

Doença Hemolítica Perinatal

Giovanni Fraga Lenza

Flavio Monteiro de Souza

Alexandre Trajano

Marcos Vianna Lacerda de Almeida

Joelma Lira Jacob Barbosa

A doença hemolítica perinatal (DHPN) afeta o feto e o recém nascido, sendo consequência da agressão às hemácias do concepto provocada por anticorpos maternos. Os anticorpos podem surgir por aloimunização¹ materna depois de contato com antígenos encontrados em hemácias incompatíveis com as suas. Este contato pode ser resultado de passagem de sangue do feto para a mãe (transfusão feto-materna) ou de hemotransfusões².

A passagem destes anticorpos através da placenta para a circulação fetal acaba por provocar hemólise no feto, se seu sangue for incompatível com o da mãe. A anemia hemolítica resultante leva à produção e identificação no sangue periférico fetal e do recém-nascido de hemácias jovens e imaturas, os **eritroblastos**. Por isso, esta doença também é conhecida como **eritroblastose fetal**.

A anemia também motiva o aparecimento de focos de eritropoiese fora da medula óssea do feto, o que pode ser acompanhado de hepatoesplenomegalia, insuficiência hepática, hipoproteinemia, insuficiência cardíaca e anasarca. Por fim, o óbito do feto ou do recém-nascido pode ocorrer.

O **fator Rh** é o antígeno de superfície das hemácias mais importante na gênese da DHPN, principalmente pela magnitude da hemólise que ele provoca. No entanto, outros antígenos de superfície, incluindo o sistema AB0 e antígenos que formam anticorpos irregulares (*Kell, E, Cellano, Duffy, Kidd* etc.), também podem causar a doença.

Na **incompatibilidade Rh**, os **anticorpos anti-Rh** presentes em **mães Rh negativo previamente aloimunizadas** por contacto com sangue **Rh positivo** atingem a circulação fetal e, **caso ele seja Rh positivo**, destroem suas hemácias.

Em 98% dos casos, a DHPN é provocada pelos sistemas AB0 e Rh. O sistema AB0 é o que responde pela maioria dos casos (65%) embora a doença seja de menor gravidade

¹ Aloimunização é a produção de anticorpos contra antígenos de indivíduos da mesma espécie que possuam genótipos diferentes.

² Há a possibilidade de sensibilização pela microtransfusão que pode ocorrer quando do uso de drogas ilícitas compartilhando seringas e agulhas.

quando comparada àquela provocada pelo sistema Rh. Os demais 2% dos casos são secundários a outros antígenos citados acima, que levam à formação de anticorpos irregulares.

A prevalência de pessoas Rh negativo na população mundial varia segundo a raça: 15% na branca, 8% na negra e 1% na amarela.

ETIOPATOGENIA

Para haver DHPN, é necessário que (Figura 1):

- Haja incompatibilidade sangüínea entre a mãe e o feto que está sendo gerado
- A gestante esteja aloimunizada
- Os anticorpos circulantes na gestante cheguem à circulação fetal e
- Estes anticorpos destruam as hemácias do bebê.

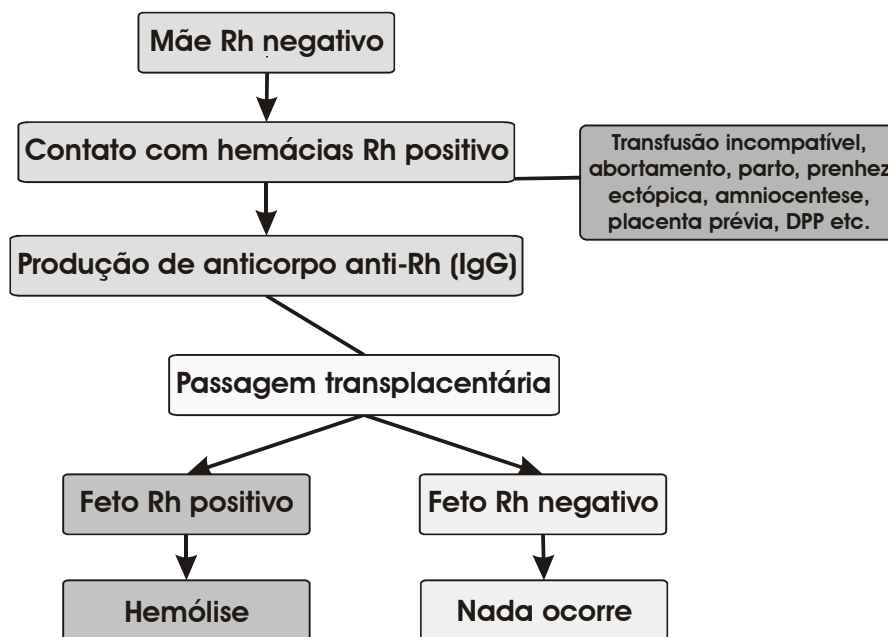


Figura 1 – História natural da Doença Hemolítica Perinatal pela incompatibilidade Rh

Incompatibilidade sangüínea entre a mãe e o feto

A incompatibilidade sangüínea materno-fetal ocorre quando algum antígeno está ausente na superfície da hemácia materna (por exemplo, mãe Rh negativo) e presente na fetal (Rh positivo, por exemplo).

