

ERYTHROBLASTOSIS FOETALIS. ADVANCES IN
MANAGEMENT AND PREVENTION

JOHN C. WOODROW

Rh haemolytic disease can be considered as a limited form of immunological rejection of the foetus by the mother. The consideration of pregnancy as a form of homograft has been reviewed by BILLINGHAM¹⁶ and KIRBY⁹². The evidence suggests that, once implantation has successfully occurred, a 'placental barrier' must play an important role in preventing rejection of the foetus. Because of this barrier foetal antigenic material is largely prevented from entering the maternal circulation. Moreover, experimental work suggests that even where the mother is immunised to transplantation antigens of the foetus, immunological damage to the foetus does not occur. This must be because the placental barrier prevents the passage of sensitised lymphocytes into the foetal circulation and to a failure of any cytotoxic antibodies that cross the placenta to damage the foetal tissues.

Viewed against this background, Rh haemolytic disease can be seen to be the

PROGRESSI NELLA TERAPIA E NELLA PROFILASSI DELL'ERITROBLASTOSI FETALE. La malattia emolitica da fattore Rh può essere considerata come una forma limitata di rigetto immunologico del feto da parte della madre. Il considerare la gravidanza come una forma di omotraspianto è stato ripreso da BILLINGHAM¹⁶ e KIRBY⁹². L'evidenza suggerisce che, una volta che l'uovo vi sia anidato con esito favorevole, la «barriera placentare» deve avere un ruolo molto importante nell'ostacolare il rigetto del feto. A causa della barriera, gli antigeni di origine fetale sono in gran parte ostacolati nell'entrare nel circolo materno. Per di più, dati sperimentali dimostrano che perfino quando la madre è immunizzata contro gli antigeni dell'istocompatibilità del feto, praticamente non si verificano danni immunologici al feto. Ciò è dovuto al fatto che la barriera placentare ostacola il passaggio di linfociti sensibilizzati nel circolo fetale ed inoltre al fatto che gli anticorpi citotossici che attraversano la placenta non sono in grado di danneggiare i tessuti fetali.

Vista in questa prospettiva, la malattia emolitica da fattore Rh può essere

Key-words: ABO-incompatibility; Amniocentesis; Anti-D gammaglobulin; Erythroblastosis foetalis, management; Immunosuppression, mechanism of; Rh immunisation, clinical trials; Rh immunisation, in mother; Rh immunisation, prevention; Transfusion, foeto-maternal; Transfusion, intra-uterine.

Data di arrivo in Redazione 15-9-1970.

La Ricerca Clin. Lab. 1, 199, 197.

result of the occurrence of four apparently unconnected events: 1) anatomical breaches in the placental barrier occur, allowing Rh-positive foetal red cells to enter the maternal circulation; 2) the Rh-negative mother is often capable of responding by the production of potent antibodies; 3) IgG antibodies cross the placental barrier and enter the foetal circulation; 4) because the Rh antigens are virtually confined to the foetal red cells, the full brunt of the immunological attack by these antibodies is borne by the circulating red cells. This latter phenomenon is probably crucial and it is of value to examine two other situations in which isoimmunisation occurs. Isoimmune neutropenia of the newborn is rare although maternal cytotoxic leucocyte antibodies are fairly common. LALEZARI and BERNARD¹⁰⁰ have shown that neutropenia only occurs when the antibodies are directed at antigens specific for neutrophils. In most instances the cytotoxic antibodies are directed at antigenic specificities common to neutrophils, lymphocytes and tissue cells. The second situation is ABO haemolytic disease. VOAK¹⁶⁷ has suggested that free blood group A or B substance in the foetal circulation competes for immune anti-A or -B entering the circulation from the mother, with the A or B antigenic determinants on the foetal red cells. Thus ABO haemolytic disease only occurs when the maternal IgG anti-A or -B is high, the strength of the A or B antigen on the foetal red cells is high and the level of group A or B substance in the foetal plasma is low. The result is that ABO haemolytic disease only rarely reaches the degree of severity commonly seen in Rh haemolytic disease.

In recent years detailed studies of the natural history of Rh immunisation have been carried out, and these will now be considered.

considerata come il risultato di quattro eventi in apparenza indipendenti: 1) soluzioni di continuo nella barriera placentare che permettano il passaggio di globuli rossi fetali Rh positivi nel circolo materno; 2) la madre Rh negativa è spesso in grado di rispondere producendo anticorpi ad alto titolo; 3) gli anticorpi della classe IgG attraversano la barriera placentare ed entrano nel circolo fetale; 4) poiché gli antigeni Rh sono virtualmente presenti solo sui globuli rossi del feto, la reazione immunologica da parte degli anticorpi anti Rh ha luogo sui globuli rossi circolanti. Quest'ultimo fenomeno è probabilmente cruciale ed è di notevole importanza per studiare due altre situazioni in cui ha luogo la isoimmunizzazione. La neutropenia isoimmune del neonato è rara, sebbene nel siero materno siano relativamente comuni anticorpi ad attività citotossica sui linfociti. LALEZARI e BERNARD¹⁰⁰ hanno dimostrato che la neutropenia ha luogo solamente quando gli anticorpi sono diretti verso antigeni specifici dei neutrofilii. In molti casi gli anticorpi citotossici sono diretti verso specificità antigeniche comuni ai neutrofilii, leucociti e cellule tissutali. La seconda situazione è la malattia emolitica ABO. VOAK¹⁶⁷ ha suggerito che le sostanze dei gruppi sanguinei A o B presenti allo stato libero nel circolo fetale reagiscono con gli anticorpi anti A e anti B di origine materna, impedendo a questi ultimi di reagire con i determinanti antigenici A o B presenti sugli eritrociti fetali. Così la malattia emolitica ABO ha luogo solo quando il titolo degli anticorpi materni IgG A o B è elevato, oppure quando l'espressione dell'antigene A o B sulle emazie è alta, mentre il livello della sostanza di gruppo A o B nel plasma fetale è basso. Il risultato è che la malattia emolitica ABO solo raramente raggiunge il grado di gravità che comunemente si osserva nella malattia emolitica Rh.

Negli ultimi anni sono stati condotti studi dettagliati sulla naturale evoluzione dell'immunizzazione Rh, studi che formeranno l'oggetto della nostra presentazione.

The first direct demonstration of the passage of foetal erythrocytes into the maternal circulation was by CHOWN³⁹ who was able to produce the differential agglutination of D-positive foetal erythrocytes in the blood of a D-negative mother following the birth of a very anaemic child.

A very sensitive serological technique for detecting a minor population of foetal cells was described by JONES and SILVER⁸⁶ depending on the availability of an incomplete antibody to these cells, and by this method concentrations of foetal cells as low as 1 in 100,000 can be detected. The method is, however, too elaborate for any large scale study of foeto-maternal transfusion. Similarly, the method described by COHEN et al.⁴⁷ which is essentially an indirect Coombs method in which the anti-globulin is labelled with fluorescein and the blood films read with a fluorescent microscope has not been widely applied even in research studies.

Another method of demonstrating massive transplacental haemorrhage was the detection of increased quantities of HbF in maternal blood, e.g. COLEBATCH et al.⁴⁹. A very sensitive immunological method for estimating percentage HbF was used by RUCKNAGEL and CHERNOFF¹⁵⁰ who found increased levels in some mothers during pregnancy but attributed this to an increase in maternal HbF rather than to foeto-maternal transfusion. The sensitivity of the alkali-denaturation method of estimating HbF is such that it would take a foeto-maternal transfusion of about 25 ml to produce a significant rise in HbF.

Most of the knowledge we have about the natural history of foeto-maternal transfusion has been obtained by the

La prima dimostrazione del passaggio di eritrociti fetali nel circolo materno ci è stata data da CHOWN³⁹ il quale, mediante agglutinazione differenziale, dimostrò la presenza di eritrociti fetali Rh D-positivi nel sangue di una madre Rh D-negativa, dopo la nascita di un bambino molto anemico.

Una tecnica sierologica molto sensibile per mettere in evidenza piccole quantità di eritrociti fetali fu descritta da JONES e SILVER⁸⁶; questa tecnica, che si serve di anticorpi incompleti anti D, permette di svelare la presenza di cellule fetali anche se presenti alla concentrazione di 1 su 100.000. Questa tecnica è tuttavia troppo elaborata per poter essere usata come metodo di routine in tutti i casi di trasfusione foeto-materna. Anche lo stesso metodo descritto da COHEN e Coll.⁴⁷, che è essenzialmente un test di Coombs indiretto nel quale l'antiglobulina è marcata con fluoresceina e gli strisci di sangue osservati con microscopio a fluorescenza, non è stato applicato su larga scala nemmeno nei laboratori specializzati di ricerca.

Un altro sistema per dimostrare una forte emorragia transplacentare consiste nel dimostrare quantità abnormi di HbF nel sangue materno, vedi ad esempio COLEBATCH e Coll.⁴⁹. Un metodo immunologico molto sensibile per valutare la percentuale di HbF è stato usato da RUCKNAGEL e CHERNOFF¹⁵⁰; questi AA. hanno dimostrato in alcuni casi un aumento del livello dell'HbF durante la gravidanza, che dagli AA. stessi è stato tuttavia interpretato non come un segno del passaggio di sangue fetale nel circolo materno, ma come un aumento fisiologico del livello di HbF nelle madri. La sensibilità del metodo di denaturazione alcalina nella valutazione dell'HbF è tale che ci vorrebbe una trasfusione foeto-materna di circa 25 ml per poter produrre un aumento significativo dell'HbF.

La maggior parte delle conoscenze che abbiamo sull'entità della trasfusione foeto-materna sono state ottenute

use of the acid-elution technique described by KLEIHAUER et al.⁹³. Using a citric-phosphate buffer at a pH of 3.2-3.3, HbA is removed from fixed films of blood whilst any HbF present remains. The sensitivity of the method is unlimited and depends only on the area of blood film scanned. Various methods of counting the films have been used. As a rough approximation, the percentage of erythrocytes in the film which are foetal, when multiplied by 50, gives an estimate of the volume in ml of foetal blood in the maternal circulation. A useful alternative technique of acid-elution was described by NIERHAUS and BETKE¹³⁰. An interesting technique in which fixed smears of blood are incubated in a 4-molar urea solution at pH 7.6 has been described by SZELÉNYI and HOLLÁN¹⁶¹.

When interpreting blood films prepared by these methods it must be remembered that adult erythrocytes may under both physiological and pathological conditions contain a lesser or greater amount of HbF. The small amount of HbF present in normal adult blood is distributed unevenly amongst the erythrocytes and occasional intermediately staining cells may be seen with the acid-elution technique. Moreover, approximately 1% of healthy individuals in at least some populations in Western Europe have a slight increase in HbF level, and this results in a considerable number of red cells showing the presence of HbF in varying degree, a few sometimes being indistinguishable from cells of foetal origin^{111,180}. Individuals with hereditary persistence of HbF, with thalassaemia and with various acquired haematological disorders also give blood films which are difficult or impossible to count. An important complication is the observation that, particularly towards the end of the first trimester, women may show a transient increase in HbF level during pregnancy^{13,41,99}. These observations must be taken into account when assessing the specificity of the acid-elution technique for detect-

usando la tecnica dell'eluizione acida, descritta da KLEIHAUER e Coll.⁹³. Usando un tampone fosfatocitrico di pH 3,2-3,3, l'HbA viene allontanata dai globuli rossi fissati sul vetrino, mentre non viene eluita l'HbF eventualmente presente. La sensibilità del metodo è molto elevata e dipende unicamente dall'area dello striscio di sangue esaminata. Sono stati proposti vari metodi per conteggiare gli strisci di sangue. La percentuale di eritrociti fetali riscontrati sullo striscio, moltiplicata per 50, fornisce una valutazione approssimativa dei millilitri di sangue fetale presenti nel circolo materno. Un'altra tecnica che può sostituire quella di eluizione acida è stata descritta da NIERHAUS e BETKE¹³⁰. Un'interessante tecnica in cui strisci di sangue fissati sono trattati con una soluzione di urea 4-molare a pH 7,6 è stata descritta da SZELÉNYI e HOLLÁN¹⁶¹.

Quando si esaminano gli strisci di sangue preparati con questi metodi, è necessario tenere presente che gli eritrociti adulti possono contenere una più o meno grande quantità di HbF sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche. La piccola quantità di HbF presente nel sangue di un adulto normale è distribuita irregolarmente tra gli eritrociti e con la tecnica dell'eluizione acida è facile osservare eritrociti che presentano gradi intermedi di colorazione. Per di più, circa l'1% degli individui sani, almeno in alcune popolazioni dell'Europa occidentale, hanno un leggero aumento del livello di HbF; per questa ragione un considerevole numero di globuli rossi presentano l'HbF, tanto che in alcuni casi è difficile distinguerli dai globuli rossi fetali^{111,180}. Soggetti con una persistenza ereditaria di HbF, con talassemia e con varie affezioni ematologiche acquisite presentano strisci di sangue difficili o quasi impossibili da valutare. Un'importante complicazione è rappresentata dal fatto che, particolarmente verso la fine del primo trimestre di gravidanza, le donne possono presentare un transitorio aumento del livello di HbF^{13,41,99}. Queste osservazioni devono essere tenute in considera-

ing foetal cells and, particularly where small numbers of red cells containing haemoglobin are found in blood films, there is difficulty in interpretation.

Foetal cells in the maternal circulation after delivery

Tab. 1 gives the findings of a study on primiparous mothers carried out in Liverpool. It can be seen that where the infant was ABO-compatible with the mother, 56 % of mothers showed the presence of foetal cells after delivery. In most instances the volumes of foetal blood are very small. Five ml or more of foetal blood was encountered in about 1% of cases and in approximately one in every 400 mothers a massive transplacental haemorrhage of the order of 50-100 ml or more was found. Also shown are the findings where the infant was ABO-incompatible with the mother, and it is seen that cases showing no foetal cells were much more frequent and even when foetal cells were present the counts were considerably lower than those found after ABO-compatible pregnancies.

This general picture of foeto-maternal transfusion as measured at this time is similar to that documented by other

zione quando si valuta la specificità della tecnica della eluizione acida per mettere in evidenza gli eritrociti fetali; le maggiori difficoltà di interpretazione intervengono nei casi in cui sullo striscio di sangue si riscontra un piccolo numero di eritrociti con HbF.

Cellule fetali nel circolo materno dopo il parto

La tab. 1 illustra i risultati di uno studio condotto a Liverpool su madri primipare. Si può notare che quando il bambino era compatibile per il sistema ABO, nel 56 % delle madri erano presenti in circolo, dopo il parto, eritrociti fetali. In molti casi il volume del sangue fetale era molto piccolo; in circa l'1 % dei casi la quantità di sangue fetale nel circolo materno era dell'ordine di 5 ml e solo in un caso su 400 l'emorragia transplacentare era dell'ordine di 50-100 ml. Sono anche illustrati i dati relativi ai casi in cui il neonato era ABO incompatibile: in questo caso si è osservato che erano molto più frequenti i casi in cui non vi era presenza di emazie fetali, ed anche quando queste erano presenti, i conteggi risultavano considerevolmente più bassi di quelli riscontrati nelle gravidanze ABO compatibili.

Questi dati relativi al passaggio transplacentare di sangue dal feto alla madre sono sovrapponibili a quelli ottenuti da

pregnancy		foetal cell score *							total
		0	1	2	3-4	5-10	11-39	40+	
ABO-compatible	number	880	411	187	153	150	144	75	2,000
	%	44.0	20.5	9.4	7.6	7.5	7.2	3.8	100
ABO-incompatible	number	314	65	24	6	5	3	0	417
	%	75.3	15.6	5.8	1.4	1.2	0.7	0	100

* a score of 5 suggests approximately 0.2 ml foetal blood in the maternal circulation

* un punteggio di 5 indica la presenza di circa 0,2 ml di sangue fetale nel circolo materno

Table 1 - Distribution of foetal cell scores after delivery ABO-compatible and ABO-incompatible first pregnancies.

Distribuzione dei punteggi relativi alla presenza di cellule fetali nel sangue materno dopo il parto, in caso di prime gravidanze ABO compatibili ed ABO incompatibili.

workers^{47,160}. Other studies have shown a lower incidence of foeto-maternal transfusion^{156,183}, and it may be that differences in technique account for this.

Foeto-maternal transfusion during pregnancy

Many studies have been carried out in which samples of maternal blood have been examined for foetal cells at various stages of pregnancy. The results show considerable variation and this must almost certainly be due to differing interpretations of stained cells, particularly as the numbers of such cells are usually exceedingly small. In a study in Liverpool, 581 samples of blood taken during pregnancy were examined, and the only period during which cells of undoubted foetal origin were found was during the last twelve weeks. Earlier in pregnancy, a small percentage of films did show one or more cells of possible foetal origin. Similar findings were reported by CLAYTON⁴⁴. VON HAERING⁶⁶ tested 225 women in the third trimester and in 4.4 % of these more than 0.01 % of foetal cells were found, whilst in 9.3 % occasional cells were seen. Other studies have claimed that foeto-maternal transfusion is a very common, if not universal, event during pregnancy^{13,71,108}. It would appear that the presence of a single stained red cell amongst perhaps several hundred thousand eluted cells is often included as a positive case, and in this situation the specificity of the technique is in some doubt. The results can be summarised as suggesting that foeto-maternal transfusion undoubtedly occurs during pregnancy, particularly during the third trimester, and that very small numbers of foetal cells may enter the maternal circulation earlier in pregnancy but present techniques do not allow any great

altri studiosi^{47,160}. Altri studi hanno mostrato una più bassa incidenza del passaggio di sangue dal feto alla madre^{156,183}; l'impiego di tecniche diverse può probabilmente rendere conto di questi risultati contrastanti.

Trasfusione foeto-materna durante la gravidanza

Molti studi sono stati condotti su campioni di sangue prelevati in vari periodi della gravidanza per valutare la quantità di cellule fetali nel circolo materno. I risultati sono estremamente variabili e ciò è dovuto quasi certamente alla differente valutazione degli strisci dopo eluizione, anche perché il numero delle cellule fetali è in genere molto basso. In uno studio eseguito a Liverpool, sono stati esaminati 581 campioni di sangue prelevati durante la gravidanza, e l'unico periodo durante il quale si sono trovate cellule di origine sicuramente fetale è stato durante le ultime 12 settimane. Durante i primi mesi, solo su una piccola percentuale di strisci è stato possibile mettere in evidenza una o più cellule di possibile origine fetale. Dati simili sono stati riportati da CLAYTON⁴⁴. VON HAERING⁶⁶ ha esaminato 225 donne nel terzo trimestre di gravidanza: nel 4,4 % la quantità delle cellule fetali era maggiore dello 0,01 %, nel 9,3 %, invece, le cellule fetali erano ancora più rare. Altri studi sostengono che la trasfusione foeto-materna è un evento molto più comune, se non addirittura costante^{13,71,108}. Dai dati della letteratura risulta che la presenza di un solo globulo rosso colorato nell'ambito di parecchie centinaia di migliaia di eritrociti non colorati sia stato talora considerato come un caso positivo; è evidente che in queste condizioni la specificità della tecnica è tale da mettere in dubbio questi risultati. L'insieme dei dati può essere così riassunto: durante la gravidanza ed in particolare durante il terzo trimestre avviene un passaggio di sangue dal feto alla madre; durante i primi mesi è possibile che un piccolo numero di globuli rossi fetali passi nel circolo materno, ma le tecniche a nostra disposizione non

certainty to be attached to the quantitative aspects of this phenomenon.

