaternal haemorrhage during delivery. *J Clin Pathol.* 2012 Feb; 65(2):186–7.
-

34. Müller R, Mellors I, Johannessen B, Aarsand AK, Kiefer P, Hardy J et al. European multi-center evaluation of the Abbott *Cell-Dyn Sapphire*[™] hematology analyzer. ISLH. 2006 Jan;12(1):15–31.
35. Cell-Dyn Sapphire[™] Operator's Manual. Abbott Diagnostics; 2009.
36. Abbott diagnostics. Cell-Dyn Sapphire[™] Extended Immunofluorescent Applications; 2001.
37. Abbott diagnostics. The Power of true fluorescence - Cell-Dyn Sapphire[™] Open Flow for patient care; Abril 2008.
38. Trillium Diagnostics. Rapid Assay for Fetomaternal Hemorrhage Quantitation; 1-8.