O fator Rh é a expressão de três pares de genes situados no braço curto do cromossoma 1 (pares C, D e E). O par "D" é o mais importante, por ter maior poder antigênico. Na maior parte das vezes, o anticorpo anti-D é utilizado para a tipagem do fator Rh. Quando se afirma que o indivíduo é Rh positivo ele, na verdade, é "D" positivo, podendo ser homozigoto ("DD") ou heterozigoto ("Dd"); se for Rh negativo, ele será "dd" e não terá antígeno D na superfície da hemácia.

Observou-se que em algumas pessoas portadoras do alelo "D", o teste habitualmente realizado para a determinação do Rh (anticorpo anti-D) exibia resultado negativo. O indivíduo era, então, classificado como Rh negativo. No entanto, ao se fazer teste mais apurado³, constatava-se que o indivíduo possuía, na realidade, o alelo "D" apresentando expressão fenotípica fraca, o que implicava em resultado falso-negativo. Estas pessoas são classificadas, então, como possuindo o **fator D^u**. As pessoas com fator D^u positivo se comportam, portanto, como pessoas Rh positivo, já que possuem o antígeno "D" na superfície das hemácias e não produzem anticorpos anti-D. Todas as gestantes Rh negativo devem ser submetidas à pesquisa do fator D^u que, se positivo, indica que a gestante se comporta, na realidade, como indivíduo Rh positivo.

Aloimunização materna

A aloimunização materna se caracteriza pela formação de anticorpos contra antígenos de superfície das hemácias e desenvolvimento de memória imunológica. Várias situações podem promover a entrada na circulação materna de antígenos por ela desconhecidos. Podem ser diretas e óbvias, como a transfusão de sangue incompatível, ou menos evidentes, como a gestação de conceitos com sangue incompatível com o da mãe.

Passagem de sangue fetal para a circulação materna

As hemácias fetais são produzidas a partir de 8 semanas de gravidez e a possibilidade de passagem de sangue do feto para a mãe aumenta com o evoluir da gestação. É no parto, no entanto, que se observa com maior freqüência a passagem de

³ Este "teste mais apurado" é realizado utilizando técnica de Coombs. Não confundir, porém, com o "teste de Coombs" que será discutido mais adiante.

hemácias do feto para a circulação materna. Estima-se que em 99,5% das vezes o volume transfundido seja de, no máximo, 0,2 mL.

Alguns fatores que podem **aumentar o volume da transfusão feto-materna** são:

- Gravidez gemelar.
- Traumatismo abdominal.
- Extração manual da placenta.
- Síndromes hemorrágicas da gestação (abortamento, prenhez ectópica, doença trofoblástica gestacional, descolamento prematuro da placenta, placenta prévia, rotura uterina).
- Operação cesariana.
- Procedimentos invasivos (biópsia do vilo coriônico, amniocentese, cordocentese).

A hemácia fetal pode ser identificada na circulação materna pelo **Teste de Kleihauer & Betke** que permite diferenciar a hemoglobina fetal da materna. Este teste permite estimar o volume de sangue transfundido.

Deteção do antígeno pelo sistema de defesa da mãe

Para que a aloimunização ocorra, é necessária a presença de apenas 0,01 mL de sangue fetal na circulação materna. No entanto, só 1 em cada 23 gestantes Rh negativo gerando filhos Rh positivo forma anticorpos.

Quando há incompatibilidade AB0 simultaneamente à incompatibilidade Rh, a incidência de aloimunização materna pelo fator Rh é menor. Isto ocorre pelo provável efeito protetor que o sistema AB0 confere à imunização Rh, já que os anticorpos naturais anti-A e anti-B, característicos de mulheres do grupo 0, eliminam as hemácias fetais do grupo A, B ou AB antes que elas possam ser detectadas pela memória imunológica da mãe.

Formação de memória imunológica (aloimunização) materna

Uma vez identificados pelos sistemas de defesa da mãe, os antígenos são fagocitados pelos macrófagos e inicia-se a produção de anticorpos do grupo IgM (resposta imunológica primária). Os anticorpos IgM são moléculas grandes que não atravessam a barreira placentária. A seguir ocorre a formação de memória imunológica definitiva (aloimunização) contra o antígeno, com síntese de IgG. A IgG é uma molécula menor e passa a barreira

placentária, podendo atingir o feto. A IgG pode ser detectada, na mãe, pelo **Teste de Coombs Indireto**.

Passagem dos anticorpos maternos para a circulação fetal

A incompatibilidade sangüínea materno-fetal raramente atinge fetos de mães que iniciaram a gravidez não aloimunizadas: é pouco comum a passagem do sangue do feto para a circulação materna durante a gravidez (acontecimento mais freqüente no parto) e a resposta imunológica primária que ocorre quando há transfusão é a produção de IgM, imunoglobulina que não atravessa a placenta.

Quando ocorre um segundo contato, os anticorpos IgG já presentes cruzam a placenta e provocam hemólise. Além disso, se houver contato com sangue incompatível, por menor que seja a transfusão, a resposta imunológica materna secundária (anamnésica) leva os seus linfócitos B a aumentar a produção de IgG em resposta ao antígeno identificado.