Foeto-maternal transfusion and abortion

The incidence of positive tests for foetal cells after spontaneous abortion has been variously given as 4.5 %, 13 % and 6 %^{87,101,112}. However, it is noticeable in these reports that in the positive cases the estimated volumes of foetal blood involved were extremely small, i.e. 0.05 ml or less. The study of MURRAY et al.¹²⁵ showed an incidence of 25.5 % of positive tests and the estimated volume of foetal blood was more than 0.1 ml. In countries where therapeutic abortion is carried out there has been much concern that foeto-maternal transfusion might be an important consequence in many cases. The general finding has been that at least 16 % of women showed foetal cells after these procedures and the estimated volume of foetal blood involved appeared to be greater than that with spontaneous abortion^{74,112,168,173}.

Obstetric factors in foeto-maternal transfusion

There is good evidence that complicated delivery may dispose to foeto-maternal transfusion^{14,176}. QUEENAN et al.¹⁴⁵ showed that approximately 20 % of the red cells in the uterus post-partum are foetal, and that when ⁵¹Cr labelled cells were injected into the uterus, these cells were detectable in the maternal circulation in a third of cases. The use of oxytocin and general anaesthesia increases the passage of blood into the maternal circulation. It was suggested that free drainage of the placenta might reduce transplacental haemorrhage and this was demonstrated to be true by TERRY¹⁶⁴.

In the antenatal period an association between foeto-maternal transfusion and

ci permettono di valutare quantitativamente l'entità di questo passaggio.

Passaggio di sangue dal feto alla madre in occasione di aborti

Dopo aborti spontanei la presenza di globuli rossi fetali nel circolo materno è stata variamente valutata intorno al 4,5 %, al 13 % e al 6 %^{87,101,112}. Tuttavia è da notare che in questi studi il volume calcolato di sangue fetale, presente nel circolo materno, è molto piccolo, circa 0,05 ml o anche meno. MURRAY e Coll.¹²⁵ hanno dimostrato che la frequenza dei casi positivi è di circa il 25,5 % e che il volume di sangue fetale è dell'ordine di oltre 0,1 ml. Nei paesi ove viene eseguito correntemente l'aborto terapeutico si è propensi a pensare che in queste condizioni il passaggio di sangue dal feto alla madre sia molto frequente. L'insieme dei dati dimostra che dopo aborti terapeutici circa il 16 % delle donne presentano eritrociti fetali in circolo e che il volume di sangue fetale calcolato è in queste condizioni più elevato che non nei casi di aborti spontanei^{74,112,168,173}.

Fattori ostetrici nel passaggio di sangue dal feto alla madre

Vi sono sufficienti dati che dimostrano come un parto complicato possa favorire il passaggio di sangue feto-madre^{14,176}. QUEENAN e Coll.¹⁴⁵ hanno dimostrato che nell'utero, a parto avvenuto, circa il 20 % dei globuli rossi sono di origine fetale; inoltre hanno dimostrato anche che quando globuli rossi marcati con ⁵¹Cr sono iniettati in utero, in circa un terzo dei casi è possibile mettere in evidenza queste cellule nella circolazione materna. L'uso di ossitocina o dell'anestesia generale determina un aumento del passaggio di sangue fetale nel circolo materno. È stato anche suggerito, e TERRY¹⁶⁴ ne ha fornito recentemente la dimostrazione sperimentale, che il distacco spontaneo della placenta può ridurre l'entità del passaggio transplacentare.

Si è visto come nel periodo prenatale l'estroversione cefalica dell'utero^{52,141},

external cephalic version^{52,141}, *amniocentesis*^{34,116,134,174,184} and *hypertension*⁸⁵ has been found. In regard to *amniocentesis* WANG et al.¹⁷⁴ found that foetal cells were present in the maternal circulation particularly when amniotic fluid was difficult to obtain or was bloodstained on withdrawal.

THE IMMUNE RESPONSE IN THE MOTHER

It is probable that a minimum of 5% of Rh-negative women in Caucasian populations have Rh antibodies. It is likely that many factors determine whether or not an Rh-negative mother will develop antibodies, apart from the zygosity of the husband. Some of these have been examined in recent years. The evidence suggests that when Rh-positive foetal cells enter the maternal circulation one of three things may happen. 1) Antibodies may become detectable during the subsequent months; 2) antibodies may be undetectable by the usual methods employed but priming may have occurred so that a further small stimulus of Rh-positive foetal cells in a subsequent pregnancy leads to the appearance of antibodies. This corresponds to the state of 'sensibilisation' described in the important observations of NEVANLINNA¹²⁷; 3) the mother may be completely unresponsive and no immune response of any kind results. The usual practice in the past has been to test mothers for antibodies only during pregnancy but a clear picture of the immunising process requires that tests between pregnancies should also be carried out. The important consequence of the second situation described above is that when a mother develops antibodies during the course of a second or later Rh-positive pregnancy, it is most likely that the primary stimulus has been received in an earlier pregnancy.

l'amniocentesi^{34,116,134,174,184} e l'ipertensione⁸⁵ possono favorire il passaggio di sangue feto-madre. Per quanto riguarda l'amniocentesi, WANG e Coll.¹⁷⁴ ritrovarono emazie fetali nel circolo materno soprattutto quando il liquido amniotico era stato prelevato con difficoltà o si era presentato di aspetto ematico al prelievo.

LA RISPOSTA IMMUNE NELLA MADRE

Con ogni probabilità, nelle popolazioni caucasiche almeno il 5% delle donne Rh negative hanno anticorpi anti Rh. Prescindendo dalla probabilità di avere un figlio Rh positivo e quindi dal corredo genico del marito, è verosimile che esistano molti fattori che possono determinare in una madre Rh negativa la formazione o meno di anticorpi anti Rh. I dati a nostra disposizione indicano che quando penetrano nel circolo materno eritrociti fetali Rh positivi si può verificare uno dei seguenti tre casi: 1) nei mesi successivi si rende evidente la presenza di anticorpi; 2) non compaiono anticorpi che possano essere messi in evidenza con i metodi comunemente applicati, ma la madre rimane sensibilizzata, per cui alla successiva gravidanza un ulteriore stimolo rappresentato dal passaggio di emazie fetali Rh positive porta alla comparsa di anticorpi; questa situazione corrisponde allo stato di «sensibilizzazione» già descritto da NEVANLINNA¹²⁷; 3) la madre non reagisce in alcun modo, non si ha cioè alcun tipo di risposta immune. La ricerca di anticorpi nella madre era un tempo limitata al periodo della gravidanza, mentre per avere un chiaro quadro dell'andamento del processo di immunizzazione è necessario proseguire la ricerca anche nell'intervallo tra una gravidanza e l'altra. Inoltre, dalla seconda delle possibili modalità di reazione sopra descritte discende che, qualora una madre formi anticorpi durante la seconda o successiva gravidanza, è probabile che essa abbia ricevuto lo stimolo sensibilizzante nel corso di una gravidanza precedente.

Antibodies in the first pregnancy

It has been the common experience that haemolytic disease rarely affects the first Rh-positive baby. In Liverpool 2,589 Rh-negative primiparae have been tested at the end of their first Rh-positive pregnancies and 20 were found to have anti-D. In each case the infant was ABO-compatible with the mother. The incidence of antibodies where the pregnancy was ABO-compatible was 0.95%. The corresponding figure given by BORST-EILERS²¹ is 0.87%. Recently, it has been claimed that by using very sensitive enzyme techniques, it is possible to detect a higher incidence of antibodies at this time, e.g. 2.5%²² and 5.6%⁶³. The reasons for the different incidences given by various authors are not entirely clear but to some degree variations in serological technique must be responsible. In the Liverpool series all the positive cases, with the exception of one who gave a history of transfusion in childhood, had shown negative tests early in this pregnancy. Most of the antibodies appeared to develop during the third trimester and in four instances were detectable by enzyme methods only. The origin of these

Formazione di anticorpi durante la prima gravidanza

È raro che la malattia emolitica colpisca il primo figlio: in uno studio condotto a Liverpool, infatti, soltanto 20 donne su 2.589 primipare Rh negative esaminate presentavano anticorpi anti-D al termine di una gravidanza di un figlio Rh positivo. In tutti i casi esaminati i figli erano compatibili con le madri per il sistema ABO. Il nostro studio dà quindi un'incidenza di anticorpi nelle madri dello 0,95 %, mentre il dato corrispondente di BORST-EILERS²¹ è dello 0,87 %. Si è recentemente affermato che è possibile mettere in evidenza in quel periodo un maggior numero di madri con anticorpi (per esempio il 2,5 %²² o il 5,6 %⁶³) utilizzando tecniche molto sensibili con impiego di enzimi: non è chiara la causa che ha determinato la diversità dei dati osservati dai vari AA., tuttavia, almeno in parte, possono esserne ritenute responsabili le varie tecniche sierologiche applicate. Nel campione studiato a Liverpool, tutte le madri presentavano tests negativi nei primi mesi di gravidanza: l'unica eccezione era rappresentata da una paziente che aveva ricevuto trasfusioni di sangue nell'infanzia; nella maggior parte dei casi gli

antibody test six months after delivery	foetal cell score after delivery							total
	0	1	2	3-4	5-10	11-39	40 +	
anti-D present	15 (4)	7 (3)	9 (2)	12 (4)	12 (2)	10 (1)	4	69 (16)
anti-D absent	442	191	88	62	47	36	14	880
total	457	198	97	74	59	46	18	949
% with antibodies	3.3	3.5	9.3	16.2	20.3	21.7	22.2	7.3

Table 2 - Relationship of foetal cell score after delivery to Rh antibody formation six months post-partum. Primiparae: all pregnancies Rh-positive and ABO-compatible: papain antibodies in brackets (included in larger number). A score of 5 implies approximately 0.2 ml foetal blood. Relazione tra il punteggio relativo alla presenza di cellule fetali nel sangue materno dopo il parto e la formazione di anticorpi Rh a distanza di 6 mesi da questo. Primipare, tutte con gravidanze Rh positive e ABO compatibili: gli anticorpi papainici sono indicati in parentesi (inclusi nel numero più grande). Un punteggio di 5 implica una quantità di sangue fetale di circa 0,2 ml.

antibodies is in some doubt. It is extremely difficult to exclude completely the possibility of a previous stimulus, e.g. by previous pregnancy or injection of Rh-positive blood, the antibodies thus representing a secondary response. It seems quite possible that some of these cases are instances of a primary antibody response during pregnancy and it is of interest to note that OVERWEG and ENGELFRIET¹³¹ demonstrated the presence of cytotoxic leucocyte antibodies in 11 out of 116 primiparae.

Anti-D in the post-delivery period

A survey in Liverpool has shown that 8.2 % of Rh-negative mothers can be expected to have anti-D six months after delivery of the first ABO-compatible Rh-positive infant. Tab. 2 shows that the risk of developing antibodies bears some relationship to the amount of foetal blood present in the maternal circulation at delivery and a similar relationship was shown by SPENSIERI et al.¹⁵⁶. In common with other workers it was noted that antibodies sometimes developed where no foetal cells had been detected. This may be due to the technical limitations of the method used for demonstrating foetal cells or to the delay in the entry of foetal cells into the maternal circulation which occurs in about 3 % of deliveries^{3, 153}. A third important reason may be that foetal cells which have entered the maternal circulation during the weeks preceding term, have disappeared with development of a primary immune state.

anticorpi si formavano infatti nel terzo trimestre di gravidanza ed in quattro casi poterono essere messi in evidenza solo mediante l'uso di enzimi. Sulla modalità di formazione di questi anticorpi rimane tuttavia qualche dubbio: è infatti molto difficile poter escludere con certezza la possibilità che siano avvenute sensibilizzazioni precedenti, sia per altre gravidanze sia per trasfusioni di sangue Rh positivo: in questi casi la formazione degli anticorpi sarebbe dovuta ad una risposta secondaria; si può tuttavia affermare con certezza che almeno alcuni dei casi esaminati erano dovuti a risposta primaria durante la gravidanza: a questo proposito può essere interessante ricordare che OVERWEG e ENGELFRIET¹³¹ dimostrarono la presenza di anticorpi citotossici diretti contro determinanti antigenici presenti sui leucociti in 11 su 116 donne primipare esaminate.

Anticorpi anti-D nel periodo post-parto

L'8,2 % delle madri Rh negative, secondo uno studio condotto a Liverpool, presentavano anticorpi anti-D sei mesi dopo il parto del primo figlio Rh positivo (compatibile con la madre per il sistema ABO). Come illustrato in tab. 2, è stata riscontrata una certa relazione fra la probabilità di formare anticorpi e la quantità di sangue fetale presente nel circolo materno al momento del parto: tale relazione è stata confermata anche da SPENSIERI e Coll.¹⁵⁶. Tuttavia, analogamente ad altri ricercatori, abbiamo talvolta osservato la formazione di anticorpi senza che al parto si fossero trovati nel circolo materno eritrociti fetali: questa discordanza può essere dovuta alle limitazioni del metodo usato per mettere in evidenza le cellule di origine fetale oppure anche ad un ritardo nel passaggio degli eritrociti nel circolo materno, come avviene in circa il 3 % dei parti^{3, 153}. Un ulteriore importante motivo può essere rappresentato dal fatto che le emazie fetali, penetrate in circolo alcune settimane prima del parto, erano scomparse con l'apparire della risposta immune primaria.

foetal cell score after first pregnancy	number tested	number without anti-D	number with anti-D	percentage with anti-D
0	203	192	11	5.4
1 - 4	150	130	20	13.3
5 +	36	33	3	9.1
totals	389	355	34	8.7

Table 3 - Development of anti-D during second Rh positive pregnancy. First pregnancies ABO-compatible. Test(s) early in second pregnancy negative. Later tests at delivery in 85% of cases, the rest at 35 weeks.

Formazione di anticorpi anti-D nel corso della seconda gravidanza Rh positiva. Prime gravidanze ABO compatibili. Test(s) negativo(i) precoce(i) nella seconda gravidanza. Tests successivi, al momento del parto nell'85% dei casi, a 35 settimane nei restanti casi.

Antibodies appearing during the second Rh-positive pregnancy

The Liverpool study has shown that 9.1% of mothers who are free of antibodies at the beginning of the second Rh-positive pregnancy develop anti-D during this pregnancy where the first is ABO-compatible. Tab. 3 shows the relationship between the development of antibodies at this time and the score of foetal cells at the end of the previous pregnancy. It can be seen that the highest incidence of antibodies was found in those mothers who showed a low count of foetal cells after the first delivery. Again, some mothers who develop antibodies had had no detectable foetal cells. SPENSIERI et al.¹⁵⁶ found that mothers who developed anti-D in the second pregnancy had usually had a low count of foetal cells after the first delivery.

COMMENT

It may be that a few of the instances of the development of anti-D during the second Rh-positive pregnancy represent primary immunisation. However, the fact that the overall incidence is very much higher than that found

Comparsa di anticorpi durante la seconda gravidanza Rh positiva

Nell'indagine condotta a Liverpool, il 9,1% delle madri che all'inizio della gravidanza non avevano ancora formato anticorpi anti-D, ne formarono nel corso della seconda gravidanza Rh positiva (quando la prima gravidanza era compatibile per il sistema ABO). Nella tab. 3 sono indicati i rapporti fra entità della risposta anticorpale in questo stadio e numero di cellule fetali presenti nel circolo materno al momento del primo parto: si può osservare come la più alta incidenza di anticorpi si ebbe in quelle madri che avevano mostrato un basso numero di cellule evidenziabili e inoltre come si ritrovarono anticorpi anche in alcune madri nel cui circolo non si era ritrovata alcuna cellula fetale. Nello stesso modo SPENSIERI e Coll.¹⁵⁶ misero in evidenza che le madri le quali al momento del primo parto avevano mostrato un basso numero di eritrociti fetali sviluppavano normalmente anticorpi anti-D nella seconda gravidanza.

COMMENTO

In alcuni dei casi esaminati, la formazione di anticorpi anti-D era probabilmente l'espressione di una risposta primaria; possiamo tuttavia ritenere vera quasi con certezza l'ipotesi che nella maggior parte dei casi si abbia una ri-

during the first pregnancy is strong evidence for the hypothesis that most cases represent a secondary response to the passage of perhaps a very small volume of Rh-positive blood across the placenta, the mother having been primed by the first pregnancy. The general pattern of the results suggests that larger amounts are more likely to result in priming without antibody formation. These findings are reminiscent of the experimental work of STERZL¹⁵⁸.

The above data imply that 16.5 % of Rh-negative mothers have anti-D by the end of the second Rh-positive pregnancy (the first being ABO-compatible), approximately half appearing during the months following the first delivery and the other half during the second pregnancy. Of those antibodies appearing after the first pregnancy almost a quarter are detectable by enzyme methods only, saline, albumin and antiglobulin tests being negative. It has been the experience in Liverpool that when these mothers have a further Rh-positive pregnancy the anti-D becomes detectable by all methods and haemolytic disease may then occur. It must be noted that a proportion of mothers developing antibodies during the second pregnancy did so only during the last few weeks of pregnancy and although the cord blood might be weakly Coombs-positive, clinical disease does not as a rule develop in these.

Incidence of antibodies in later pregnancies

Information on this is dependant on retrospective surveys^{45,129}. The two quoted studies differ in the incidences given and this may be due to different methods of selection of the populations studied. There is no doubt that some mothers may experience several Rh-positive pregnancies before antibodies appear, and this is presumably due to the chance occurrence of foeto-maternal

sposta secondaria: in seguito al passaggio transplacentare di una piccola quantità di sangue fetale si verifica formazione di anticorpi in quelle madri che già in una precedente gravidanza siano state sensibilizzate. Inoltre, secondo i risultati ottenuti, il passaggio di grandi quantità di sangue porterebbe alla sensibilizzazione della madre, ma non alla formazione di anticorpi. Tutti questi dati concordano del resto con i lavori sperimentali di STERZL¹⁵⁸.

Riassumendo i dati illustrati, si può concludere che il 16,5 % delle madri Rh negative hanno formato anticorpi anti-D al termine della seconda gravidanza Rh positiva (essendo la prima compatibile per il sistema ABO): metà di questi anticorpi apparve nei mesi immediatamente successivi al primo parto, l'altra metà durante la seconda gravidanza. Si ricordi però che almeno un quarto degli anticorpi che si formano nel periodo successivo alla prima gravidanza non è dimostrabile con le comuni tecniche in salina, in albumina o con il metodo dell'antiglobulina, ma solamente con l'uso di enzimi: tuttavia, come osservato a Liverpool, dopo un'altra gravidanza Rh positiva gli anticorpi si possono evidenziare con tutti i metodi e possono dare origine alla malattia emolitica. Si deve tuttavia osservare che in alcune madri la formazione di anticorpi avviene soltanto nelle ultime settimane che precedono il parto e quindi nel neonato non si manifesta chiaramente la malattia emolitica, sebbene il sangue del cordone ombelicale presenti un test di Coombs diretto debolmente positivo.

Incidenza di anticorpi nelle gravidanze successive

Le informazioni di cui disponiamo a tale riguardo sono ricavate dalla letteratura sull'argomento^{45,129}: i due studi degni di maggiore attendibilità differiscono tra di loro sulle incidenze riportate e questo fatto è dovuto probabilmente al diverso criterio di scelta del campione studiato. È noto infatti come alcune madri formino anticorpi anti-D solo dopo molte gravidanze, e questo

transfusion and a relatively low degree of sensitivity to the Rh antigens. Studies in general suggest that at least 50 % of all antibodies have already developed by the end of the second Rh-positive pregnancy ^{73, 98, 127}. *This must in part be due to the relatively small average family size in the populations studied.*

Effect of ABO-incompatibility

The protection against Rh immunisation resulting from ABO-incompatibility between foetus and mother, first demonstrated by LEVINE ¹⁰², has been amply confirmed. That this effect was a direct one was strongly argued by COHEN ⁴⁶. An important observation was that of NEVANLINNA and VAINIO ¹²⁸ who found that the deficiency of ABO-incompatible children born to Rh-negative mothers who developed antibodies, was only seen in relation to the child born before the one first affected by Rh haemolytic disease, i.e. the one that initiated the process of immunisation. In a study in Liverpool the incidence of anti-D six months after delivery of a first ABO-incompatible Rh-positive infant was 0.82 %, which is one tenth of that found after ABO-compatible pregnancies. Of mothers followed through a subsequent Rh-positive pregnancy 3 % developed antibodies during this second pregnancy, and in three out of the four mothers involved, the second pregnancy was ABO-compatible. The incidence of antibodies at the end of the second Rh-positive pregnancy where the first is ABO-incompatible was found to be 3.8 %, which is 23 % of the incidence for ABO-compatible first pregnancies. This is similar to the 20 % estimate of KNOX et al. ⁹⁶. As a fifth of pregnancies are ABO-incompatible this implies that of all Rh-negative mothers who have anti-D at the end of the second Rh-positive pregnancy approximately 1 in 20 has had a first ABO-incompatible first pregnancy. There was some

fatto potrebbe essere dovuto sia ad una diversa entità dell'emorragia transplacentare sia ad una deficienza nella reattività verso gli antigeni Rh. Quindi il fatto che dalle indagini sinora effettuate ^{73, 98, 127} risulti che il 50 % degli anticorpi sono presenti già alla fine della seconda gravidanza deve essere valutato tenendo conto della ridotta composizione media delle famiglie nella popolazione esaminata.

Effetto dell'incompatibilità per il sistema ABO

Se tra il feto e la madre esiste incompatibilità per il sistema ABO, si ha una protezione contro l'immunizzazione anti Rh: questo fenomeno, che LEVINE ¹⁰² descrisse per primo, è stato in seguito confermato da altri AA. COHEN ⁴⁶ sostenne che si trattava di un effetto diretto. A questo proposito NEVANLINNA e VAINIO ¹²⁸ fecero un'importante osservazione: essi studiarono le madri che avevano formato anticorpi e, tra i figli di queste, quelli nati subito prima del fratello affetto da malattia emolitica: in tale classe di figli il numero di bambini ABO incompatibili con la madre era inferiore a quanto previsto. In uno studio condotto a Liverpool, sei mesi dopo il parto del primo bambino ABO incompatibile e Rh positivo, si rilevò un'incidenza di anticorpi anti-D nelle madri pari allo 0,82 %, cioè circa un decimo dell'incidenza osservata nel caso di gravidanze ABO compatibili. Delle madri che ebbero una seconda gravidanza Rh positiva solo 4 (3 %) formarono anticorpi nel corso di questa gravidanza e in 3 di questi casi il figlio era compatibile per il sistema ABO. Alla fine della seconda gravidanza Rh positiva l'incidenza di anticorpi era del 3,8 % nel caso di prima gravidanza ABO incompatibile, mentre era del 23 % nel caso di prima gravidanza ABO compatibile. Questi dati coincidono con i dati di KNOX e Coll. ⁹⁶. Dal momento che un quinto delle gravidanze sono ABO incompatibili, fra le madri Rh negative che hanno formato anticorpi anti-D al termine della seconda gravidanza Rh po-

evidence that the ABO relationships of the second pregnancy were also of some importance in determining whether or not the mother developed antibodies.

Some other factors affecting Rh immunisation

a) *Obstetric factors. There is evidence that obstetric abnormalities and procedures may increase the liability to Rh immunisation^{95,97}. Evidence was produced that toxæmia of pregnancy, caesarean section, manual removal of the placenta, hydramnios and external version are associated with immunisation. It is likely that these factors operate by increasing the liability to foeto-maternal transfusion.*

b) *The state of pregnancy and the immune response. It has been postulated that a state of immunological inertia may be produced by pregnancy. This is largely based on experimental work involving tissue transplantation^{4,5,72,135}. There is little evidence, however, on the effect of pregnancy on the primary antibody response. MERRITT and GALTON¹¹⁵ found no evidence of a depressive effect on the primary antibody response of three different animal species to three different antigens. These studies involved, however, rather foreign antigens and a study in Liverpool, in which the Hg^A blood group system in rabbits has been used, provides no evidence of a decreased liability to produce anti-Hg^A during pregnancy.*

c) *Rh genotype of the foetus. Evidence has been put forward^{50,124} that in the families of infants with erythroblastosis there was an undue proportion of fathers with the R₂(cDE) phenotype. Recently, HOPKINS⁷³ examined 1,639 families in which the mother had anti-D and found no significant overall excess of this phenotype in the fathers.*

d) *Sex of the foetus. There is some good evidence that immunisation of the mother is more likely to occur when the Rh-positive foetus is male than when*

sitiva, una su venti deve avere avuto una prima gravidanza ABO incompatibile. Secondo alcuni dati pare che anche nella seconda gravidanza la compatibilità o meno per il sistema ABO possa influire sulla formazione di anticorpi.

Altri fattori che intervengono nell'immunizzazione anti Rb

a) *Fattori ostetrici. Anormalità o interventi ostetrici, secondo alcuni dati^{95,97}, possono facilitare l'immunizzazione anti Rh. La tossiemia gravidica, il taglio cesareo, la rimozione manuale della placenta, l'idramnios e l'estroversione si associano spesso con l'immunizzazione: tali fattori agiscono probabilmente aumentando le possibilità di emorragia transplacentare.*

b) *Gravidanza e risposta immune. Basandosi su lavori sperimentali che hanno implicato tra l'altro l'attuazione di trapianti di tessuti^{4,5,72,135}, alcuni AA. hanno pensato che la gravidanza possa determinare uno stato di inerzia immunologica. Un effetto della gravidanza sulla risposta primaria è però poco provato: infatti non dimostrarono una diminuita reattività immunitaria durante la gravidanza né gli studi di MERRITT e GALTON¹¹⁵ che, servendosi di eteroantigeni, studiarono la risposta primaria in tre differenti specie animali, né lo studio condotto a Liverpool nei conigli, servendosi di antigeni ematici del sistema Hg^A.*

c) *Genotipo Rb del feto. Secondo alcuni dati^{50,124} esiste, nelle famiglie con figli affetti da malattia emolitica, una elevata percentuale di padri con il fenotipo R₂(cDE). Tuttavia, il recente studio di HOPKINS⁷³ eseguito su 1.639 famiglie in cui la madre aveva anticorpi anti-D, non ha messo in evidenza alcun eccesso significativo di questo fenotipo.*

d) *Sesso del feto. L'immunizzazione della madre avviene con più facilità in caso di feto Rh positivo di sesso maschile che non nel feto di sesso femmini-*

it is female ^{146,147}. A study in Liverpool suggests that a male Rh-positive infant is approximately 50 % more likely to induce antibody formation than is a female infant. The reason for this difference is unknown. There does not appear to be any difference in the pattern of foeto-maternal transfusion according to the sex of the foetus.

e) The Rh group of the maternal grandmother. The marked apparent variability in the sensitivity of Rh-negative individuals to Rh-positive blood led to the interesting suggestion that, where the mother of such an individual was Rh-positive, the passage of Rh-positive maternal cells into the circulation of that individual when in utero might possibly have rendered him or her tolerant of the Rh antigens. Statistical data in favour of the hypothesis were put forward by OWEN *et al.* ¹³² but more critical studies ^{50,114} have not confirmed these findings. The possibility that an Rh-negative individual may be primed by Rh-positive maternal cells in utero has also been raised ¹⁶³, but the evidence for this occurring seems doubtful ¹⁷⁷.

Abortion and Rh immunisation

Well documented instances of the appearance of Rh antibodies following abortion have been frequently reported. There is still, however, some uncertainty as to the overall contribution which abortion, whether spontaneous or therapeutic, makes to the natural history of Rh haemolytic disease. One retrospective survey implied that 1.8 % of primiparous mothers whose first pregnancy results in the abortion of an Rh-positive foetus, will have anti-D by the end of the first full term Rh-positive pregnancy ¹⁷⁹. This is 13 % of the incidence of immunisation at the end of the second pregnancy where the first pregnancy went to term. FREDa *et al.* ⁵⁸ found that 4.3 % of mothers whose first pregnancy resulted in an abortion developed anti-D as judged by tests during the 'first half' of the next full term Rh-positive pregnancy. Presumably a further

le ^{146,147}. In uno studio condotto a Liverpool, la formazione di anticorpi nel feto di sesso maschile era una volta e mezzo più frequente che nel feto di sesso femminile: non si conosce ancora alcuna spiegazione per questo fatto dato che il sesso fetale non influisce né sulla frequenza né sull'entità dell'emorragia transplacentare.

e) *Gruppo Rh della nonna materna.* La spiccata varietà nella risposta dei soggetti Rh negativi alla trasfusione con sangue Rh positivo ha portato ad una suggestiva ipotesi: i figli di madre Rh positiva, ricevendo eritrociti materni per via transplacentare durante la gravidanza, diventerebbero tolleranti verso gli antigeni Rh. Sebbene sostenuta dai dati di OWEN e Coll. ¹³², questa ipotesi non è stata confermata da ulteriori studi più approfonditi ^{50,114}. Basandosi su dati ancora più incerti ¹⁷⁷ è stata avanzata anche l'ipotesi opposta, cioè che in quegli individui il passaggio in circolo delle emazie materne avrebbe determinato non una tolleranza ma una sensibilizzazione ¹⁶³.

Aborto e immunizzazione anti Rh

Esempi ben documentati della comparsa di anticorpi anti Rh in seguito ad aborto sono stati spesso riportati; rimangono tuttavia alcuni dubbi, soprattutto a proposito dell'incidenza dell'aborto, spontaneo o terapeutico, sullo svolgimento della malattia emolitica. Secondo un'indagine retrospettiva ¹⁷², al termine della seconda gravidanza Rh positiva le madri, in caso di prima gravidanza Rh positiva interrotta da un aborto, mostravano un'incidenza di anticorpi anti-D dell'1,8 %, cioè il 13 % dell'incidenza osservata nel caso di prima gravidanza Rh positiva condotta a termine. FREDa e Coll. ⁵⁸ trovarono che il 4,3 % delle madri la cui prima gravidanza si era conclusa con un aborto formavano anticorpi nella «prima metà» della seconda gravidanza; poiché presumibilmente altre madri formarono anticorpi nella seconda metà della gravidan-

percentage of mothers developed anti-D later in this second pregnancy. Taking into account the fact that 30 % of the abortuses would have been Rh-negative (the fathers were Rh-positive in all instances), their data would imply a surprisingly high incidence of primary immunisation as a result of Rh-positive abortions. It has to be admitted that really reliable data comparable with those now available for full term Rh-positive pregnancies have not yet been documented.

SOME ASPECTS OF ERYTHROBLASTOSIS FOETALIS

Once the mother has developed IgG Rh antibodies, each Rh-positive infant is at risk of developing haemolytic disease. The essential feature is the markedly shortened life span of the foetal red cells, which in mild cases can be compensated for by increased erythropoiesis but which, if more severe, leads to a chronic haemolytic anaemia. The pathological changes in the foetus are largely the inevitable result of this anaemia. The placenta develops characteristic changes and becomes functionally inefficient, and hypoxia with cardiac failure ensues so that generalised oedema appears. Secondary metabolic changes occur including a lowering of the pH of the blood.

A notable feature is the marked variability in the severity of involvement of the foetus. The severity of involvement must primarily be a result of the total effect that maternal antibodies have on the foetus through the course of pregnancy. In some instances antibodies appear only during the last few weeks of pregnancy so that the foetus is exposed to IgG antibody of low concentration and affinity for a short period of time before term. Under these conditions there may be no clinical disease or only very mild manifestations. At the other end of the scale, where the mother starts an Rh-positive pregnancy with a high

za, ne risulta che i dati di questi AA. implicano un'incidenza di risposta primaria sorprendentemente alta, considerando come, essendo tutti i padri Rh positivi, il 30 % degli aborti doveva essere Rh negativo. Si può quindi concludere che nel caso di gravidanze interrotte da aborto non vi sono ancora dati attendibili tali da essere confrontati con quelli che si hanno ora per le gravidanze condotte a termine.

ALCUNI ASPETTI DELL'ERITROBLASTOSI FETALE

Dopo la formazione da parte della madre di anticorpi anti-D della classe IgG ogni figlio Rh positivo corre il rischio di sviluppare la malattia emolitica. La caratteristica predominante è la diminuzione marcata della vita delle emazie fetali, che nei casi più lievi può essere compensata da un'aumentata eritropoiesi, ma che nei casi più gravi dà luogo ad un'anemia emolitica cronica. Tale anemia porta inevitabilmente ad alterazioni patologiche nel feto; nella placenta si hanno delle lesioni caratteristiche che determinano un'inabilità funzionale, mentre l'ipossia insieme al danno cardiaco determina la comparsa di edemi generalizzati. In seguito insorgono alterazioni metaboliche che portano ad un abbassamento del pH ematico.

La grande variabilità del grado di compromissione del feto è una caratteristica rilevante della malattia. In primo luogo è l'azione degli anticorpi materni sul feto durante la gravidanza a determinare la gravità del quadro patologico. In alcuni casi, in cui gli anticorpi compaiono solo nelle ultime settimane di gravidanza, il feto è soggetto solo per un breve periodo prima del parto alla azione di anticorpi IgG di bassa concentrazione ed affinità: in queste condizioni le manifestazioni cliniche sono del tutto assenti o molto attenuate. Il caso opposto si ha quando la madre inizia la gravidanza con elevate quantità

titre of high-affinity antibody, the foetal red cells are exposed to a prolonged immunological attack and severe disease is likely to result. In some pregnancies further foeto-maternal passage of red cells occurs and a stimulation of the mother's antibody response results leading to the rapid production of even higher affinity IgG antibody.

Many studies have been carried out relating the in vitro titre of anti-D to the clinical course of the pregnancy. It is not surprising that in general there is a broad correlation between this titre and the severity of disease ^{2, 83, 91, 165, 182}. Many obstetricians have found that in practice the titre is not of great value in assessing prognosis in the individual case. One point on which there does appear to be agreement is that when a particular centre carries out the antiglobulin technique in a standardised manner in one laboratory, there is a critical titre below which perinatal deaths are not observed. The actual level of this critical titre varies from laboratory to laboratory. When the titre is above the critical level the precise titre seems to offer little direct guidance as to the prognosis. The antiglobulin titre is probably of most value in the first affected pregnancy. Thus in some mothers carefully performed serial titres may be of value when the titre is low at the onset of pregnancy, in which case a marked rise indicates at least that the foetus is Rh-positive. Similarly, a change from a reaction which is only positive by an enzyme method to one positive by antiglobulin and albumin methods indicates that the foetus is Rh-positive. When the initial titres are higher, changes in titre are of very little significance clinically.

MOLLISON and HUGHES-JONES ¹²⁰ demonstrated that when relatively small volumes of Rh-positive blood were injected experimentally into Rh-negative individuals followed by anti-D, the rate of clearance depended on the num-

di anticorpi molto affini, per cui le emazie fetali sono sottoposte ad un prolungato attacco immunologico e con facilità si ha una grave malattia. In alcune gravidanze poi un'ulteriore emorragia transplacentare stimola la risposta immune della madre determinando la formazione di anticorpi IgG di ancor più elevata affinità.

Molte ricerche sono state effettuate per studiare *in vitro* il titolo anticorpale durante la gravidanza: non stupisce come in questi studi si sia riscontrata in genere una buona correlazione fra questo titolo e la gravità della malattia ^{2, 83, 91, 165, 182}. Tuttavia molti ginecologi hanno osservato che in pratica il titolo non è di grande valore per la prognosi di un caso individuale. Tutti sono tuttavia in accordo nel ritenere che, quando in un centro il metodo dell'antiglobulina è eseguito con una tecnica standardizzata ed in un solo laboratorio, è possibile stabilire un valore limite del titolo al di sotto del quale non si osserva mortalità perinatale; tuttavia tale valore varia da laboratorio a laboratorio. Quando si è al di sopra di questo valore, l'esatta determinazione del titolo sembra essere di scarso significato per la prognosi. Sembra invece utile il titolo con il metodo dell'antiglobulina nel corso della prima gravidanza e in presenza di anticorpi; così, in alcune madri con basso titolo all'inizio della gravidanza, può essere utile eseguire periodiche e accurate determinazioni del titolo, poiché in questi casi un netto aumento di quest'ultimo indica almeno che il figlio è Rh positivo. Nello stesso modo la presenza di un feto Rh positivo può essere rivelata dal passaggio da una reazione positiva solo con i metodi enzimatici ad una positiva anche con i metodi dell'antiglobulina e dell'albumina. Viceversa, quando il titolo iniziale è alto, le variazioni del titolo sono di scarso significato clinico.

MOLLISON e HUGHES-JONES ¹²⁰ iniettarono sperimentalmente in soggetti Rh negativi volumi relativamente bassi di sangue Rh positivo, seguito dall'iniezione di un siero anti-D: essi osservarono come la velocità di scomparsa delle ema-

ber of anti-D molecules attached to the cells. HUGHES-JONES *et al.*⁷⁸ found that the amount of anti-D attached to the red cells of affected Rb-positive babies varied from 0.4 to 18.0 $\mu\text{g/ml}$ of red cells. There was a broad overall correlation between the amount of bound antibody and the cord haemoglobin and bilirubin levels but the correlation was a poor one. Thus, although all infants having more than 8 $\mu\text{g/ml}$ of red cells required treatment, a cord haemoglobin of 15 g % was recorded with 17 $\mu\text{g anti-D/ml}$ red cells and haemoglobin of 6 g % was recorded with a little less than 7 $\mu\text{g anti-D/ml}$ red cells. It was pointed out that, whereas experiments in adults had shown that Rb-positive red cells sensitised in the range 1-20 $\mu\text{g anti-D/ml}$ were cleared with a half time of between 20 min and 3 hrs, the half-life of cells in haemolytic disease of the newborn is usually of the order of 2 to 3 days. There must therefore be some important extraneous factor determining the severity of the haemolytic anaemia. The situation in haemolytic disease is different in important respects from that seen under experimental conditions in which relatively small volumes of Rb-positive blood are involved. A large mass of Rb-positive red cells is present in contact with plasma to which a constant supply of anti-D can be added. As argued by MOLLISON¹¹⁹ the evidence shows that saturation of the macrophage system occurs when large volumes of incompatible red cells are present and under these conditions the rate of destruction of cells must be presumably much less sensitive to changes in the amount of bound antibody than in situations where small volumes of cells are present in the circulation. It can thus be concluded that there must be considerable variability in the capacity of the reticulo-endothelial system to sequester the coated Rb-positive red cells of the foetus. In other words, in a situation where the clearance system is working at full capacity the addition of more anti-D to the cells may have little appreciable effect on the life span of the cells.

zie dipendesse dal numero di molecole anti-D attaccate alle cellule. HUGHES-JONES e COLL⁷⁸ osservarono che la quantità di anti-D adesa alle emazie di bambini Rh positivi con malattia emolitica, variava da 0,4 a 18,0 $\mu\text{g/ml}$ di emazie. Esisteva un'indubbia correlazione fra quantità di anticorpi legati e livelli di emoglobina e bilirubina del sangue del cordone ombelicale; tuttavia questa correlazione non aveva grande valore. Così, sebbene tutti i neonati con più di 8 μg di anti-D per ml di emazie necessitassero di cure, si trovò un valore di emoglobina nel cordone di 15 g % con 17 μg di anti-D per ml di emazie e un'emoglobina di 6 g % con un po' meno di 7 $\mu\text{g/ml}$. Si osservò che mentre negli esperimenti eseguiti negli adulti le emazie sensibilizzate con una quantità di anticorpi variabile da 1 a 20 $\mu\text{g/ml}$ avessero un tempo di dimezzamento in circolo compreso fra 20 min e 3 h, nella anemia emolitica del neonato le emazie presentavano normalmente un tempo di dimezzamento dell'ordine di 2 o 3 giorni. La gravità dell'anemia emolitica può essere determinata anche da altri fattori esterni. Tuttavia, nella malattia emolitica si verifica una situazione che per molti importanti fattori è diversa da quella nelle condizioni sperimentali, in cui sono interessati solo piccoli volumi di sangue Rh positivo. In questo caso infatti si ha una grande massa di cellule Rh positive a contatto del plasma al quale giungono in continuazione anticorpi anti-D. Secondo MOLLISON¹¹⁹ quando è presente un volume molto elevato di eritrociti incompatibili si determina un blocco del sistema dei macrofagi: in queste condizioni la velocità di distruzione delle cellule non è probabilmente così sensibile alla variazione di quantità di anticorpi fissati come nei casi in cui siano presenti in circolo solo piccoli volumi di emazie incompatibili. Si può perciò concludere che la capacità del sistema reticulo-endoteliale nel distruggere le emazie fetali sensibilizzate è molto variabile. In altre parole, l'aggiunta di ulteriori anticorpi anti-D esercita effetti trascurabili sulla durata della

There may be also some important variables in the ability of the foetal erythropoietic system to respond to the anaemia.