Ação dos anticorpos maternos sobre as hemácias fetais

Ocorre formação de complexo antígeno-anticorpo na parede das hemácias dos fetos Rh positivos quando há anticorpos anti-Rh em sua circulação (Figura 2). As hemácias serão, então, destruídas pelo baço. Isto provoca anemia fetal em graus variados, presença de eritroblastos na circulação periférica (Figura 3) e focos extramedulares de hematopoiese. A intensidade da anemia será em função da quantidade de anticorpos e da hemólise por eles provocada. A doença pode se manifestar de forma **leve, moderada e grave**.

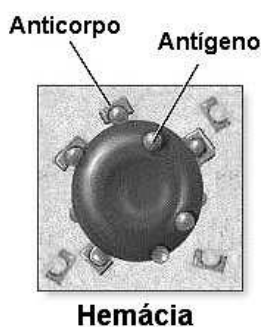


Figura 2 – Anticorpos aderindo aos antígenos de superfície da hemácia.

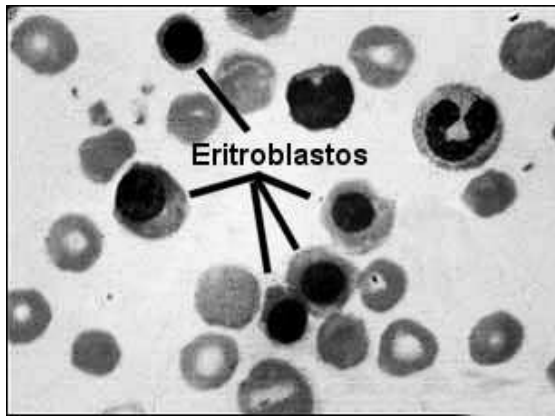


Figura 3 – Eritroblastos no sangue periférico do recém-nascido. Os eritroblastos são hemácias jovens e ainda nucleadas.

Forma leve

- Cerca de 50% dos casos.
- Anemia fetal discreta e icterícia neonatal de fácil resolução.
- Não necessita de tratamento intra-uterino.

Forma moderada

- 25 a 30% dos casos.
- Anemia fetal que, na maioria das vezes, exige tratamento intra-uterino.
- Polidramnia e edema placentário (placentomegalia) podem estar presentes.
- Icterícia neonatal acentuada, em especial à custa de bilirrubina indireta, já que o fígado fetal é incapaz de conjugá-la por deficiência de glucoroniltransferase.
- Necessidade de exangüinotransfusão freqüente.
- Pode haver surgimento de *kernicterus*, complicação grave do recém-nascido (impregnação dos núcleos da base pela bilirrubina livre, causando seqüelas neurológicas importantes).

Forma grave

- Conseqüência de anemia fetal grave (hemoglobina <9g/dL) ocorrendo em 20 a 25% dos casos.
- O acometimento fetal pode ser precoce, a partir de 18 semanas de gravidez.

- Estão presentes icterícia, polidramnia, placentomegalia e anasarca do concepto (**hidropsia fetal imune**, Figura 4), causadas pela própria anemia, pela hipoproteinemia e por dano celular hepático.
- O fígado do feto se mobiliza para a produção de hemácias, dando origem a “ilhas” de eritropoiese, ocorrendo insuficiência de suas funções normais (insuficiência hepática), culminando na hipoproteinemia e na hipertensão porta.
- A placenta aumenta de tamanho por proliferação dos vilos secundária à hipoxia.
- Há esplenomegalia já que o baço está ocupado em destruir as hemácias (hemólise) e também em produzir novas hemácias.
- A instabilidade hemodinâmica (insuficiência cardíaca secundária à anemia intensa) pode levar ao óbito do feto, mais freqüente que o do recém-nascido.

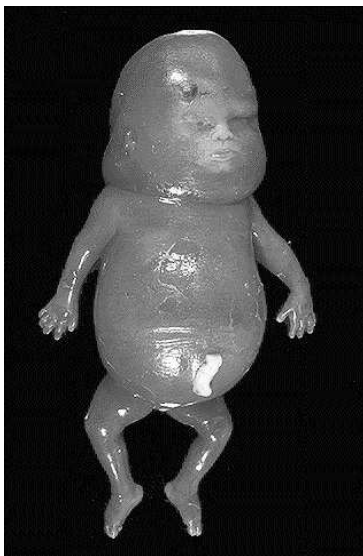


Figura 4 – Hidropsia em feto morto no segundo trimestre de gestação.

DIAGNÓSTICO

Inicia-se pela identificação das gestantes de risco: aloimunizadas (com Teste de Coombs Indireto positivo) ou que possuam tipo sanguíneo passível de sensibilização (grupo 0 no sistema AB0 ou Rh – grupo D – negativo). A história de acometimento de fetos em gestações anteriores alerta para a possibilidade de aloimunização (icterícia neonatal grave, anemia, exangüinotransfusão, hidropsia com morte intra-útero ou neonatal precoce etc.).

Títulos altos (>1:8, o que é o mesmo que $\geq 1:16$) ou crescentes do teste de Coombs indireto, ou aparecimento de sinais ultra-sonográficos suspeitos (polidramnia, placentomegalia etc.) reforçam a suspeita da doença e indicam propedêutica especial para o diagnóstico do acometimento fetal.