Three other variables which seem to affect the severity of Rh haemolytic disease have been documented.

a) Rh genotype of the foetus. *There is good evidence that the foetus possessing red cells of the R₂(cDE) genotype has a significantly higher risk of still-birth as compared with those with the R₁(CDe) genotype* ^{73,124}.

b) Sex of the foetus. *It was shown by ARMITAGE and MOLLISON⁶ that the survival rate for any given cord haemoglobin level was lower for male infants than for females, especially where delivery occurred between 18 and 35 days before term. ZOUTENDYK¹⁸⁵ found that mortality from Rh haemolytic disease was higher for male than for female infants in both the European and Bantu populations of South Africa. Of 148 males treated by exchange transfusion 10.8 % died in contrast to 5.7 % for female infants.*

c) Effect of ABO-incompatibility. COHEN *et al.*⁴⁸ *have produced data showing that Rh haemolytic disease has a less severe course where the infant is ABO-incompatible with the mother. This difference could not be entirely explained by differences in maternal antibody titre. Thus in a group of immunised mothers of ABO-incompatible foetuses, where no evidence of ABO haemolytic disease was present, the distribution of anti-D titres was similar to that of an ABO-compatible group, but the pattern of disease was less severe and no case of hydrops was seen.*

Cumulatively these variables must have a considerable effect, so that the outlook for a male R₂, ABO-compatible foetus is considerably poorer than for a female, R₁, ABO-incompatible foetus.

vita delle emazie nei casi in cui il sistema di distruzione funzioni già al massimo delle sue possibilità. Inoltre il sistema eritropoietico del feto può presentare una diversa capacità di reazione allo stato anemico.

Sono state descritte tre altre variabili che sembrano influenzare la gravità della malattia emolitica da fattore Rh.

a) *Genotipo Rh del feto.* Secondo dati attendibili, la frequenza di natimortalità è più elevata tra i feti di genotipo R₂(cDE) che tra quelli di genotipo R₁(CDe) ^{73,124}.

b) *Sesso del feto.* ARMITAGE e MOLLISON⁶ hanno dimostrato che la percentuale di sopravvivenza è più bassa per i neonati maschi che per quelli di sesso femminile, soprattutto quando il parto è avvenuto da 18 a 35 giorni prima del termine. ZOUTENDYK¹⁸⁵ osservò che nelle popolazioni europee e bantù del Sud Africa la mortalità per malattia emolitica era più elevata nei maschi che nelle femmine. Di 148 maschi trattati con exsanguino trasfusione, si ebbe una mortalità del 10,8 % nei bambini, mentre nelle bambine essa fu del 5,7 %.

c) *Effetto dell'incompatibilità ABO.* COHEN e Coll.⁴⁸ pubblicarono dati dai quali risultava come la malattia emolitica fosse meno grave nel caso di neonati incompatibili con la madre per il sistema ABO. In un gruppo di madri immunizzate, con feti ABO incompatibili, senza presenza di malattia emolitica da sistema ABO e con una distribuzione di titoli anticorpali anti-D eguale a quella del gruppo ABO compatibile, la malattia si presentò in forma minore e non si verificò alcun caso di idrope. Tale diversità non ha potuto essere completamente spiegata dalle differenze nel titolo anticorpale nelle madri.

Tutte insieme queste variabili possono avere un effetto considerevole: così le prospettive per un feto maschio, R₂, ABO compatibile, sono molto meno favorevoli che per un feto di sesso femminile, R₁, ABO incompatibile.

The introduction of exchange transfusion of live-born affected infants was the logical practical consequence of the discovery of the pathogenesis of the disease and led to a considerable fall in perinatal mortality. This technique can achieve a survival rate in live-born infants of at least 95 %. Further progress resulted from a consideration of the time of intra-uterine death according to gestation. ALLEN et al.² found that of all such deaths, approximately 28 % occurred at 17-28 weeks, 28 % at 29-34 weeks and 44 % later than 34 weeks gestation. Early induction of labour at approximately 35 weeks followed by exchange transfusion gave a chance for survival to almost half of those foetuses due to die in utero. There was, however, particularly in the early days, an additional risk introduced because of the problems associated with the birth of an anaemic premature infant, so that the chance for survival was reduced and an increased liability to develop kernicterus was also present. Pregnancies most likely to benefit were those involving first-affected infants. However, with improvements in the management of prematurity and with the use of repeated exchange transfusion, it was possible to increase the salvage rate of affected infants, even with delivery as early as 32-34 weeks gestation²⁵.

One important aspect of this approach was the difficulty in selecting the pregnancies most likely to benefit from early induction, as it was unjustifiable to expose infants which could survive almost to term to the dangers of prematurity. The usual approach was to correlate the titre of maternal antibodies with the previous obstetric history and attempt to select high risk cases^{2,83}. It was often difficult to assess the likely course of a first-affected pregnancy and this was

L'esecuzione dell'exsanguino trasfusione nei bambini malati sopravvissuti al parto è stata la logica conseguenza pratica della scoperta della patogenesi di questa malattia ed ha portato ad una considerevole diminuzione della mortalità perinatale. Questa tecnica può permettere la sopravvivenza di almeno il 95 % dei neonati malati. Altri progressi nella terapia si sono avuti in quanto è ora possibile prevedere in quale periodo della gravidanza può avvenire la morte intrauterina. ALLEN e Coll.² osservarono che il 28 % delle morti intrauterine avvengono tra la 17^a e la 28^a settimana di gravidanza, il 28 % tra la 29^a e la 34^a e il 44 % oltre la 34^a settimana. Procurando il parto intorno alla 35^a settimana ed eseguendo quindi l'exsanguino trasfusione, si è permessa la sopravvivenza di quasi la metà di quei feti che prima sarebbero morti *in utero*. Nei primi giorni esisteva però ulteriore rischio connesso alla nascita di un bambino anemico prematuro, per cui le reali possibilità di sopravvivenza erano più limitate; inoltre vi era aumentata tendenza allo sviluppo di ittero. Le gravidanze che con più facilità traevano vantaggio da questo trattamento erano quelle che interessavano il primo figlio affetto. Fu comunque possibile aumentare la percentuale di sopravvivenza dei neonati migliorando il trattamento dei prematuri e con l'impiego di ripetute exsanguino trasfusioni: il parto potè così essere anticipato alla 32^a o 34^a settimana di gravidanza²⁵.

Un problema importante in questo tipo di terapia era costituito dalla difficoltà di riconoscere le gravidanze che con maggiore probabilità avrebbero tratto vantaggio da un parto indotto prematuramente, in quanto era assurdo sottoporre ai rischi di una nascita prematura bambini che avrebbero potuto sopravvivere sino al termine. Il criterio comunemente adottato era di confrontare il titolo di anticorpi nella madre con quelli dei precedenti casi e cercare quin-

particularly important because this pregnancy might be the last one with a reasonable chance of producing a surviving infant.

Amniocentesis

*It became essential to have a more direct measure of the clinical state of the foetus in utero and the answer to this problem was pioneered by BEVIS¹⁵ and applied by LILEY¹⁰⁴. It was shown that spectrophotometric analysis of amniotic fluid gave a measure of the bilirubin pigment present and this supplied an index of the severity of the haemolytic process. CHERRY *et al.*³⁸ have shown that unconjugated bilirubin in amniotic fluid is bound to albumin and that a concentration gradient in respect of bilirubin exists between foetal plasma and amniotic fluid, favouring the transfer of bilirubin across the separating membranes. It was suggested that this process is similar to the passage of unconjugated bilirubin from foetus to mother across the placental membranes¹⁵². It is assumed that the level of bilirubin in amniotic fluid a) is a measure of the severity of the haemolytic process and b) therefore can be used empirically as a guide to the clinical state of the foetus and the likely prognosis.*

Methods of assessing amniotic fluids

*The commonly used spectrophotometric method depends on the appearance of a deviation in the tracing between 350 and 550 m μ . It was shown by MANDELBAUM and ROBINSON¹¹⁰ that, in the absence of contamination by haemoglobin, methaemalbumin and meconium, this deviation is due to the presence of unconjugated bilirubin. An appreciable bilirubin peak is a normal occurrence in early pregnancy⁹. MANDELBAUM *et al.*¹⁰⁹ found that this peak gradually decreased and disappeared at 36 weeks gestation. It was concluded that this represents the normal amount of bilirubin transferred from foetal plasma and*

di di selezionare i casi ad elevato rischio^{2,88}. Spesso era difficile prevedere l'andamento della prima gravidanza affetta, e questo era molto importante poiché questa gravidanza poteva essere l'ultima e con ragionevoli probabilità di produrre un neonato vivo.

Amniocentesi

Si rese perciò necessaria l'indicazione più diretta dello stato clinico del feto in utero: la soluzione di questo problema fu anticipata da BEVIS¹⁵ ed attuata da LILEY¹⁰⁴. Si trovò che l'analisi spettrofotometrica del liquido amniotico poteva dare una misura della bilirubina presente nel feto e fornire così un'indicazione sulla gravità del processo emolitico. CHERRY e Coll.³⁸ osservarono che la bilirubina non coniugata del liquido amniotico è legata all'albumina e che esiste un gradiente di concentrazione della bilirubina tra il plasma fetale e il liquido amniotico tale da permettere il passaggio della bilirubina attraverso la membrana di separazione. Questo processo è stato paragonato al passaggio di bilirubina che avviene dal feto alla madre attraverso la barriera placentare¹⁵². Si considera che il livello di bilirubina nel liquido amniotico a) sia una misura della gravità del processo emolitico, e b) possa essere usato come indicazione dello stato clinico del feto e della probabile prognosi.

Metodi di analisi del liquido amniotico

Il metodo spettrofotometrico più comunemente usato si basa sulla comparazione di un picco nello spettro di assorbimento tra 350 e 550 m μ . MANDELBAUM e ROBINSON¹¹⁰ mostrarono come, in mancanza di contaminazione di emoglobina, metaemoglobina e meconio, tale picco sia dovuto a presenza di bilirubina, non coniugata. Un apprezzabile picco di bilirubina si osserva normalmente all'inizio della gravidanza⁹. MANDELBAUM e Coll.¹⁰⁹ osservarono la diminuzione graduale di questo picco e la sua scomparsa alla 36^a settimana di gravidanza. Si può concludere che questa rappresenta la normale quota di biliru-

that increasing maturation of the foetal liver leads to increasingly efficient conjugation of bilirubin in the foetal circulation so that the pigment can no longer cross into the amniotic fluid.

The question of the best method of measuring the bilirubin curve has presented some difficulty. The most commonly used method is that of LILEY¹⁰⁴ who plotted the optical density (OD) at successive wave lengths on semilogarithmic paper and used as a base line a straight line drawn tangentially to the resulting curve between points at approximately 365 and 550 m μ . The vertical deviation of the curve above this base line at 450 m μ (expressed as ODD₄₅₀) was the parameter used to give a quantitative estimate of the amount of bilirubin present. There have been variations in technique including the use of a continuously recording spectrophotometer and of a linear scale for plotting optical density. The use of a linear scale to record optical density results in slightly lower values for ODD₄₅₀ than when a logarithmic scale is used, the degree of difference varying somewhat according to the total protein concentration present.

In order to avoid the use of a somewhat arbitrary base line some workers have used different criteria to read the spectrophotometric curve (fig. 1). SAVAGE et al.¹⁵¹ used the ratio, light transmittance at 520 m μ /transmittance at 490 m μ , this being the result of feeding data into a computer in order to produce the best correlation with the clinical outcome. BONSNES¹⁷ recommended that the difference between absorbance at 575 and at 455 m μ be used, this being in part intended to avoid discrepancies due to the presence of turbidity and oxyhaemoglobin in the fluid. Yet another method has been that of CHERRY et al.³⁷ who subtracted the absorbance at 600 m μ from that at 450 m μ . In combination with this they took into account the finding of LILEY¹⁰⁴ that in the case of all but the most severely affected foetuses, there was a tendency

bina proveniente dal plasma fetale e che la maturazione progressiva del fegato fetale porta ad incremento nell'efficienza della coniugazione della bilirubina nel circolo fetale, cosicché il pigmento non può più passare nel liquido amniotico.

Alcune difficoltà ha suscitato il problema della scelta del miglior metodo di misurazione della curva della bilirubina. Il metodo più comunemente usato, dovuto a LILEY¹⁰⁴, consiste nel riportare la densità ottica (OD) a successive lunghezze d'onda su una scala semilogaritmica, usando come linea di base una retta disegnata tangenzialmente fra i punti a 365 e 550 m μ : la deviazione verticale della curva sopra questa linea di base a 450 m μ (espressa come ODD₄₅₀) era il parametro usato per dare una stima quantitativa della concentrazione di bilirubina presente. Vi sono state variazioni nella tecnica, quali l'uso di spettrofotometro a scansione continua e di una scala lineare per riportare la densità ottica. L'uso della scala lineare porta a valori di ODD₄₅₀ un po' più bassi rispetto a quelli ottenuti impiegando una scala logaritmica; l'entità della differenza dipende in parte dalla concentrazione totale delle proteine presenti.

Alcuni AA. hanno adottato per la lettura della curva spettrofotometrica (fig. 1) criteri differenti che evitano l'uso di una linea di base arbitraria. SAVAGE e Coll.¹⁵¹ si sono serviti del rapporto tra la trasmittanza a 520 ed a 490 m μ , in quanto con l'uso del calcolatore hanno trovato che questo criterio di interpretazione dei dati è quello che fornisce la migliore correlazione con le manifestazioni cliniche. BONSNES¹⁷ consiglia invece l'uso della differenza tra l'assorbimento a 575 e a 455 m μ , in quanto questo metodo permetterebbe di evitare le discrepanze dovute alla presenza di torbidità o di ossiemoglobina nel liquido. Un altro metodo, quello di CHERRY e Coll.³⁷ consiste nel sottrarre l'assorbimento a 600 m μ da quello a 450 m μ . Inoltre questi AA. tennero presenti i dati di LILEY¹⁰⁴ il quale osservò come in tutti i feti ammalati, con l'eccezione

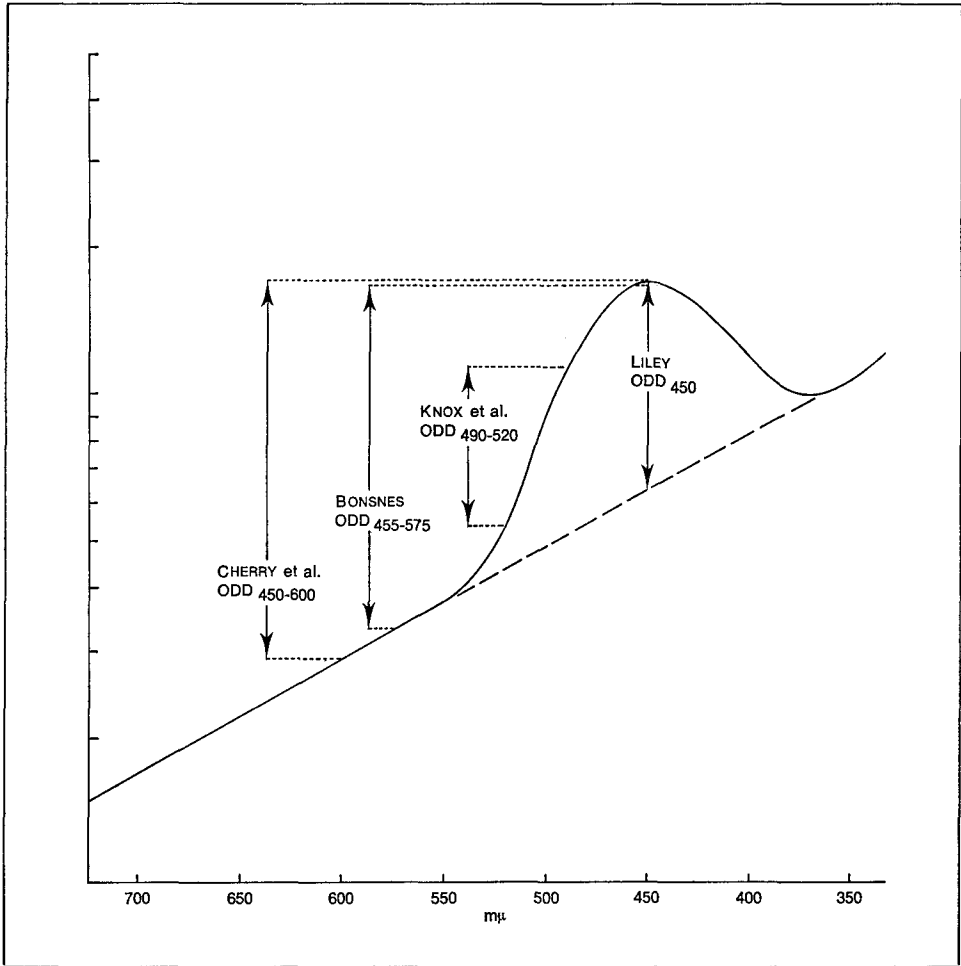


Fig. 1 - Amniotic fluid spectrophotometry in foetal haemolytic disease. Measurement of bile pigment in the amniotic fluid by different spectrophotometric methods. From BARTSCH⁹.

Spettrofotometria del liquido amniotico nella malattia emolitica del neonato. La determinazione quantitativa del pigmento biliare nel liquido amniotico è stata effettuata impiegando differenti metodi spettrofotometrici. Da BARTSCH⁹.

for the optical density reading of pathological fluids to decrease progressively after the 28th week, presumably due to dilution, and they therefore used the total protein content of the fluid as an index of this. The final estimate was thus ODD (450-600) mμ/total protein g/100 ml.

Difficulties in the measurement of ODD₄₅₀ and of the other parameters

dei casi più gravi, la densità ottica del liquido tendesse a diminuire dopo la 28^a settimana, probabilmente per un fenomeno di diluizione; questi ricercatori si servirono quindi del valore del contenuto totale di proteine del liquido come indice per valutare questo fenomeno. La stima finale era perciò data dal valore del rapporto ODD (450-600) mμ/proteine totali g/100 ml.