Ao contrário da sensibilização Rh, a incompatibilidade ABO acomete 40 a 50% dos conceptos na primeira gestação e se manifesta com sintomas brandos e prognóstico favorável (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre a incompatibilidade Rh e a ABO			
Parâmetros		Rh	ABO
Grupo Sangüíneo	Mãe Concepto	Negativo Positivo	0 A ou B
Aspectos clínicos	Ocorrência no primeiro filho Gravidade progressiva em gestações subseqüentes Natimorto/hidrópico Anemia grave Anemia tardia Grau de icterícia Hepatoesplenomegalia	5% Usualmente Freqüente Freqüente Freqüente +++ +++	40 a 50% Não Rara Rara Rara + +
Exames laboratoriais	Teste de Coombs direto no recém-nascido Anticorpos maternos Esferocitose	+ Sempre presentes Ausente	+ ou - Não detectáveis Presente
Tratamento antenatal		Sim	Não
Tratamento pós-natal (exangüinotransfusão)	Freqüência Tipo de sangue	70% Rh negativo	10% Rh igual ao RN Somente Grupo 0
Profilaxia		Sim	Não

CONDUTA

Acompanhamento

A rotina de investigação da gravidez com risco para a DHPN está resumida na Figura

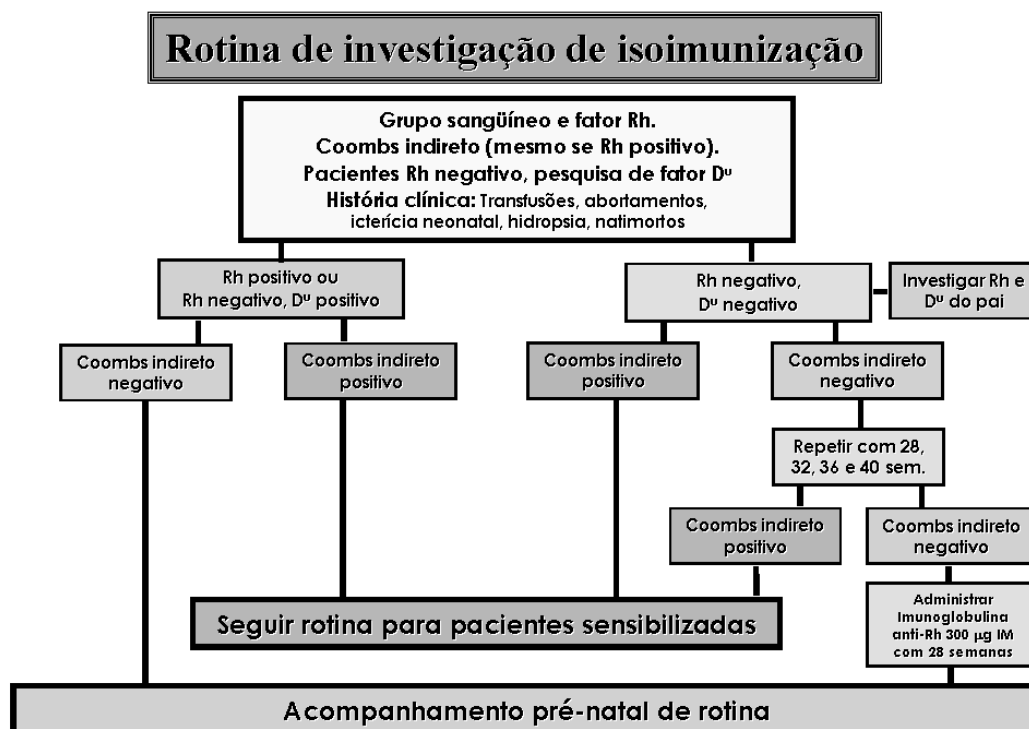


Figura 5 – Rotina de investigação da doença hemolítica perinatal.

Todas as pacientes com fator Rh negativo deverão ter história médica detalhada colhida e, especialmente, a história obstétrica. A investigação inclui relatos de transfusão, uso de drogas ilícitas injetáveis, interrupções de gestações (abortamento provocado ou espontâneo), partos operatórios, recém-nascidos anteriores acometidos por enfermidades, características de Rh da prole, uso de imunoglobulina anti-Rh em gestações anteriores depois do parto, abortamento ou propedêutica invasiva.

Deve-se verificar o tipo sanguíneo (ABO e Rh) e teste de Coombs indireto da gestante. Investiga-se também o grupo sanguíneo e fator Rh do pai da criança que está sendo gerada (embora seus resultados só sejam realmente relevantes se tivermos certeza da paternidade, o que não se pode garantir na maior parte dos casos). Pai Rh negativo afasta a possibilidade da doença fetal e dispensa cuidados adicionais já que o conceito será, necessariamente, Rh negativo. A tipagem ABO é informação complementar, já que a incompatibilidade materno-fetal nesse sistema atua como fator atenuante da aloimunização pelo fator Rh.

Sendo a mãe Rh negativo e o pai Rh positivo, o protocolo de acompanhamento será diferente se a mãe for isoimunizada. A isoimunização (ou aloimunização) materna é identificada pelo teste de Coombs indireto.

Gestante não aloimmunizada

São aquelas com teste de Coombs indireto negativo. Deve-se:

- Repetir o teste de Coombs indireto com 28, 32, 36 e 40 semanas para o diagnóstico de possível sensibilização durante a gestação.
- No pós-parto imediato solicitar **teste de Coombs direto** e **fator Rh** do **recém-nascido** e teste de Coombs indireto da mãe, para orientar a profilaxia.

Gestante aloimmunizada

As gestantes com teste de Coombs indireto positivo deverão seguir rotina especial para avaliação do acometimento fetal (Figura 6). Nestes casos observa-se a titulação do teste de Coombs.

- Teste de Coombs indireto com título *inferior* a 1:16 (o que significa exatamente o mesmo que título *menor ou igual* a 1:8): repetição mensal até o parto. Se a titulação permanecer estável, é provável que o feto seja Rh negativo.
- Teste de Coombs indireto *igual ou superior* a 1:16 (o que significa exatamente o mesmo que título *superior* a 1:8): é necessária propedêutica adicional para investigação do conceito. Podem ser utilizados procedimentos invasivos (amniocentese ou cordocentese) e métodos biofísicos (Dopplerfluxometria, ultra-sonografia e perfil biofísico fetal).

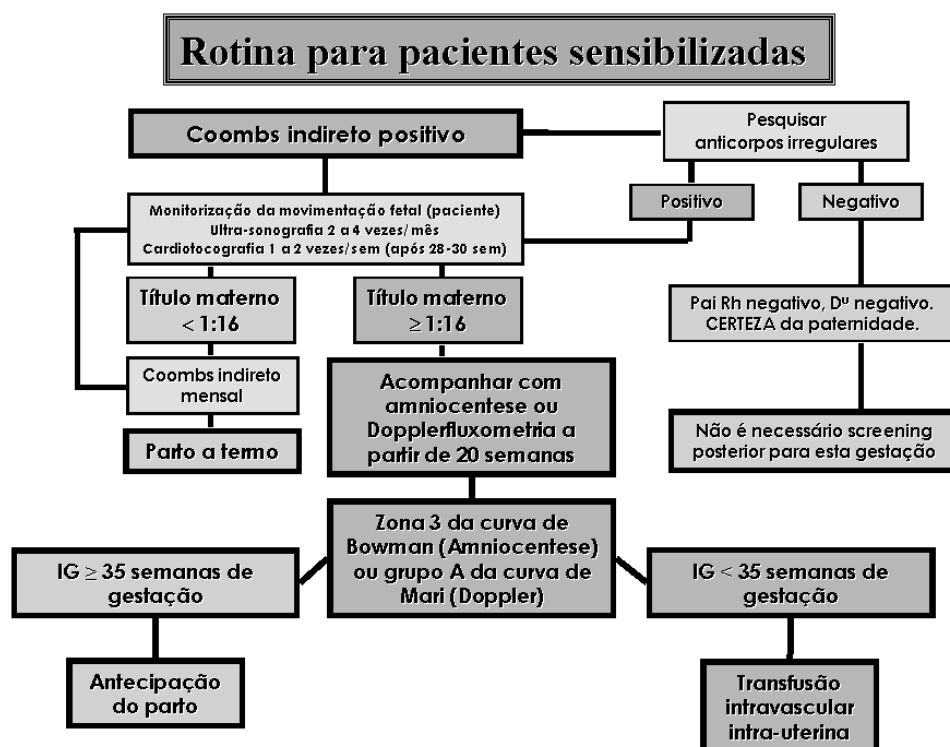


Figura 6 – Investigação do acometimento fetal e conduta em gestantes Rh negativo sensibilizadas.

Amniocentese

A análise do líquido amniótico colhido por amniocentese permite avaliar o comprometimento do feto pela investigação da quantidade de bilirrubina presente no líquido amniótico. Estima-se esta concentração ao se verificar, pela espectrofotometria, a **diferença de densidade óptica** (ΔDO) do líquido no comprimento de onda de 450 nm (Figura 7). Utiliza-se então a **curva de Bowman**⁴ (Figura 8) para, através da ΔDO observada, alocar o conceito em uma de suas três zonas com condutas e prognóstico distintos:

- *Zona 1* - doença leve ou feto Rh negativo. Acompanhamento mensal.
- *Zona 2* - doença moderada. Acompanhamento quinzenal.
- *Zona 3* - doença grave. Feto com hidropsia ou a caminho dela, com indicação de tratamento imediato.

⁴ A curva utilizada classicamente para avaliação do acometimento do conceito na DHPN através da espectrofotometria do líquido amniótico era a de Liley & Freda. A curva de Bowman é superior à original de Liley por estender sua estimativa até 15 semanas de gestação.