La presenza di sostanze contaminanti quali l'ossiemoglobina, la metaemalbu-

used, resulting from the presence of contaminants such as oxyhaemoglobin, methaemalbumin and meconium, have been encountered and there has been considerable agreement that their presence makes such measurement often impossible. A recent analysis of this problem has been made by HALITSKY and KRUMHOLZ^{67,69}. They found that although oxyhaemoglobin tended to produce its dominant peak centred at 414 m μ , the value of ODD₄₅₀, whether measured linearly or logarithmically, changed only slightly as increased amounts of oxyhaemoglobin up to 50 mg/100 ml were added. On the other hand, increasing amounts of methaemalbumin (found in severe cases of erythroblastosis) diminished, whilst meconium increased the measured value of ODD₄₅₀. In their experiments they found that amniotic fluids, when deliberately contaminated with methaemalbumin or meconium and then extracted with chloroform, gave total optical density readings which were very close to the original log ODD₄₅₀ (i.e. ODD₄₅₀ on a logarithmic scale). In other words, the total absorbance of a chloroform extract of any amniotic fluid measured at 450 m μ gave a reading very near to log ODD₄₅₀. It was also found that estimations of the actual bilirubin concentrations to within 0.03 mg/100 ml could be obtained: a) by multiplying log ODD₄₅₀ by 1.47 or b) by multiplying ODD₄₅₀ of a chloroform extract by 1.27. These studies confirm previous studies in which the value of chloroform extracts, read in a very simple way spectrophotometrically, was documented^{28,136}.

Clinical application

The studies of LILEY¹⁰⁴ correlated in an empirical way ODD₄₅₀ and the cord Hb at term. The tendency in mild and moderate cases of erythroblastosis for the optical density to fall with increasing maturity was taken into account, and in this way the prognostic zones which have been used by many obstetricians were demarcated. Later, in order to produce greater precision of

mina e il meconio può rendere difficoltosa e spesso impossibile la misurazione di ODD₄₅₀ e degli altri parametri usati. HALITSKY e KRUMHOLZ^{67,69} hanno recentemente pubblicato un'analisi completa di questo problema. Essi hanno trovato che l'ossiemo globina, sebbene dia un picco di assorbimento intorno a 414 m μ , aggiunta al liquido sino alla concentrazione di 50 mg/100 ml, altera solo di poco il valore di ODD₄₅₀, sia se questo viene misurato linearmente che logarithmicamente. D'altra parte, la presenza di quantità crescenti di metaemalbumina (come si riscontra nei casi gravi di eritroblastosi) abbassa, mentre il meconio aumenta, il valore di ODD₄₅₀. Nei loro esperimenti, questi AA. trovarono che il liquido amniotico, deliberatamente contaminato con metaemalbumina o meconio e quindi estratto con cloroformio, dà densità ottica totale molto vicina al log ODD₄₅₀ di origine (cioè ODD₄₅₀ su scala logarithmica). In altre parole, l'assorbimento dell'estratto con cloroformio di qualsiasi liquido amniotico misurato a 450 m μ dà un valore molto vicino a log ODD₄₅₀. Essi trovarono anche che si può risalire alla reale concentrazione in bilirubina, qualora questa sia entro 0,03 mg/100 ml a) moltiplicando il log ODD₄₅₀ per 1,47 oppure b) moltiplicando ODD₄₅₀ di un estratto con cloroformio per 1,27. Questi studi confermano i risultati di precedenti lavori in cui era stata documentata l'importanza della semplice lettura fotometrica degli estratti con cloroformio^{28,136}.

Applicazioni cliniche

LILEY¹⁰⁴ correlò in maniera empirica ODD₄₅₀ ed emoglobina del cordone al parto. In questi studi si tenne conto che con l'aumentare dell'età del feto la densità ottica tendeva a diminuire nei casi lievi di eritroblastosi fetale: si stabiliscono così quelle zone prognostiche che sono state adottate da molti ginecologi. In seguito, per permettere una maggiore precisione di diagnosi, si sud-

prognosis, the upper and middle of the three zones were subdivided¹⁰⁵. In this way the finding of a particular value for ODD_{450} at a particular gestation is used to determine the probabilities of particular outcomes for the foetus, e.g. expected cord Hb at delivery or intra-uterine death (fig. 2). A common practice is to carry out amniotic fluid analysis at 29-32 weeks. This may: a) imply a high probability of a particular outcome such as intra-uterine death, or b) leave a considerable degree of uncertainty. In the latter instance, further sampling is carried out at 33-35 weeks and possibly again at 37-38 weeks. Most obstetricians use the trend in the values obtained as an important guide to the condition of the foetus and to the likely outcome. Thus a fall in ODD_{450} would

divisero ulteriormente queste zone¹⁰⁵. In questo modo, un particolare valore di ODD_{450} in un dato momento della gravidanza permette di determinare la probabilità per il feto di una certa prognosi, quale il valore dell'emoglobina nel sangue del cordone al momento del parto o la morte intrauterina (fig. 2). L'analisi del liquido amniotico viene in genere eseguita tra la 29^a e la 32^a settimana. Il reperto può: a) indicare già con buona probabilità una determinata prognosi, quale ad esempio la morte intrauterina, oppure b) non dare alcuna indicazione sicura. In quest'ultimo caso si ripete l'analisi tra la 33^a e la 35^a settimana e, se possibile, ancora tra la 37^a e la 38^a settimana. Molti ginecologi si servono dell'andamento dei valori ottenuti come di indicazione importante del-

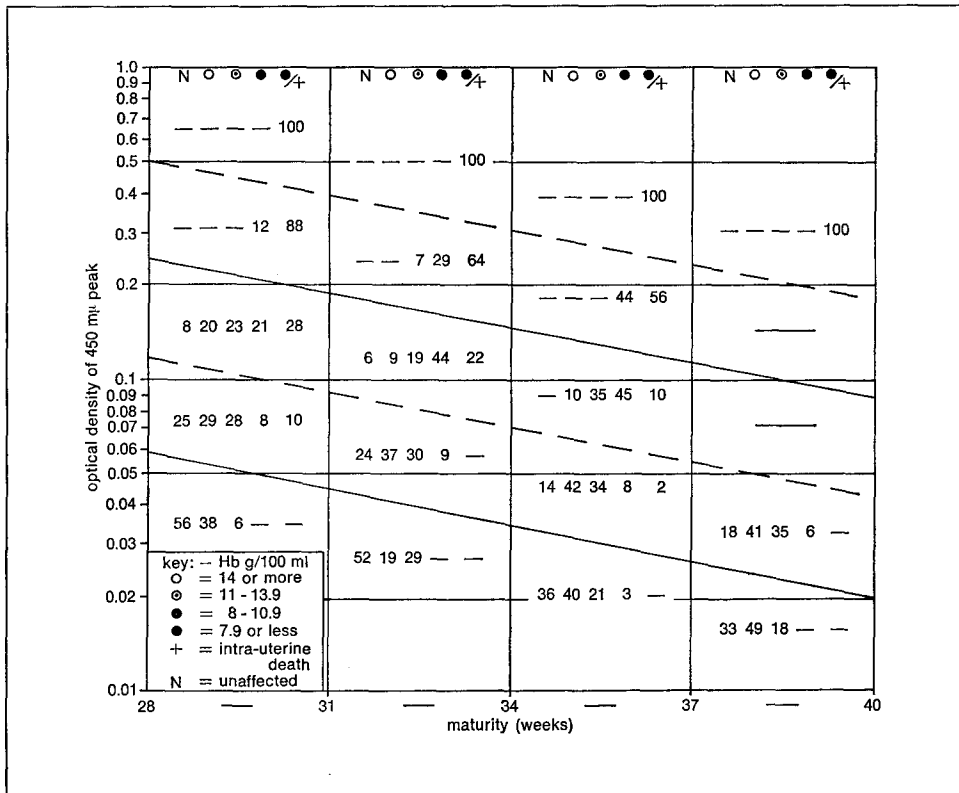


Fig. 2 - Percentage probability of the various grades of affliction for the ODD_{450} in a single specimen. From LILEY¹⁰⁵.

Probabilità percentuale dei vari gradi di affezione per l' ODD_{450} in un singolo campione. Da LILEY¹⁰⁵.

suggest a good prognosis whilst a steady value or a rise would suggest a bad prognosis. WHITFIELD et al.¹⁷⁵ determined by the extrapolation of the line joining two values for ODD₄₅₀ obtained at, on average, three weeks interval, the point in pregnancy at which the risk to the foetus would become very marked, using a 'action line' to indicate the limits of the high risk zone. This method has been used with success but it does of course assume that the severity of the pathological process is changing at a constant rate and this is not always the case.

Depending on the state of pregnancy, early induction or intra-uterine transfusion would be carried out where the indications were that there was a high probability that the foetus would not survive without these measures. LILEY¹⁰⁴ found that the greatest improvement in perinatal mortality resulting from this approach was in those pregnancies falling into the intermediate zones, as induction could be postponed until a time when there was an improved chance of the newborn infant surviving. He found that by using this method there was a fall in perinatal mortality from 22-25 % before 1958 to less than 9 % by 1962. The method outlined above has been used with considerable success by many obstetricians throughout the world. Great efforts have been made to improve the prognostic value of the ODD₄₅₀ but it would seem that the attempt to use a single parameter to give a prognosis for a disease such as erythroblastosis can never reach a hundred per cent success.

FREDA⁵⁶ has used the optical density curves in a somewhat different way. Each curve, with the measurement of ODD₄₅₀, is used as an indication of the clinical condition of the foetus at the time of amniocentesis and by relatively frequent repeated amniocenteses, the progress of the foetus is thus monitored.

le condizioni del feto e della probabile evoluzione della gravidanza. Così, una caduta di ODD₄₅₀ sarebbe segno di prognosi favorevole, mentre un andamento costante o in ascesa si associerebbe ad una prognosi sfavorevole. WHITFIELD e Coll.¹⁷⁵, studiando la linea congiungente due valori di ODD₄₅₀ misurati con un intervallo medio di 3 settimane, determinarono il periodo nella gravidanza di maggior pericolo per il feto, servendosi di una «linea di azione» per indicare i limiti delle zone ad alto rischio. Questo metodo è stato applicato con successo, sebbene naturalmente esso sia basato su una regolarità di evoluzione del processo patologico, cosa che non sempre corrisponde a verità.

La trasfusione intrauterina o, qualora sia già possibile, il parto prematuro, sono indicati quando i reperti fanno ritenere che con ogni probabilità il feto non sarebbe in grado di sopravvivere senza l'adozione di questa misura. LILEY¹⁰⁴ trovò che con tale criterio la diminuzione più spiccata nella mortalità perinatale si aveva in quelle gravidanze che rientrano nella zona intermedia, in quanto in tali casi il parto poteva essere posticipato sino a quando le probabilità di sopravvivenza per il neonato fossero buone. A partire dal 1962 questo A. ottenne una mortalità di meno del 9 %, contro il 22-25 % degli anni precedenti al 1958. Il metodo ora descritto è stato impiegato con successo da ginecologi di ogni parte del mondo. Sono stati compiuti grandi sforzi per migliorare il valore prognostico di un'unica determinazione di ODD₄₅₀, ma sembra chiaro che il tentativo di formulare una prognosi per una malattia così complessa come l'eritroblastosi fetale, con l'ausilio di un solo parametro, non può essere coronato da completo successo.

FREDA⁵⁶ si è servito delle curve di densità ottica in modo un po' differente. Ogni curva, con la sua misura di ODD₄₅₀, dà un'indicazione della condizione clinica del feto al momento dell'amniocentesi: per mezzo di esami ripetuti con una certa frequenza si tiene sotto controllo l'andamento delle con-

Four grades were defined and included in the assessment was a consideration of the position of the peak of the bilirubin curve, a shift to lower wave lengths being thought to be due to foetal acidosis, and thus of serious prognostic significance. The assessment of the amniotic fluid readings as grades 1+ and 2+ implied that no disease or mild disease was present in most cases and that if the foetus was affected it would not die in utero during the subsequent 1-2 weeks. If repeated tests were favourable no further measures were taken, and in this way the prime aim of maintaining the foetus in utero until the latest possible time before induction was achieved. This improved the outlook for infants who, without such careful monitoring, might have been induced earlier and thus been exposed to increased hazard in the neonatal period. Grades 3+ and 4+ indicated severe disease or impending foetal death, and thus intrauterine transfusion and early induction would be carried out. FREDÁ⁵⁶ was also successful in reducing the perinatal mortality to a figure similar to that of LILEY, i.e. 9%.

QUEENAN and GOETSCHEL¹⁴⁴ applied the Bonsnes method with success. They found that isolated estimates of amniotic fluid were of little prognostic value, but that serial readings were of great help in practice. Falling values tended to be associated with survival of the foetus whilst steady or increasing values were associated with the likelihood of intra-uterine or neonatal death. They applied this technique in a way similar to that of FREDÁ⁵⁶ with the aim of postponing induction of labour to 38 weeks gestation whenever possible.

Intra-uterine transfusion

Since its introduction by LILEY¹⁰⁶ intra-uterine transfusion has been widely

dizioni del feto. La valutazione, che viene espressa attraverso 4 gradi di gravità, tiene anche conto della posizione del picco nella curva di assorbimento della bilirubina: infatti uno spostamento del picco verso lunghezze d'onda più corte, essendo considerato espressione di acidosi fetale, assume un serio significato prognostico. Valori dell'analisi del liquido amniotico che corrispondano ai gradi 1+ e 2+ indicano in genere che nel feto non esiste una condizione patologica, oppure, se essa è presente in forma molto lieve, si può affermare con sicurezza che nella 1^a-2^a settimana susseguente il feto non morirà *in utero*. Se tests ripetuti continuavano a dare risultati favorevoli, non si procedeva più ad ulteriori misure, e in questo modo si raggiungeva l'obiettivo di mantenere il feto *in utero* il maggior tempo possibile prima del parto. Ciò migliorava le prospettive di questi neonati che, senza un controllo così accurato e continuo, sarebbero nati prematuramente, esponendosi così ai rischi del parto prematuro. I gradi 3+ e 4+ indicano malattia grave e morte imminente del feto: in questi casi si deve procedere alla trasfusione intrauterina o al parto prematuro. FREDÁ⁵⁶ riuscì in tal modo a ridurre la mortalità perinatale al 9%, valore simile a quello ottenuto da LILEY.

QUEENAN e GOETSCHEL¹⁴⁴ applicarono con successo il metodo di Bonsnes. Essi trovarono che analisi isolate del liquido amniotico avevano scarso valore prognostico, ma che analisi seriali ripetute potevano costituire un grande ausilio pratico. Infatti, valori in diminuzione tendevano ad essere associati con la sopravvivenza del feto, mentre valori costanti od in aumento venivano correlati con la probabilità di morte intrauterina o perinatale. Essi, così come FREDÁ⁵⁶, applicarono questa tecnica con l'intento di rinviare, quando possibile, l'induzione del parto sino alla 38^a settimana di gestazione.

Trasfusione intrauterina

Da quando venne introdotta da LILEY¹⁰⁶, la trasfusione intrauterina è sta-

used as a method of attempting to salvage foetuses due to die in utero before induction of labour is feasible, i.e. before approximately 32-34 weeks gestation. The transfused cells pass from the foetal peritoneal cavity into subdiaphragmatic lymphatics and enter the foetal circulation via the thoracic duct. In this way the red cell mass of the foetus can be increased and the secondary circulatory consequences of the anaemia lessened or prevented. The initial indication that such transfusion might be necessary comes from a consideration of the previous obstetric history and the titre of antibodies in the mother. Difficulty in making a decision is particularly present in the case of first affected pregnancies. Assessment of the ODD₄₅₀ or some other parameter of the bilirubin content of the amniotic fluid is then used to assess the likely outcome of the pregnancy and the probability of intra-uterine death. As mentioned above, the difficulty here is that prognosis is not completely accurate, and if a relatively low risk of intra-uterine death occurring is accepted as an indication for intra-uterine transfusion, some foetuses which might survive with or without early induction will be needlessly transfused and therefore exposed to additional risk.

QUEENAN¹⁴³ has reviewed the findings of a cooperative study based on fifteen medical centres; 1,074 intra-uterine transfusions were performed by the closed technique of LILEY on 591 foetuses and 203 survived, i.e. 34 %. It was noted that with 31 of the surviving foetuses the last amniotic fluid sample gave ODD₄₅₀ values in the middle zone of LILEY, and there was thus the possibility that some of these would probably have survived to early induction and exchange transfusion without the intra-uterine transfusion. It was pointed out that the centres with the strictest criteria for intra-uterine transfusion had the lowest survival rate and that those with the least strict criteria had the highest. It was suggested that the criteria for intra-uterine transfusion put for-

ta largamente utilizzata come metodo per salvare quei feti che, non ancora giunti alla 32^a-34^a settimana, e non essendo ancora possibile il parto anticipato, erano destinati a morte intrauterina. Gli eritrociti iniettati nella cavità peritoneale, giungono ai linfonodi sottodiaframmatici e quindi entrano nel circolo fetale attraverso il dotto toracico. In tal modo si aumenta l'ematocrito del feto e così le conseguenze circolatorie secondarie dell'anemia sono diminuite o prevenute. La prima indicazione che tale trasfusione è necessaria viene dai precedenti ostetrici e dal titolo in anticorpi della madre. Nel caso di prima gravidanza affetta vi possono essere delle difficoltà nella decisione. Ci si serve allora della misura di ODD₄₅₀ o di qualche altro parametro del contenuto di bilirubina per valutare il probabile andamento della gravidanza e il rischio di morte intrauterina. Come già detto, le difficoltà nella decisione si hanno se la prognosi non è completamente sicura: infatti se si adotta come indicazione per la trasfusione intrauterina un rischio relativamente basso di morte prenatale, si rischia di sottoporre agli ulteriori pericoli di una trasfusione non necessaria feti che avrebbero potuto sopravvivere con o anche senza parto prematuro.

QUEENAN¹⁴³ ha riesaminato i risultati di uno studio eseguito in cooperazione da 15 Centri medici. Con la tecnica chiusa di LILEY sono state eseguite 1.074 trasfusioni intrauterine su 591 feti di cui 203, cioè il 34 %, sono sopravvissuti. Si osservò che 31 dei feti sopravvissuti mostravano all'ultima analisi un valore di ODD₄₅₀ che corrispondeva alla zona intermedia di LILEY: alcuni di questi sarebbero quindi sopravvissuti anche con il parto prematuro e l'exsanguino trasfusione, e senza trasfusioni intrauterine. Fu anche osservato che i Centri che avevano adottato criteri più rigidi nel decidere di effettuare le trasfusioni intrauterine, avevano la percentuale di sopravvivenza più bassa, mentre quelli che avevano adottato criteri più larghi, la più alta. Come la mi-

ward by LIGGINS¹⁰³, in which a zone enclosing most of the upper zone of LILEY between 25 and 32 week gestation is defined, were the best guide in making a decision about intra-uterine transfusion. The risk of stillbirth for this zone is of the order of 70-100 %.

In some mothers in whom the prior obstetric history is bad, amniocentesis is sometimes carried out before the 25th week. Assessment of pathological amniotic fluids is often very difficult as the normal bilirubin peak is maximal at 18-20 weeks^{12,32}. The earlier in pregnancy in which the indication for performing intra-uterine transfusion is present, the more severe on average is the disease likely to be and the less likely, therefore, is a satisfactory outcome to result. QUEENAN's¹⁴³ data showed that where the initial transfusion was performed before the 25th week, 91% of the foetuses died in utero. When the transfusion was first carried out between the 25th and 27th week, 76 % died, and if it was 28 weeks or later 44 % died. It was argued that it was probably not justified to attempt intra-uterine transfusion between 19 and 24 weeks. With regard to the presence of hydrops, the survival rate was 6.6 % (12 out of 182 cases).

LILEY¹⁰⁷ reported 60 surviving infants in 167 pregnancies (35.9 %). FRIESEN⁶¹ summarised the results of several groups of workers indicating a percentage survival overall of 36 %.

WADE et al.¹⁷⁰ reported on the results of 113 intrauterine transfusions carried out by the closed technique on 52 foetuses. The survival rate was 34.6, a figure very similar to that of the cooperative study summarised above. Some success appears to have been achieved with transfusion first carried out between 20 and 24 weeks, 3 out of 16 foetuses surviving. As it is likely that somewhat different criteria were used from the rather heterogeneous criteria applied in the cooperative study reported by QUEENAN¹⁴³, it is difficult to draw any firm conclusions from this.

gliore guida per prendere una decisione su una trasfusione intrauterina si considera il criterio proposto da LIGGINS¹⁰³: tale A. ha proposto una zona, con una probabilità di morte intrauterina del 70-100 %, che corrisponde in gran parte alla zona superiore di LILEY tra la 25^a e la 32^a settimana di gravidanza.

L'amniocentesi viene talvolta eseguita prima della 25^a settimana in alcune madri con precedenti ostetrici particolarmente gravi. In tal caso il riconoscimento dei liquidi patologici è spesso molto difficile in quanto il picco fisiologico della bilirubina è massimo intorno alla 18^a-20^a settimana^{12,32}. La malattia in media è tanto più grave quanto più anticipatamente si hanno indicazioni tali da consigliare trasfusioni intrauterine, ed è quindi tanto meno probabile che si abbia un esito favorevole. I dati di QUEENAN¹⁴³ mostrano che muore in utero il 91 % dei feti che hanno ricevuto trasfusioni intrauterine prima della 25^a settimana; il 76 % dei trasfusi tra la 25^a e la 27^a, ed infine il 44 % dei trasfusi dopo la 28^a settimana. Ne deriva che non è giustificato tentare la trasfusione intrauterina tra la 19^a e la 24^a settimana. Nei casi di presenza di idrope, la percentuale di sopravvivenza è del 6,6 % (12 casi su 182).

LILEY¹⁰⁷ riferisce di 60 neonati sopravvissuti su 167 gravidanze (35,9 %). FRIESEN⁶¹ riunì i risultati di vari gruppi di AA. ottenendo una percentuale di sopravvivenza intorno al 36 %.

WADE e Coll.¹⁷⁰ riferiscono i risultati di 113 trasfusioni intrauterine eseguite con tecnica chiusa su 52 feti. La percentuale di sopravvivenza, 34,6 %, è molto simile a quella dello studio cooperativo ricordato sopra. Sembra anche che siano stati ottenuti 3 successi su 16 feti trasfusi per la prima volta tra la 20^a e la 24^a settimana. Dal momento però che sono stati applicati criteri che probabilmente differiscono da quelli piuttosto eterogenei applicati nello studio cooperativo di QUEENAN¹⁴³, è difficile su questo punto giungere ad una conclusione sicura. È stato ancora ripor-

It was noted that the survival rate when evidence of foetal ascites was present was only 1.9 %.

A considerable operative mortality rate has been documented. FRIESEN and BOWMAN⁶² found that the risk of death of the foetus, as a direct result of the procedure (due to trauma, haemorrhage, infection and premature labour) was approximately 15-20 % for each transfusion. QUEENAN recorded that the risk from trauma alone was 10 % for each foetus. It is likely that this operative risk can be reduced by improved technique.

The use of hysterotomy in order to implant a catheter under direct vision into the peritoneal cavity¹ and to carry out exchange transfusion in utero^{7,57} has been applied on a small scale. In the cooperative study reported by QUEENAN 3 out of 23 foetuses survived where transfusion involved hysterotomy. WADE et al.¹⁷⁰ came to the conclusion that the low survival rate and the potential risk of infection and other complications did not justify this approach.

COMMENT

GREEN et al.⁶⁴ estimated that 90 % of affected pregnancies can be managed by conventional methods to give a surviving infant in the great majority of cases. Thus intra-uterine transfusion might have to be considered in the remaining 10 %, and in experienced hands approximately one third of these can be saved.

The possibility has been raised that lymphocytes in the donor blood might survive in the immunologically immature foetus, and might be capable of mounting an immunological attack on the foetal tissues, i.e. graft-versus-host (GVH) reaction. HUTCHINSON et al.⁸² found XX chromosome lymphocytes in the blood of two male infants transfused in utero with maternal blood. NAIMAN et al.¹²⁶ reported evidence of a GVH reaction in an infant which had undergo-

tato che la percentuale di sopravvivenza per i casi affetti da idrope fetale era soltanto dell'1,9 %.

È stata riportata una considerevole mortalità operatoria. FRIESEN e BOWMAN⁶² trovarono che il rischio di morte per il feto in seguito alla trasfusione (a causa di traumi, emorragie, infezioni e parto prematuro) era di circa il 15-20 % per ciascuna trasfusione. QUEENAN riferì che il rischio per i soli eventi traumatici era del 10 % per ciascun feto. È probabile che questo rischio operativo possa essere ridotto con il miglioramento delle tecniche.

L'isterotomia per inserire un catetere sotto controllo visivo diretto nella cavità peritoneale¹ e per eseguire una exsanguino trasfusione *in utero*^{7,57}, è stata adottata su piccola scala. Nello studio cooperativo riportato da QUEENAN sopravvissero 3 dei 23 feti sottoposti a tale trattamento. WADE e Coll.¹⁷⁰ giunsero alla conclusione che la percentuale di sopravvivenza molto bassa, il rischio potenziale di infezioni e di altre complicazioni non giustificano questo intervento.

COMMENTO

GREEN e Coll.⁶⁴ stimarono che il 90 % delle gravidanze colpite e trattate con i metodi convenzionali producono, nella grande maggioranza dei casi, un bambino vivente. Così la trasfusione intrauterina deve essere lasciata al restante 10 %, del quale un terzo, se in mani esperte, può essere salvato.

Si è parlato della possibilità che i linfociti del donatore potessero sopravvivere nel feto immunologicamente immaturo e preparare un attacco immunologico verso i tessuti fetali [*graft-versus-host* (GVH) reaction]. HUTCHINSON e Coll.⁸² trovarono linfociti con due cromosomi X nel sangue di due neonati di sesso maschile trasfusi *in utero* con sangue materno. NAIMAN e Coll.¹²⁶ portarono prove di reazione GVH in un neonato che aveva ricevu-

ne three intra-uterine transfusions and, in addition, found some evidence of chimerism in respect of the Y chromosomes of peripheral lymphocytes. It was suggested that a mild self-limited GVH reaction might be a common event after intra-uterine transfusion. It is not certain at present whether this is a clinically important phenomenon, but the suggestion has been made that there may be a place for using reconstituted frozen red cells rather than fresh whole blood.

OTHER APPROACHES TO TREATMENT

Neutralization of anti-D

Knowledge of the chemistry of the Rh antigens is very incomplete. In spite of this, several attempts have been made to produce material with the aim of specifically neutralising maternal Rh antibodies. Considerable claims were made by CARTER *et al.*³³ for a so-called 'Rh hapten' produced from alcohol-precipitated Rh-positive blood, but the report was poorly documented. MURRAY *et al.*¹²³ concluded that lipid substances extracted from red cells did not in fact have Rh specificity. Ribonucleic acid derivatives^{65,133} 'unnatural' sugars²⁶ and colominic acid²⁷ have been studied experimentally for their ability to block Rh antibody, but it has not been shown that a practical application is possible or likely to be of any benefit.

Use of corticosteroids

The ability of corticosteroids to suppress immune responses has led to trials of their use in Rh-immunised mothers. It was claimed by HUNTER⁸¹ that the administration of cortisone during pregnancy was successful in reducing the stillbirth rate from 17% to 8%. The structure of this trial was, however, criticised by ALLEN *et al.*². Experience since then has failed to demonstrate any

to 3 trasfusioni intrauterine, oltre ad alcune prove di chimerismo riguardo al cromosoma Y nei linfociti del sangue periferico. È stato suggerito che una debole e limitata reazione di GVH possa essere evento comune dopo trasfusione intrauterina. Per ora non si sa se questo fenomeno possa avere importanza clinica, ma è stato comunque proposto di utilizzare per le trasfusioni globuli rossi congelati, piuttosto che sangue fresco intero.

ALTRI TENTATIVI DI TERAPIA

Neutralizzazione dell'anti-D

Le nostre conoscenze sulla chimica degli antigeni Rh sono molto incomplete. Ciononostante sono stati fatti molti tentativi per ottenere una sostanza che fosse in grado di neutralizzare specificamente gli anticorpi anti Rh della madre. CARTER e Coll.³³, d'altra parte, hanno molto insistito sul cosiddetto « aptene Rh » prodotto mediante precipitazione in alcool di un sangue Rh positivo; tuttavia, le prove avanzate da questi AA. sono piuttosto scarse. MURRAY e Coll.¹²³ sono giunti alla conclusione che le sostanze lipidiche estratte dagli eritrociti non possiedono in realtà una specificità Rh. È stata anche studiata la capacità di bloccare gli anticorpi anti Rh da parte di derivati dell'acido ribonucleico^{65,133}, zuccheri « non naturali »²⁶ ed acido colemnico²⁷: non si è potuto però trovare per nessuna di queste sostanze un'applicazione pratica di qualche vantaggio.

Uso dei corticosteroidi

Data la capacità dei corticosteroidi di sopprimere la risposta immune, si è cercato di utilizzarli nelle madri immunizzate per il fattore Rh. HUNTER⁸¹ riferì che la somministrazione di cortisone durante la gravidanza permise di ridurre la percentuale di nati morti dal 17 all'8%. La validità di questo tentativo è stata comunque criticata da ALLEN e Coll.². Da allora infatti non si

lowering of Rh antibody titres or any clinical effect on erythroblastosis.

Plasmapheresis

The first report of an attempt to lower the anti-D concentration in the plasma of an immunised woman was that of BOWMAN et al.²⁴. The removal of approximately 6 l of plasma when the patient was not pregnant led to a fall in anti-D titre from 1:256 to 1:64, but the level rose rapidly after the last plasmapheresis. During a subsequent Rh-positive pregnancy a total of 46 l of plasma was removed between the fifteenth and twenty-fourth weeks and no change in titre was found. In addition, three intrauterine transfusions were given, so that although the infant survived it was concluded that plasmapheresis had played no part in this.

POWELL¹⁴² carried out plasmapheresis on eight mothers, removing totals of between 2.4 and 48 l of plasma over a period of 7-12 days. Minor transient falls in anti-D titre were noted. There was no convincing evidence that the outcome of the pregnancies had been influenced.

Recently CLARKE et al.⁴³ have carried out a further study of plasmapheresis. Amounts of plasma ranging from 4,245 to 10,430 ml were removed over periods of from 7 to 44 days. Only minor changes in anti-D titre occurred, but direct measurement of the anti-D concentrations in some of the mothers showed some fall, paralleling as a rule the fall in total IgG concentration. As intra-uterine transfusion was also carried out in five mothers, it is extremely difficult to draw any conclusions as to the effect on the outcome of the pregnancies.

THE PREVENTION OF Rh IMMUNISATION

It is evident that the real solution to the problem of erythroblastosis is the

è più potuto dimostrare sperimentalmente né un abbassamento nel titolo di anticorpi, né alcun effetto clinico sull'eritroblastosi.

Plasmaferesi

La prima relazione del tentativo di abbassare il titolo anti-D nel plasma di una donna immunizzata è quella di BOWMAN e Coll.²⁴. La sottrazione di circa 6 l di plasma in una paziente non gravida ha portato alla caduta del titolo di anti-D da 1:256 a 1:64, ma tale valore risalì rapidamente dopo l'ultima plasmaferesi. Nel corso di una successiva gravidanza Rh positiva furono rimossi in totale 46 l di plasma tra la 15^a e la 24^a settimana, tuttavia non si osservò alcuna diminuzione del titolo. Furono inoltre eseguite 3 trasfusioni intrauterine, per cui, sebbene il bambino sopravvivesse, si poté concludere che la plasmaferesi non aveva portato alcun contributo.

POWELL¹⁴² eseguì la plasmaferesi su 8 madri, sottraendo in totale per ogni paziente da 2,4 a 48 l di plasma in un periodo di 7-12 giorni. Si notarono lievi e transitorie cadute del titolo di anti-D. Non esiste prova convincente che la plasmaferesi abbia in qualche modo influenzato l'esito della gravidanza.

Recentemente, CLARKE e Coll.⁴³ hanno condotto un ulteriore studio sulla plasmaferesi. Dalle madri sono state sottratte quantità di plasma da 4,245 a 10,430 l in un periodo variabile da 7 a 44 giorni. Furono osservate soltanto lievi modificazioni del titolo di anti-D, sebbene la misura diretta della concentrazione di anti-D in qualche madre mostrasse una certa caduta, parallela a quella della concentrazione delle IgG totali. Non è possibile trarre una conclusione dell'effetto sull'esito della gravidanza, in quanto su 5 delle madri venne eseguita trasfusione intrauterina.

PROFILASSI DELL'IMMUNIZZAZIONE Rh

È evidente come la vera soluzione del problema dell'eritroblastosi stia nel

prevention of immunisation of the Rh-negative mother by the Rh-positive foetus. A series of developments in different fields of research during the nineteen-fifties laid the basis for an immunological approach to this problem which now appears to have been largely solved. The studies of MOLLISON^{118,119}, JANDL et al.⁸⁴ led to an increased understanding of the effects of different types of antibodies on the survival of incompatible red cells and of the mechanism of their clearance from the circulation. It was shown that where considerable damage to the red cell occurred as a result of the action of certain types of antibody, very rapid clearance occurred, particularly to the liver. With less intense change in the red cell a rather slower rate of clearance by the spleen occurred. Typical of the former type of antibody was IgM anti-A or -B and typical of the latter was IgG anti-D.

Some important studies on the effect of blood group incompatibility on the immune response were reported by STERN et al.¹⁵⁷. These authors showed that ABO-compatible Rh-positive red cells were much more likely to result in an anti-D response when injected into Rh-negative recipients than were ABO-incompatible cells. Furthermore, when Rh-positive cells were coated in vitro with IgG anti-D and injected into Rh-negative subjects, no detectable anti-D response occurred.

The clinical evidence of the effect of ABO incompatibility on Rh immunisation and the above experiments of STERN and his colleagues were the starting point of the studies carried out in Liverpool. These experiments have been described in detail^{42,55}. Initially the aim was to use the agglutinating (IgM) type of anti-D in the attempt to prevent injected Rh-positive blood from inducing immunity. Later, plasma containing mainly incomplete (IgG) anti-D was used and this was successful in prevent-

prevenire l'immunizzazione delle madri Rh negative da parte delle emazie fetali Rh positive. Una serie di progressi in differenti campi di ricerca durante gli anni '50 ha posto le basi per affrontare su base immunologica, tale problema, che oggi si può considerare in gran parte risolto. Gli studi di MOLLISON^{118,119}, di JANDL e Coll.⁸⁴ hanno permesso di comprendere meglio l'effetto dei diversi tipi di anticorpi sulla sopravvivenza degli eritrociti incompatibili e il meccanismo della loro scomparsa dal circolo. È stato dimostrato che, quando per azione di certi tipi di anticorpi si avevano danni molto gravi per i globuli rossi, questi ultimi venivano eliminati dal circolo con molta rapidità, soprattutto ad opera del fegato. Quando i danni erano meno gravi, la distruzione dei globuli rossi aveva luogo nella milza ad un ritmo molto più lento. Gli anticorpi del primo tipo sono rappresentati tipicamente dalle IgM anti-A o anti-B, mentre quelli del secondo tipo dalle IgG anti-D.

Alcuni importanti studi riguardanti l'effetto che l'incompatibilità per i gruppi sanguigni ha sulla risposta immune sono stati riferiti da STERN e Coll.¹⁵⁷. Questi AA. hanno dimostrato che una rapida risposta anti-D era molto più attendibile per le emazie Rh positive ABO compatibili iniettate in un ricevente Rh negativo che non per le emazie ABO incompatibili. Inoltre, quando cellule Rh positive sono rivestite *in vitro* con IgG anti-D e iniettate in un soggetto Rh negativo, non si riesce a mettere in evidenza alcun tipo di risposta anti-D.

Le evidenze cliniche dell'effetto dell'incompatibilità ABO sull'immunizzazione Rh ed i sopra ricordati esperimenti di STERN e Coll. hanno rappresentato il punto di partenza degli studi condotti a Liverpool. Questi esperimenti sono stati dettagliatamente descritti^{42,55}. Inizialmente, il proposito era quello di usare anticorpi agglutinanti anti-D (IgM) nel tentativo di prevenire la risposta immune alla trasfusione di sangue Rh positivo. In seguito fu impiegato plasma che conteneva per lo

ing experimental Rh immunisation in male volunteers. A group in New York followed these studies with a similar series of experiments on volunteers but used the IgG gammaglobulin fraction of anti-D plasma. They also were able to show that Rh immunisation was preventable by administering anti-D passively at approximately the same time as the stimulus of Rh-positive cells^{59,60}.

Clinical application

Very shortly after the results of this experimental work became available it was decided to initiate clinical trials using anti-D gammaglobulin (IgG). On the basis a) that it was believed that the primary stimulus of Rh-positive foetal red cells enters the maternal circulation late in pregnancy or during labour in the majority of cases and b) that it was certainly safe to administer anti-D after delivery but might not be justified during pregnancy, it was decided to try the effects of administering anti-D to Rh-negative women immediately after the delivery of Rh-positive infants. The main questions posed in these trials were: 1) was the anti-D effective in preventing the development of anti-D by the mother?; 2) if so, in what percentage of cases was this achieved?; 3) what dosage of anti-D was required?; 4) would any adverse effects occur?; 5) was the immunosuppressive effect of anti-D specific for the D antigen?

One important consideration was the criterion to be used for assessing the immune response by the mother. The account of the natural history of Rh immunisation given previously shows that the effects of a primary stimulus at the end of a particular Rh-positive pregnancy may be the development of antibody during the subsequent Rh-positive pregnancy. Therefore it was necessary to

più anticorpi incompleti anti-D (IgG) per prevenire l'immunizzazione Rh in volontari maschi trasfusi sperimentalmente con sangue Rh positivo. Un gruppo di New York ripeté questi studi con una serie molto simile di esperimenti, servendosi però di IgG isolate da sieri anti-D. Essi furono anche in grado di dimostrare che l'immunizzazione Rh poteva essere prevenuta somministrando passivamente anticorpi anti-D quasi contemporaneamente alle cellule Rh positive^{59,60}.

Applicazioni cliniche

Non appena si resero disponibili i risultati di questo lavoro sperimentale, si decise di dar luogo ad esperimenti clinici impiegando gammaglobuline IgG anti-D. Basandosi sul fatto a) che si riteneva che lo stimolo sensibilizzante nella maggior parte dei casi fosse dovuto al passaggio di emazie fetali nel circolo materno negli ultimi tempi della gravidanza o durante il parto e b) che la somministrazione di anti-D dopo il parto non presentava alcun rischio, mentre poteva non essere giustificata durante la gravidanza, si decise di provare gli effetti della somministrazione di anti-D a donne Rh negative immediatamente dopo il parto di un figlio Rh positivo. I più importanti problemi che venivano affrontati in questi tentativi erano: 1) erano in grado gli anticorpi anti-D di impedire la formazione di anti-D da parte della madre?; 2) se così fosse, in quale percentuale di casi ciò avveniva?; 3) quale dose di anti-D si doveva usare?; 4) non si aveva alcun effetto negativo collaterale?; 5) l'effetto immunosoppressivo era specifico per gli antigeni D?

È però importante fare alcune considerazioni sul criterio da adottare per la valutazione della risposta immune nella madre. Considerando la già descritta evoluzione naturale dell'immunizzazione anti Rh, è chiaro che l'effetto della sensibilizzazione, conseguente allo stimolo primario intervenuto alla fine di una data gravidanza Rh positiva, può essere rappresentato dalla formazione di

test treated and control mothers some months after delivery and also at the end of the subsequent Rh-positive pregnancy.