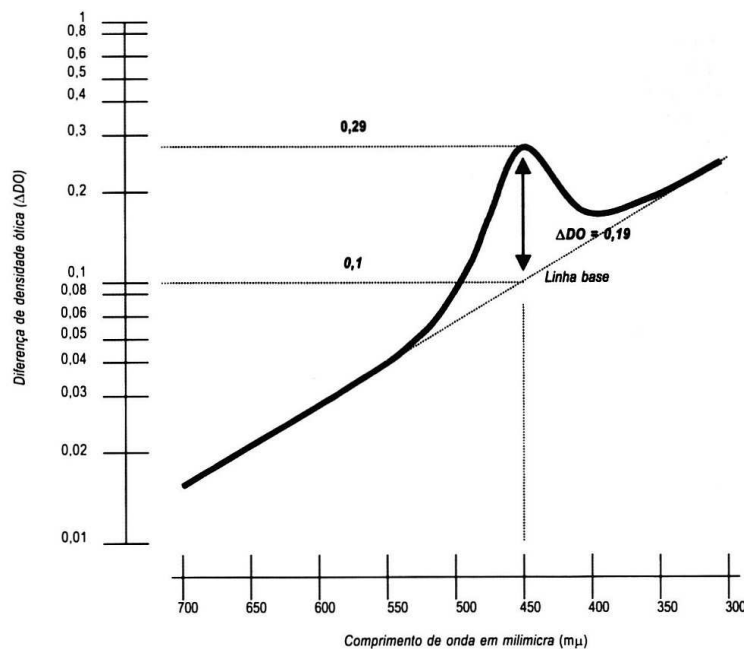


Figura 7 – A forma de se medir a diferença de densidade óptica a 450 nm para avaliação da quantidade de bilirrubina fetal no líquido amniótico (ΔDO 450nm).

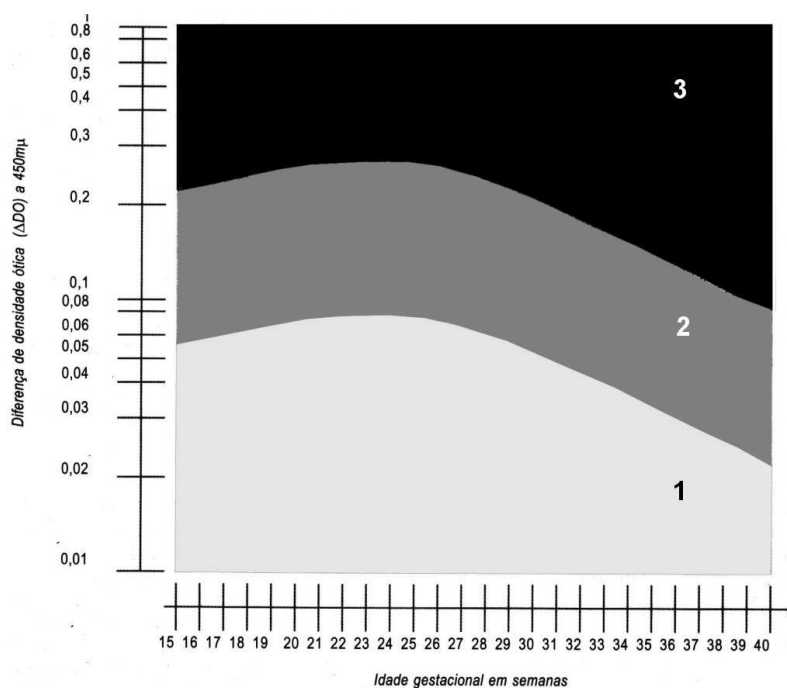


Figura 8 – Curva de Bowman modificada. A conduta em conceitos acometidos pela DHPN depende da ΔDO a 450 nm. Zona 1 – acompanhamento mensal. Zona 2 – Acompanhamento quinzenal. Zona 3 – Tratamento imediato (parto se IG \geq 35 semanas ou transfusão intra-uterina, se IG < 35 semanas).

O estudo do líquido amniótico permite também determinar o tipo sangüíneo do concepto pela técnica do PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Se optar-se pela amniocentese no acompanhamento da DHPN, a seguinte rotina é seguida:

- Primeira gestação após a aloimunização materna: amniocentese entre 30 e 32 semanas.
- Recém-nascido anterior atingido pela doença: amniocentese com 28 semanas.
- Recém-nascido anterior natimorto ou hidrópico: amniocentese entre 20 e 24 semanas.

Cordocentese

A cordocentese no acompanhamento rotineiro de gestantes aloimunizadas é criticada por possibilitar aumento da aloimunização, já que facilita a transfusão feto-materna. Ela se presta ao diagnóstico do grupo sangüíneo, do grau de anemia e dos níveis de bilirrubina fetais. A cordocentese atualmente só é indicada quando houver necessidade de **transfusão sangüínea intravascular** (TIV).

Propedêutica biofísica

A **ultra-sonografia** (USG) seriada permite avaliar **sinais de alarme** do acometimento fetal, tais como (Figuras 9 a 12):

- Espessamento e perda da estrutura da placenta, sugerindo edema.
- Sinal do duplo contorno da bexiga fetal, indicando ascite inicial.
- Aumento da circunferência abdominal compatível com hepatoesplenomegalia.
- Derrame pericárdico e pleural.
- Polidramnia.

Associada à cardiotocografia (CTG) e ao perfil biofísico fetal (PBF) a USG permite classificar a doença do feto de acordo com as anormalidades observadas (Tabela 2).

<p>Tabela 2 – Classificação do acometimento fetal na DHPN de acordo com a propedêutica biofísica</p>

Classe	Ultra-sonografia			Perfil biofísico fetal <4 Cardiotocografia anormal
	Placentomegalia e/ou polidramnia	Ascite	Derrame pleural e/ou pericárdico. Anasarca	
1 - Anemia	-	-	-	-
2 - Hidropsia leve	+	+	-	-
3 - Hidropsia grave	+	+	+	-
4 - Terminal	+	+	+	+



Figura 9 – Exame ultra-sonográfico de feto hidrópico em corte transversal do abdome. Observa-se volumosa ascite.