There has been some variation in the details of the clinical trials carried out in different centres. In Liverpool the mothers were primiparous and had just delivered an Rh-positive ABO-compatible infant. In the first trial, high-risk cases were chosen by selecting mothers who showed approximately 0.2 ml or more of circulating Rh-positive foetal blood after delivery and alternate cases were given approximately 1,000 µg anti-D gammaglobulin intramuscularly. In a second trial mothers not fulfilling this criterion were included and 200 µg anti-D was used. Other centres have included multiparae and ABO-incompatible pregnancies in their trials. In addition to the controlled trials, results are available on the effects of treating large numbers of Rh-negative mothers without untreated controls being studied as well.

Results of clinical trials

Tabs 4 and 5 document the available data on the chief clinical trials which have been carried out. The heterogeneity of these data must be stressed because of differences in selection of patients for the trials and differences in dosage of anti-D used. It is, for example, difficult to compare the various results for the incidence of antibodies in the control groups.

The overall incidence of anti-D a few months after delivery in treated mothers is approximately 0.5 %. Whether this figure differs significantly between primiparous and multiparous mothers is uncertain as there are insufficient data

anticorpi durante una successiva gravidanza dello stesso tipo. Si è reso perciò necessario esaminare alcuni mesi dopo il parto e alla fine della successiva gravidanza Rh positiva sia le madri che erano state sottoposte al trattamento sia quelle che erano servite da controllo.

Vi è però stata qualche divergenza tra gli esperimenti clinici effettuati in Centri diversi. A Liverpool, il trattamento venne eseguito su madri primipare che avevano appena partorito un figlio Rh positivo ABO compatibile. Nel primo tentativo si scelsero casi che presentavano rischi elevati; si selezionarono le madri che dopo il parto avevano presentato 0,2 ml o più di sangue fetale Rh positivo in circolo e a metà di queste, alternativamente, furono somministrati per via intramuscolare 1.000 µg di gammaglobuline con attività anti-D. Nel secondo esperimento questo criterio limitante non venne più seguito e la dose di anti-D fu abbassata a 200 µg. Altri Centri hanno sottoposto al trattamento anche madri multipare o con gravidanze ABO incompatibili. L'efficacia del trattamento, oltre che da un confronto diretto con i controlli, costituiti da madri a cui non furono somministrati anti-D, può essere valutata considerando in generale gli effetti del trattamento sulle gravidanze successive in un numero molto grande di madri Rh negative.

Risultati degli esperimenti clinici

I risultati dei principali esperimenti sono riportati nelle tabb. 4 e 5. I diversi criteri adottati per la scelta delle pazienti e per l'impiego di differenti dosi di anti-D hanno portato ad una notevole eterogeneità in questi dati, così, per esempio, è difficile poter paragonare i vari risultati riguardanti l'incidenza di anticorpi nei gruppi di controllo.

Nelle madri sottoposte al trattamento, l'incidenza di anti-D pochi mesi dopo il parto era di circa lo 0,5 %. Non esistono dati sufficienti per stabilire se le frequenze osservate differiscano significativamente tra le madri primipare e le

analysed from this point of view. The incidence of anti-D at the end of the Rh-positive pregnancy subsequent to treatment appears to be of the order of 2 %.

Apparent differences between the various centres may be due to two main factors. Firstly, there may have been differences in the selection of cases. The report from Canada which showed no instance of detectable antibodies six months after treatment is notable. It is this group which reports a relatively high incidence of antibodies at the end of the first Rh-positive pregnancy and this may have resulted in a certain selection of cases for the trial. Secondly, the sensitivity of tests used for detecting

multipare. Alla fine della gravidanza Rh positiva successiva al trattamento si ha un'incidenza di anti-D dell'ordine del 2 %.

Due possono essere i fattori principali che determinano le differenze tra i dati dei diversi Centri: il primo è rappresentato dal diverso criterio adottato nella scelta dei casi: sono indicativi a tale proposito i dati provenienti dal Canada, che mettono in evidenza l'assenza di anticorpi evidenziabili 6 mesi dopo il trattamento; questo gruppo infatti indicava un'incidenza particolarmente alta di anticorpi alla fine della prima gravidanza Rh positiva e ciò può aver determinato una particolare selezione dei casi scelti

centre	controls			treated		
	no.	anti-D present	% with anti-D	no.	anti-D present	% with anti-D
Liverpool group						
1,000 µg trial	176	38	21.6	173	1	0.58
200 µg trial	362	13	3.6	353	0	0.0
U.S.A. (RhoGAM) (138)	1,476	102	6.9	3,389	6	0.18
West Germany (154)	2,458	96	3.9	3,091	15 *	0.49
Holland (21)	329	17	5.2	1,638	6	0.31
Finland (54)						
ABO-compatible	792	34	4.3	2,752	4	0.15
ABO-incompatible	220	1	0.5	924	4	0.43
Sweden (10)	388	17	4.3	1,578	11 *	0.70
West Canada (40)	500	36	7.2	1,216	0	0.0
Ministry of health (England and Wales) (113)	—	—	—	5,693	26	0.46
Australia (51)	—	—	—	3,307	21	0.64
Edmonton (Canada) (31)	—	—	—	574	3	0.52

* some of these are thought to be passive antibody

* alcuni di questi sono considerati anticorpi passivi

Table 4 - Results of clinical trials of anti-D gammaglobulin: tests for antibody in post-delivery period. (There is considerable heterogeneity in regard to selection of cases and in the dosage of anti-D used).

Risultati degli esperimenti con gammaglobuline anti-D: tests per l'anticorpo nel periodo successivo al parto. (Esiste una considerevole eterogeneità per quanto riguarda la scelta dei casi ed il dosaggio dell'anti-D impiegato).

centre	controls			treated		
	no.	anti-D present	% with anti-D	no.	anti-D present	% with anti-D
Liverpool group						
1,000 µg trial	62	19	30.6	83	2	2.4
200 µg trial	99	10	10.1	99	3	3.0
U.S.A. (RhoGAM) (138)	178	23	12.9	395	5	1.3
West Germany (154)	373	29	7.8	138	0	0.0
Holland (21)	—	—	—	98	2	2.0
Australia (51)	—	—	—	452	3	0.7

Table 5 - Results of clinical trials of anti-D gammaglobulin: tests for antibody at the end of the subsequent Rh-positive pregnancy.

Risultati delle sperimentazioni cliniche con gammaglobulina anti-D: i tests per l'anticorpo sono stati praticati alla fine della successiva gravidanza Rh positiva.

antibodies has probably varied considerably between different centres.

In order to measure the success rate of the preventive therapy it is appropriate to express the incidence of antibodies in the treated mothers as a percentage of that in a control series or of that which can be reasonably expected for the particular group of treated mothers. Tab. 6 gives the available data and the figures suggest that as measured by antibody tests approximately six months after treatment, there is a 95 % rate of success. There are in general insufficient data to construct a similar table based on results of testing at the end of the subsequent Rh-positive pregnancy. In Liverpool, for the selected mothers treated with 1,000 µg anti-D, the incidence of antibodies at the end of the second Rh-positive pregnancy is 7.3 % of the control figure. On the other hand, for the mothers who showed no foetal blood or less than an estimated 0.2 ml, and who were treated with 200 µg anti-D, the incidence of antibodies at the end of the second pregnancy is 22.8 % of that in control. It is unlikely that the

per l'esperimento. Il secondo fattore è rappresentato dalla sensibilità dei metodi usati per riconoscere gli anticorpi: tale sensibilità con ogni probabilità varia considerevolmente tra un Centro e l'altro.

Volendo misurare quantitativamente l'efficacia della terapia preventiva, si può correttamente esprimere l'incidenza di anticorpi nelle madri sottoposte al trattamento come percentuale o dell'incidenza riscontrata nei gruppi di controllo o di quel che ci si può ragionevolmente attendere per quel dato gruppo di madri. I risultati sono elencati nella tab. 6. Accettando come dato indicativo per la valutazione l'incidenza di anticorpi 6 mesi dopo il trattamento, si può ricavare dai dati una percentuale di successi del 95 %. Non vi sono in genere dati sufficienti per compilare una tabella simile valutando l'incidenza di anticorpi alla fine della seconda gravidanza. A Liverpool, nelle madri trattate con 1.000 µg di anti-D, l'incidenza di anticorpi al termine della seconda gravidanza Rh positiva era pari al 7,3 % rispetto a quella riscontrata nei controlli. D'altra parte, l'incidenza era del 22,8 % rispetto ai controlli nelle madri che non avevano presentato sangue fetale in circolo, o comunque solo in una misura inferiore a

greater apparent failure rate in the latter group is a simple question of dosage, because the mothers who developed anti-D in spite of treatment had either no foetal blood or an extremely small amount circulating at the time the anti-D was given. It may well be, therefore, that the process of immunisation had already started by the time delivery occurred and treatment was administered.

Some support for this comes from the findings in the Australian and Scottish trials^{51,148} that in a high proportion of mothers who became immunised in spite of treatment, the count of foetal cells just before treatment was either zero or very low.

0,2 ml, e che erano state trattate con 200 µg di anti-D. È improbabile che questa minore efficacia sia dovuta semplicemente ad un problema di dosaggio, in quanto al momento del trattamento con l'anti-D le madri presentavano in circolo solo piccole quantità di sangue fetale o non ne presentavano affatto; più probabilmente, il processo di immunizzazione era già iniziato prima del parto, momento in cui fu eseguito il trattamento.

Dati a favore di questa ipotesi provengono da studi di AA. australiani e scozzesi^{51,148}, in cui un'alta percentuale di madri che avevano formato anticorpi nonostante il trattamento con anti-D, non avevano presentato, prima del trattamento, sangue fetale in circolo, o nella quale il sangue fetale era presente in quantità molto basse.

	incidence of anti-D (%)	relative incidence (%) *
Liverpool group **		
1,000 µg trial	0.5	2.4
200 µg trial	0.3	5.8
U.S.A. (RhoGAM)	0.18	2.6
West Germany	0.49	12.5 ***
Holland	0.31	6.0
Finland (ABO-compatible)	0.15	3.5

* *the incidence of anti-D in treated mothers as a percentage of that in a control series*

* *l'incidenza dell'anti-D nelle madri trattate è espressa come percentuale di quella dei controlli*

** *for these calculations treated and untreated mothers not in the strictly controlled trial are included*

** *per questi calcoli sono state considerate madri trattate e non trattate, non obbligatoriamente incluse nella sperimentazione controllata*

*** *some of the antibodies found were probably passive and therefore this figure is probably too high*

*** *alcuni degli anticorpi riscontrati erano probabilmente anticorpi passivi, per cui questo valore è forse troppo elevato*

Table 6 - *Results of clinical trials: incidence of anti-D in post-delivery period after treatment in relation to controls. (These particular data were chosen for analysis because the control series were suitable).*

Risultati delle sperimentazioni cliniche: incidenza, dopo trattamento, dell'anti-D nel periodo successivo al parto, in confronto con quella di soggetti di controllo. (Questi particolari dati sono stati scelti per l'analisi, affinché la serie di controllo fosse appropriata).

COMMENT

Present evidence suggests that, in general, anti-D gammaglobulin given intramuscularly after delivery prevents the development of anti-D in about 95 % of mothers as judged by tests in the post-delivery period and in perhaps 85 to 90 % of mothers as judged by tests at the end of the subsequent Rh-positive pregnancy.

There is one possible qualification in relation to the results of tests for antibodies developing during the pregnancy subsequent to treatment. If it is true that some instances in which anti-D appears during the first Rh-positive pregnancy are the result of a primary response during that pregnancy, then it is also possible that a similar primary response with the appearance of antibodies may occur very occasionally during a second or later pregnancy. It is therefore possible that some of the mothers who develop antibodies during a pregnancy in spite of anti-D having been administered after the previous one, may fall into this category and are thus not true instances of failure of prophylaxis. In other words, it may not be possible by this method to prevent completely the appearance of antibodies in the subsequent pregnancy. In regard to this, there is no evidence that a state of tolerance to Rh antigens results from the administration of anti-D gammaglobulin; the administered anti-D prevents the immune response to Rh-positive red cells present at the time but not to a subsequent stimulus of red cells.

Theoretically, the two chief reasons for failure are: 1) an insufficient dose of anti-D, and 2) treatment that is too late, the primary process of immunisation having already developed, even though antibody is not detectable in the mother at the time of treatment. The first problem is relatively simple and is discussed below in relation to the question of dosage. The evidence for the second possibility has been presented above.

COMMENTO

L'efficacia del trattamento per via intramuscolare con gammaglobuline anti-D nel prevenire la formazione di anticorpi risulta quindi essere del 95 % se essa viene giudicata in base agli esami eseguiti nel periodo successivo al parto, forse dell'85-90 % sulla base degli esami al termine della successiva gravidanza Rh positiva.

Vi è una spiegazione possibile per la comparsa di anticorpi durante la gravidanza successiva al trattamento. Come si è visto, in alcuni casi durante la prima gravidanza Rh positiva si ha formazione di anticorpi anti-D in risposta primaria, occasionalmente può quindi accadere che tale risposta primaria con formazione di anticorpi avvenga anche durante la seconda o una delle successive gravidanze. È quindi possibile che alcune delle madri, che nonostante il trattamento con anti-D dopo la precedente gravidanza formano anticorpi in gravidanza, rientrano in questa categoria e che quindi in realtà non esista un fallimento della profilassi. In altre parole, questo metodo non permette di prevenire in modo totale la comparsa di anticorpi nella gravidanza successiva. A tale proposito, non vi è alcuna prova che la somministrazione di gammaglobuline anti-D determini uno stato di tolleranza verso gli antigeni Rh; gli anticorpi anti-D impediscono la risposta immune agli eritrociti Rh positivi presenti al momento della somministrazione, ma non ad uno stimolo successivo.

In linea teorica, i due motivi principali dell'insuccesso possono essere: 1) una dose insufficiente di anti-D, e 2) un trattamento eseguito troppo tardi, cioè quando, sebbene non siano ancora evidenziabili anticorpi nella madre, il processo di immunizzazione sia già iniziato. Il primo problema è relativamente semplice e sarà discusso più avanti in rapporto al problema del dosaggio. Della seconda possibilità e degli elementi a suo favore si è già discusso.

There may be other causes for failure of treatment. It may be that occasionally the anti-D is not well absorbed from the site of intramuscular injection. There are reports of mothers developing anti-D in spite of treatment, to whom ordinary pooled gammaglobulin has been administered early in the pregnancy concerned as prophylaxis against rubella. At present there is no proof that this is a real association.

Timing of treatment

It is the usual practice to aim at giving anti-D gammaglobulin within 72 hrs of delivery. It is not known exactly how long treatment may be delayed without increasing the risk of failure.

Reactions in the mother

Only very mild, local reactions at the site of injection appear to occur in mothers given the gammaglobulin in spite of the fact that many tens of thousands of doses have now been administered throughout the world; no case of infective hepatitis has been reported.

Tests for the development of anti-gammaglobulin antibodies in the mothers have been carried out and the evidence is that when tested six months after the injection, mothers do not show any increase in the incidence of such antibodies¹⁵⁹.

The detection of active immunity

From the earliest days of the clinical trials difficulty has arisen in differentiating with certainty the development of an active immune response in the mother from the presence of residual passive antibody. The more sensitive the methods used for detecting anti-D, the more likely is this problem to arise. Thus, when sensitive enzyme methods or the AutoAnalyser are used, passive antibody may be detectable for more than six months after treatment. Such passive antibody eventually disappears and this is usually accepted as evidence that no active immunity has occurred. However, GODEL et al.⁶³ have described the

Vi possono essere altre cause di insuccesso. Per esempio, a volte può non avvenire un buon assorbimento dell'anti-D nel luogo dell'iniezione intramuscolare. Ancora, è stato riportato che formavano anti-D, nonostante il trattamento, madri che all'inizio della gravidanza avevano ricevuto le gammaglobuline del commercio come profilassi contro la rubella: tuttavia per ora non esiste alcuna prova che si tratti di una vera associazione.

Periodo del trattamento

Le gammaglobuline anti-D sono usualmente somministrate entro 72 h dal parto. Non si sa di quanto si possa rimandare il trattamento senza aumentare il rischio di insuccesso.

Reazioni nella madre

Le madri che hanno ricevuto le gammaglobuline presentano solo debole reazione locale nel punto in cui è stata praticata l'iniezione; sebbene in ogni parte del mondo siano state somministrate molte decine di migliaia di dosi, non si è riscontrato alcun caso di epatite virale.

È stata studiata la formazione di anticorpi anti-gammaglobuline nelle madri. Sei mesi dopo l'iniezione le madri non mostrano alcun aumento nell'incidenza di tali anticorpi¹⁵⁹.

Ricerca dell'immunità attiva

Fin dai primi tempi in cui si iniziarono gli esperimenti clinici sorse la difficoltà di distinguere con sicurezza la comparsa di una risposta immune attiva dalla presenza di anticorpi passivi residui. Più sensibile è il metodo di ricerca dell'anti-D, più è probabile che si presenti il problema. Così, qualora si impieghino i sensibili metodi enzimatici o l'AutoAnalyser, gli anticorpi passivi possono essere ritrovati per più di 6 mesi dopo il trattamento. Tali anticorpi passivi infine scompaiono e questa comunemente è considerata la prova che non si è determinata un'immunità attiva. D'altra parte, GODEL e Coll.⁶³ hanno descritto

development of weak antibody responses in controls, the tests subsequently becoming negative. It is likely that this phenomenon represents a weak IgM anti-D response. There may, therefore, be a remaining doubt in some cases as to whether or not a treated mother has herself developed anti-D and this reinforces the importance of testing the mother during the subsequent Rh-positive pregnancy.

The general problem of dosage

The evidence suggests that a dose of 200 µg anti-D gammaglobulin is effective in preventing immunisation in the great majority of cases. Where an appreciable volume of Rh-positive blood is present in the maternal circulation, it appears most likely on theoretical grounds that the required dose of anti-D must bear some direct relationship to this. BORST-EILERS²¹ has suggested that 200 µg anti-D would protect against immunisation by foeto-maternal transfusions up to 20-25 ml and this volume is exceeded in only approximately 0.5% of pregnancies. The occasional mother who has larger amounts of circulating foetal blood at term will require larger amounts of anti-D. This raises a difficult practical problem because in order to detect such mothers, it is necessary to perform routine tests for foetal cells. Some centres have been able to organise this, but it is doubtful whether this will be practicable in all areas. A possible solution is for the acid-elution method to be applied to each maternal sample and counts of foetal cells are performed only where it is obvious from a brief scan of the slides that a large foeto-maternal transfusion has occurred.

The observation in experimental immunological and other studies that the immune response to an antigen may be enhanced in the presence of small amounts of antibody raises the question of whether this could happen in the Rh system. In fact, there is no evidence at

anche nei controlli la formazione transitoria di anticorpi a basso titolo. È probabile che si tratti di una debole risposta anti-D dovuta ad anticorpi della classe IgM. In alcuni casi può tuttavia rimanere qualche dubbio se una madre sottoposta a trattamento abbia o meno formato da se stessa anticorpi anti-D: ne risulta quindi l'importanza di esaminare la madre durante la successiva gravidanza Rh positiva.

Il problema generale del dosaggio

Nella grande maggioranza dei casi, una dose di 200 µg di gammaglobuline anti-D è sufficiente per prevenire l'immunizzazione. Quando è notevole il volume di sangue Rh positivo nel circolo materno è probabile, almeno in via teorica, che la dose necessaria di anti-D sia in rapporto diretto con tale volume. BORST-EILERS²¹ ritiene che 200 µg di anti-D proteggano dall'immunizzazione sino al passaggio dal feto alla madre di una quantità di sangue di 20-25 ml; questo volume è superato solamente in circa lo 0,5% delle gravidanze. Una maggior quantità di anti-D sarà necessaria per quella madre che al termine della gravidanza presentasse un più elevato volume di sangue fetale circolante. Questo fatto crea un grave problema pratico, in quanto per riconoscere tali madri è necessario eseguire i tests routinari per la ricerca delle emazie fetali. Alcuni Centri sono in grado di organizzare tale ricerca, ma è difficile che ciò possa essere fatto dappertutto. Una soluzione di compromesso potrebbe essere rappresentata dall'applicazione del metodo di eluizione acida a tutti i campioni di sangue materno, ma eseguendo la conta delle cellule fetali solo su quei campioni in cui da un rapido esame dei vetrini è risultato abbondante passaggio di sangue dal feto alla madre.