Figura 10 – USG mostrando edema do couro cabeludo, em corte longitudinal.



Figura 11 – USG mostrando edema do couro cabeludo, em corte transversal.



Figura 12 – USG em corte transversal, onde se observa volumoso derrame pleural (área escura em volta do coração).

A **Dopplerfluxometria** vem sendo utilizada atualmente na condução da DHPN, tendo a grande vantagem de avaliar o grau de acometimento fetal sem a utilização de métodos invasivos. Analisa-se o *pico da velocidade do fluxo sanguíneo na **artéria cerebral média***, variável que parece guardar boa relação com o grau de anemia fetal (hematócrito). Para classificar os conceitos em quatro grupos com prognósticos e condutas diferentes, utiliza-se a curva de Mari *et al.* (Figura 13):

- *Grupo A* – tratamento fetal imediato.
- *Grupo B* – repetição do exame entre 5 e 7 dias.
- *Grupo C* – repetição do exame entre 7 e 10 dias.
- *Grupo D* – repetição do exame entre 2 e 3 semanas.

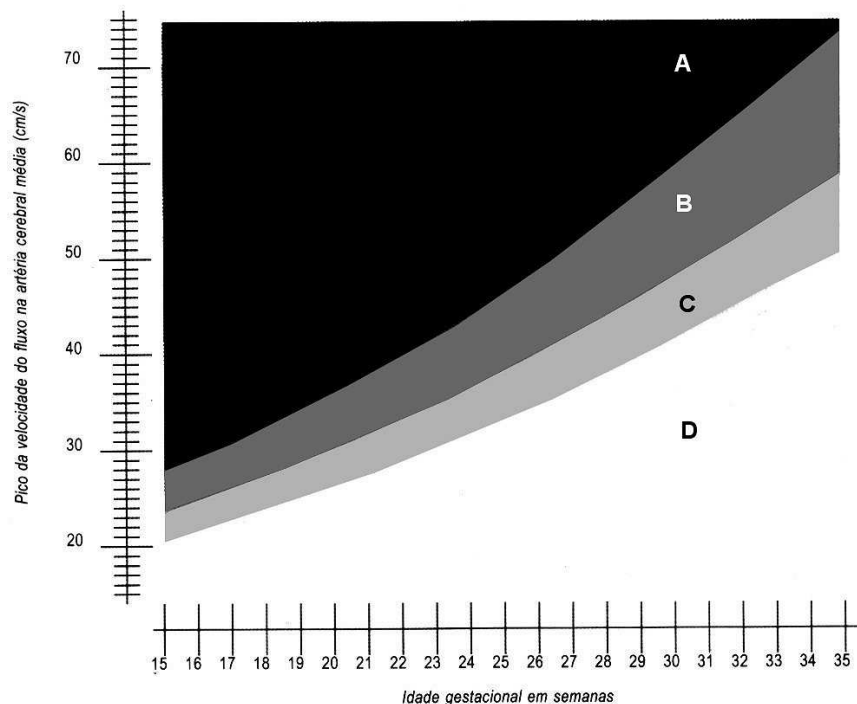


Figura 13 – Curva de Mari *et al.*, modificada. A conduta em fetos acometidos pela DHPN depende da análise da velocidade do fluxo sanguíneo da artéria cerebral média avaliada pela Dopplerfluxometria. Grupo A – Tratamento imediato (parto se IG \geq 35 semanas ou transfusão intra-uterina, se IG < 35 semanas). Grupo B – Repetição entre 5 e 7 dias. Grupo C – repetição entre 7 e 10 dias. Grupo D – repetição entre 2 e 3 semanas.

Tratamento

A interrupção da gestação é o melhor tratamento para a DHPN. Separando-se o feto do ambiente hostil, elimina-se a passagem do anticorpo anti-Rh. No entanto, os fetos muito prematuros apresentam elevado risco neonatal decorrente da prematuridade e, nos casos de idade gestacional inferior a 34 semanas, deve-se avaliar a necessidade de instituição de terapia intra-uterina. A transfusão sanguínea intravascular (TIV) intra-uterina é o tratamento de escolha, quando se punciona a veia umbilical do concepto através de acompanhamento com USG em tempo real⁵. Deve-se utilizar a TIV quando:

- Espectrofotometria do líquido amniótico se situar na zona 3 ou região alta da zona 2 da curva de Bowman, ou

⁵ Atualmente está em desuso a transfusão sanguínea fetal intraperitoneal. Reserva-se a atitudes heróicas em casos de gravidade extrema em que, pela pequena idade gestacional, está contra-indicada a cordocentese.

- Dopplerfluxometria avaliando o pico da velocidade de fluxo da artéria cerebral média se situar no grupo A da curva de Mari, ou
- Ultra-sonografia mostrar hidropsia fetal, ou
- Hematócrito abaixo de 30% e hemoglobina abaixo de 10 g/dL em amostra obtida por cordocentese.

Na TIV utiliza-se concentrado de hemácias do grupo 0 com Rh negativo, com 80% de hematócrito, na tentativa de elevar o hematócrito fetal para valores próximos de 45%. Quanto mais precoce a transfusão, melhores os resultados perinatais. Em casos de hidropsia fetal, é prudente transfundir-se quantidades menores de sangue em punções múltiplas para que o risco de falência cardíaca seja reduzido.

Profilaxia

Todas as gestantes Rh negativo não sensibilizadas (com teste de Coombs indireto negativo) que deram à luz feto com Rh positivo (variante D positiva ou fator D^u positivo) devem receber profilaxia da DHPN (Figura 14). Para tal, administra-se 300 mcg de **imunoglobulina anti-Rh** (imunoglobulina anti-D) pela via intramuscular. Esta dose é suficiente para neutralizar cerca de 30 mL de sangue fetal transfundido para a circulação materna no momento do parto.

A imunoglobulina anti-Rh é a mesma imunoglobulina naturalmente produzida quando a mulher se sensibiliza. É obtida de voluntários Rh negativo do sexo masculino, que são submetidos a transfusão de sangue Rh positivo. Quando utilizada na mulher antes que seu organismo adquira memória imunológica, impede a formação desta memória.

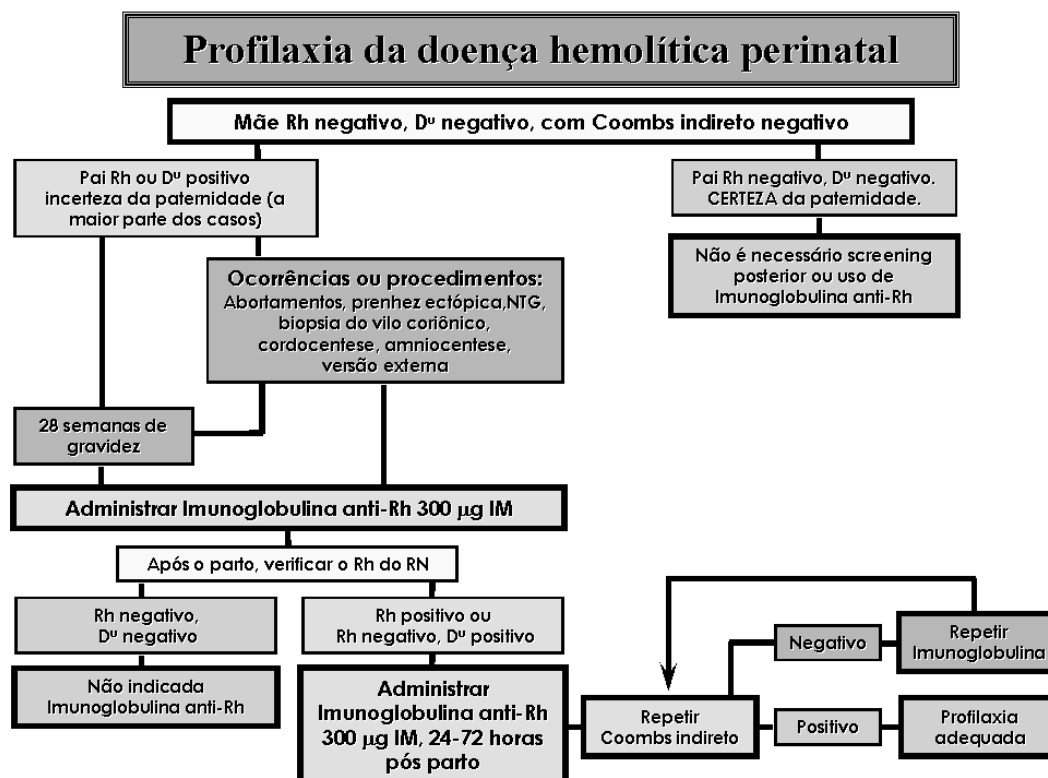


Figura 14 – A profilaxia da doença hemolítica perinatal.

Quanto mais precoce for a administração, melhores os resultados. Embora o prazo para a profilaxia se esgote com 28 dias de pós-parto, os melhores resultados são conseguidos com a administração até 72 horas depois do nascimento.

Além do parto, deve-se efetuar a profilaxia em mulheres Rh negativo nas situações abaixo, mesmo quando for impossível saber o Rh do conceito:

- Sangramento importante durante a gravidez (ameaça de abortamento, placenta prévia, sangramento do seio marginal etc.).
- Interrupção precoce da gestação (abortamento, gravidez ectópica, parto prematuro, gestação molar).
- Procedimentos obstétricos (amniocentese, cordocentese, biópsia do vilo corial, versão externa etc.).

As gestantes Rh negativo não sensibilizadas, ao completarem 28 semanas de gravidez, podem receber imunoglobulina anti-Rh como profilaxia adicional, já que uma pequena proporção de mulheres se sensibilizam no 3º trimestre da gravidez. O custo desta dose não é coberta pelo SUS.

O teste de Coombs indireto tende a se positivar após a aplicação da imunoglobulina, já que este teste visa exatamente investigar a presença desta imunoglobulina na circulação materna. No entanto, sua rápida negatificação pode denunciar hemácias fetais ainda presentes na circulação materna, já que toda a imunoglobulina pode ter sido consumida na destruição das hemácias circulantes. Este fato pode ser confirmado pelo teste de Kleihauer & Betke, que identifica a hemoglobina fetal e exige a administração suplementar de imunoglobulina.

Pode-se avaliar a eficácia da profilaxia quando uma puérpera tem seu teste de Coombs indireto positivado depois da administração da imunoglobulina anti-Rh e negatificado este teste depois de 6 meses do parto.