L'osservazione dell'immunologia sperimentale che la risposta ad un antigene può essere rafforzata dalla presenza di piccole quantità di anticorpi specifici solleva la questione se ciò accada anche nel sistema Rh. In effetti, al momento non vi sono prove che ciò avvenga con

present that this occurs with IgG anti-D. MOLLISON *et al.*¹²¹ gave 15 µg anti-D with 1 ml Rh-positive red cells and found no evidence of an enhanced antibody response. JOUVENCEAUX⁸⁹ administered 15 µg anti-D and 5 ml Rh-positive blood to 14 volunteers and none had detectable antibody six months later, again providing evidence that relatively small doses of anti-D do not enhance the immune response.

Treatment during pregnancy

The possibility that anti-D gamma-globulin might have to be administered in the ante-natal period has had to be considered for three reasons: a) foeto-maternal transfusion is known to occur during pregnancy and particularly in the third trimester; b) antibodies are sometimes found at the end of the first Rh-positive pregnancy in the absence of any history of prior transfusion or abortion. There is a possibility that at least some of these cases represent a primary response during this first pregnancy; c) there is a small failure rate when anti-D is administered after delivery.

Because of these considerations certain groups have initiated programmes in which anti-D is administered during the third trimester^{31,40,188}. Preliminary experiments were carried out by ZIPURSKY and ISRAELS¹⁸⁸ to determine the possible deleterious effects on the foetus and they concluded that it was very unlikely that any harm would result from administering the usual range of anti-D gammaglobulin to the mother. The published results of administering anti-D at this time are as yet insufficient to draw any firm conclusions. It has been reported that there is at least one mother who has developed anti-D in the post-partum period. It will take an extremely large series of cases to show that the overall failure rate using this approach is less than that found when anti-D is given after delivery.

le IgG anti-D. MOLLISON e Coll.¹²¹ iniettarono 15 µg di anti-D in associazione con 1 ml di emazie Rh positive e non rinvennero prove di una più valida risposta immune. JOUVENCEAUX⁸⁹ somministrò 15 µg di anti-D con 5 ml di sangue Rh positivo a 14 volontari: 6 mesi più tardi in nessuno di questi si potevano mettere in evidenza anticorpi, dimostrando così ancora una volta che dosi relativamente piccole di anti-D non rafforzano la risposta immune.

Trattamento in corso di gravidanza

Si deve prendere in considerazione la possibilità di somministrare le gammaglobuline anti-D, nel periodo prenatale, principalmente per 3 motivi: a) è noto che il passaggio di sangue dal feto alla madre può avvenire durante la gravidanza, particolarmente nel terzo trimestre; b) talvolta si ritrovano anticorpi al termine della prima gravidanza Rh positiva senza precedenti di trasfusioni o aborti. Almeno alcuni di questi casi rappresenterebbero l'effetto di una risposta primaria durante la prima gravidanza; c) quando l'anti-D è somministrato dopo il parto, vi è una certa percentuale di insuccessi.

Date tali premesse, alcuni gruppi hanno iniziato dei programmi di somministrazione dell'anti-D nel terzo trimestre di gravidanza^{31,40,188}. ZIPURSKY e ISRAELS¹⁸⁸, effettuarono esperimenti preliminari per stabilire l'eventualità di un danno fetale, la loro conclusione fu che era molto improbabile che le normali dosi di gammaglobuline anti-D impiegate potessero provocare qualche danno fetale. I risultati pubblicati riguardanti la somministrazione di anti-D in questo periodo sono ancora troppo scarsi per permettere una conclusione definitiva. È stato riferito dell'esistenza di almeno una madre che ha sviluppato anticorpi anti-D dopo il parto. Sarà necessario poter disporre di una serie molto numerosa di casi per dimostrare che l'impiego di questo sistema dà luogo ad una percentuale di insuccessi minore di quella ottenuta praticando l'iniezione di anti-D subito dopo il parto.

From the practical point of view there must be considerable doubt as to whether this method of treatment will become routine practice. The total requirements for anti-D gammaglobulin would be much increased because more is being given to each mother and, in addition, mothers carrying Rh-negative babies would have to be treated as well.

Treatment of immunised women

All the theoretical evidence suggests that once detectable antibody is present in a mother's serum, passive immunisation with anti-D can have no appreciable effect. One report is of interest in this respect. GODEL et al.⁶³ administered either 145 µg or 435 µg anti-D to 15 mothers who had very weak anti-D at delivery. Only 1 out of 13 mothers tested six months later still had detectable anti-D. In the control series of 9 mothers, 5 still had anti-D six months later. The authors' suggestion that the immune response in the mother might only have developed to the stage of a weak IgM response, which itself is usually transient, and that the administration of anti-D might have prevented the further maturation of the response which would have led to the development of IgG antibodies, seems quite possible. Theoretically, if this is a true explanation, there might be no memory cells developing and anti-D would not be expected to develop in the subsequent pregnancy. This type of situation seems worth exploring further.

Specificity of immunosuppression

There is no reported evidence proving whether or not anti-D specifically prevents the immune anti-D response only, or whether it prevents the development of antibodies to other antigenic determinants on the foetal red cells in addition. The evidence from general immunological studies suggests that the suppression should be antigen-specific.

Da un punto di vista pratico esistono molti dubbi per quanto riguarda una possibile realizzazione di routine di questo metodo. La richiesta globale di gammaglobuline anti-D aumenterebbe molto, poiché sarebbe necessario somministrarne una quantità maggiore ad ogni madre e, inoltre, nello stesso modo dovrebbero essere trattate le madri con bambini Rh negativi.

Trattamento delle donne immunizzate

Tutte le prove indicano che, teoricamente, una volta che anticorpi anti-D siano presenti nel siero di una madre, l'immunizzazione passiva con anti-D non ha più effetti apprezzabili. Un solo studio a tale proposito è di un certo interesse. GODEL e Coll.⁶³ somministrarono 145 µg o 435 µg di anti-D a 15 madri che al momento del parto presentavano anticorpi anti-D molto deboli. Soltanto in una delle 13 madri esaminate 6 mesi dopo fu possibile riscontrare la presenza di anticorpi anti-D. Nella serie di controllo, 5 madri su 9 presentavano ancora anticorpi a distanza di 6 mesi. Pare verosimile l'opinione degli AA. che la risposta immune nella madre poteva essersi sviluppata solo sino allo stadio di una debole risposta IgM, che di per se stessa è usualmente transitoria, e che la somministrazione di anti-D aveva impedito l'ulteriore evoluzione della risposta, che avrebbe dovuto portare alla formazione di anticorpi della classe IgG. In teoria, se questa spiegazione è vera, non dovrebbero essersi formate cellule memoria e non si dovrebbe formare anti-D nella gravidanza successiva. Una situazione di questo tipo merita comunque di essere ulteriormente studiata.

Specificità dell'immunosoppressione

Non sono state pubblicate prove se l'anti-D prevenga specificatamente soltanto la risposta immune anti-D, oppure se impedisce anche la formazione di anticorpi diretti verso altri determinanti antigenici degli eritrociti fetali. I dati degli studi di immunologia generale suggeriscono che la soppressione sia specifica per l'antigene. Quando si ricercano

When looking for evidence relating to this problem it is important to take into account the serological specificity of the gammaglobulin preparation used as quite often specificities other than anti-D are present. In any case this is not going to be an easy problem to answer as the incidence of other antibodies is very much lower than that of anti-D, and a large series of treated and control patients will be required to give significant results.

The problem of large transplacental haemorrhage or Rh-incompatible transfusion

In Liverpool, four mothers with transplacental haemorrhage amounting to more than 100 ml foetal blood have been encountered in 3,600 deliveries. There are now several reports of attempts to prevent immunisation in this type of situation^{23, 53, 79, 178}. There is now general agreement that a minimum of 100 µg anti-D is required for each 10 ml of Rh-positive blood^{21, 23, 79}.

The administration of large amounts of anti-D has been used in cases of Rh-incompatible transfusion^{21, 79, 178}. JOUVENCEAUX⁸⁸, and EKLUND and NEVANLINNA⁵⁴ have described the successful administration of anti-D intravenously to prevent such immunisation. Occasional febrile reactions have resulted but no serious problems have arisen and in particular no evidence of renal damage was reported.

A case has been documented in which an Rh-negative patient was transfused with 1,000 ml of Rh-positive blood⁹⁰. Anti-D gammaglobulin was given in repeated doses every 12 hrs for 8 days, the total dose being 17,700 µg. The Rh-positive blood was cleared in 8 days, but in spite of this there was no reaction in the patient and no evidence of renal damage. It seems likely that when blood is removed by an incomplete, non-complement-fixing antibody, there is no risk of renal complications.

prove a tale proposito si deve però tenere presente che la preparazione di gammaglobuline usata presenta spesso altre specificità oltre all'anti-D. In ogni modo non è facile rispondere a questo problema, in quanto l'incidenza degli altri anticorpi è molto più bassa rispetto a quella dell'anti-D; inoltre, per avere risultati significativi, è necessario disporre di un grande numero di madri sottoposte e non sottoposte al trattamento.

Il problema delle abbondanti emorragie transplacentari e delle trasfusioni di sangue Rh incompatibile

A Liverpool, su 3.600 parti si sono trovate 4 madri che avevano avuto una emorragia transplacentare superiore ai 100 ml di sangue fetale. Sono stati resi noti numerosi tentativi per impedire l'immunizzazione in questi casi^{23, 53, 79, 178}. In genere ora si ritiene che siano necessari almeno 100 µg di anti-D ogni 10 ml di sangue fetale Rh positivo^{21, 23, 79}.

La somministrazione di grandi quantità di anti-D è stata impiegata in caso di trasfusioni Rh incompatibili^{21, 79, 178}. JOUVENCEAUX⁸⁸, EKLUND e NEVANLINNA⁵⁴ hanno riferito di essersi serviti con successo della somministrazione endovenosa di anti-D per prevenire tale immunizzazione. Talvolta possono aversi reazioni febbrili, ma in genere non si hanno gravi problemi ed in particolare non è nota alcuna prova di danno a carico dei reni.

È stato reso noto un caso in cui un paziente Rh negativo era stato trasfuso con 1.000 ml di sangue Rh positivo⁹⁰. In questo caso venne impiegato un totale di 17.700 µg di gammaglobuline anti-D suddiviso in varie dosi somministrate ogni 12 ore per 8 giorni. Le emazie Rh positive sparirono dal circolo nel giro di 8 giorni, e ciononostante non si ebbe alcun danno renale. Pare probabile che non vi sia alcun rischio di complicazioni renali quando le emazie sono rimosse ad opera di anticorpi incompleti, incapaci di fissare il complemento.

BÖRNER *et al.*²⁰ carried out experiments using anti-D gammaglobulin prepared by DEAE-Sephadex for intravenous use. They injected 200 µg anti-D intravenously 30 min after 1 ml of Rh-positive cells and the half-time was found to be 3-6 hrs. JOUVENCEAUX⁸⁹ compared the levels in the plasma of labelled gammaglobulin after intravenous and intramuscular injection. He found that it took five days after intramuscular injection to attain the plasma levels achieved instantaneously when the intravenous route was used, but seven days after the injections the level was the same for both. He found that $t_{\frac{1}{2}}$ was 45 min and complete clearance took 6 hrs when anti-D was given intravenously after Rh-positive blood. For intramuscular anti-D, $t_{\frac{1}{2}}$ was 5 hrs with complete clearance in 48 hrs. A protection experiment was carried out in which 5 ml of Rh-positive blood was given to 14 volunteers and 2 hrs later 6 of these received 15 µg anti-D intramuscularly and 8 received this dose intravenously. Tests for antibodies five months later were negative in all the volunteers, but five months after a further injection of 2 ml Rh-positive blood, 4 of the 6 given intramuscular anti-D were immunised and none of those given intravenous anti-D showed antibody.

The aim of BÖRNER *et al.*¹⁹ was to vary the dose of anti-D given intravenously according to the amount of foetal blood found in the mother. This approach appears to have been very successful as judged by the results of clinical application in Hannover and Hamburg¹⁸. Of 3,695 mothers treated in this way only one is reported to have developed anti-D a few months later.

BÖRNER e Coll.²⁰ eseguirono degli esperimenti usando per via endovenosa gammaglobuline anti-D preparate su DEAE-Sephadex. Essi iniettarono endovena 200 µg di anti-D 30 min dopo aver iniettato 1 ml di emazie Rh positive e trovarono che dopo 3-6 h metà delle emazie erano scomparse. JOUVENCEAUX⁸⁹ confrontò i livelli plasmatici di gammaglobuline marcate dopo somministrazione endovenosa e intramuscolare. Sono necessari 5 giorni dopo l'iniezione intramuscolare per raggiungere il livello plasmatico che la via endovenosa permette di raggiungere immediatamente, ma 7 giorni dopo le iniezioni si ha lo stesso livello in tutti e due i casi. Inoltre JOUVENCEAUX trovò che quando l'anti-D era somministrato per via endovenosa, dopo una trasfusione di emazie Rh positive, il tempo di dimezzamento era di 45 min mentre la scomparsa completa delle emazie si aveva 6 h dopo. Nel caso della via intramuscolare si aveva un tempo di dimezzamento di 5 h e la scomparsa completa avveniva dopo 48 h. Un esperimento di protezione venne eseguito su 14 volontari ai quali erano stati iniettati 5 ml di sangue Rh positivo: 2 h più tardi 6 di questi ricevettero 15 µg di anti-D per via intramuscolare e gli altri 8 la stessa dose, ma per via endovenosa. Cinque mesi più tardi la ricerca degli anticorpi fu negativa in tutti i soggetti; ma 5 mesi dopo un'ulteriore iniezione di 2 ml di sangue Rh positivo, 4 dei 6 soggetti trattati per via intramuscolare risultavano immunizzati, mentre nessuno degli 8 trattati per via endovenosa presentava anticorpi.

L'intento di BÖRNER e Coll.¹⁹ era quello di variare la dose dell'anti-D somministrato per via endovenosa in rapporto alla quantità di sangue fetale riscontrato nella madre. Questo criterio operativo sembra aver avuto pieno successo, come si può rilevare in base ai risultati ottenuti ad Hannover e ad Amburgo¹⁸. Infatti, delle 3.695 madri trattate in questo modo, soltanto una svi-

JOUVENCEAUX⁸⁹ has prepared anti-D gammaglobulin for intravenous use by the method of BARANDUN⁸. He plans to administer 85 µg anti-D to all Rh-negative mothers free of antibody at delivery.

It is impossible to be certain at present whether fewer failures will result if anti-D is given intravenously. It was argued above that the evidence suggests that some of the instances of failure of prophylaxis are probably due to the anti-D being given at a time when immunisation has already occurred. It is difficult to see how the somewhat speedier action of intravenous anti-D can make any appreciable difference in this situation. This is an important question and further results are awaited with interest. It is possible that although intravenous injections are a little more inconvenient, the administration of anti-D by this route may have an important place in future programmes.

Anti-D plasma has itself been used with success⁷⁰. SHAPIRO¹⁵⁵ has treated a large number of mothers with reconstituted lyophilised plasma equivalent to 20 ml. 5,250 doses have been administered without ill effect and of 1,662 such mothers 2 showed antibody six months later. It seems doubtful, however, whether plasma will be commonly used. Although careful screening of the plasma donors has so far prevented the occurrence of hepatitis, the more certain safety of gammaglobulin preparations and easier administration make it likely that this will be the standard form in which anti-D will be used.

Sources of anti-D gammaglobulin

Satisfactory sources of pooled plasma containing anti-D have been obtained from women naturally immunised by pregnancy and individuals immunised by Rh-incompatible transfusion, and from

luppò, alcuni mesi più tardi, anticorpi anti-D. JOUVENCEAUX⁸⁹ ha preparato le gammaglobuline anti-D, da usarsi per via endovenosa, seguendo il metodo di BARANDUN⁸. Egli intende somministrare 85 µg di anti-D a tutte le madri Rh negative che al momento del parto non presentino anticorpi.

Al momento è impossibile dire con certezza se la somministrazione endovenosa dell'anti-D permetta di diminuire il numero di insuccessi. Come si è già accennato, vi sono prove che in alcuni casi il motivo dell'insuccesso della profilassi è probabilmente costituito dal fatto che l'anti-D viene somministrato quando ormai l'immunizzazione è in corso. Non è facile stabilire se la più rapida azione delle gammaglobuline somministrate per via endovenosa possa influire su questo fatto: questo è un problema molto importante e si attendono con interesse i risultati futuri. È possibile che, sebbene l'iniezione endovenosa presenti qualche altro piccolo inconveniente, la somministrazione di anti-D per questa via abbia un posto importante nei futuri programmi di ricerca.

Anche il plasma intero anti-D è stato usato con successo⁷⁰. SHAPIRO¹⁵⁵ ha trattato un grande numero di madri con una quantità di plasma liofilizzato ridisciolti corrispondente a 20 ml iniziali. Sono state somministrate 5.250 dosi senza riscontrare effetti patologici; su 1.662 madri 2 presentavano anticorpi 6 mesi più tardi. Sembra comunque improbabile che il plasma sarà comunemente impiegato. Infatti, sebbene una attenta selezione dei donatori abbia sinora impedito il manifestarsi di epatiti, la maggior sicurezza delle preparazioni di gammaglobuline unitamente alla più facile somministrazione fa sì che con ogni probabilità questa divenga la forma standard in cui verrà impiegato l'anti-D.

Fonti delle gammaglobuline anti-D

Fonti soddisfacenti per il pool di plasma contenente gli anti-D sono rappresentate da donne immunizzate naturalmente durante la gravidanza, da individui trasfusi con sangue Rh incompatibile

*deliberately immunised volunteers. In England naturally immunised women are selected for high titres of anti-D and it is expected that half the donors would, after booster injections of Rh-positive blood, achieve approximately 50 µg/ml anti-D in their sera*⁷⁷. Quite small volumes, e.g. 0.5 ml of Rh-positive blood appear to be sufficient as booster doses. With regard to the immunisation of volunteers, general guide lines have been suggested in a Bulletin of the W. H. O.¹⁸¹.

Review of the evidence regarding the experimental immunisation of Rh-negative volunteers with differing volumes of Rh-positive blood suggests that there is probably no advantage in using a priming dose in excess of 5 ml of red cells and even less than this may be sufficient. If the subjects are then left for six months and a further stimulus of the order of 2 ml Rh-positive red cells is given, at least 50 % should develop anti-D. With one or more further stimuli, 65-70 % of recipients should have anti-D. Appropriate smaller stimuli at intervals of a few months can then be given according to the titre of antibody. In this way it is possible to achieve anti-D concentrations of 50 µg/ml of serum.

There is general agreement that plasma pools from at least 10 donors involving total volumes of not less than 60 l should be used for gammaglobulin production, this leading to preparations of more uniform potency. In order to achieve this, plasmapheresis is now routinely used in many centres, the basic technique having been described by KLIMAN and LESSES⁹⁴. Varying schedules are used, e.g. 200-250 ml plasma from each donor twice weekly or 600-700 ml plasma once every two months. There appears to have been no difficulty in obtaining at least 10 l of plasma from each donor annually. It is unlikely that deleterious effects will result from this but donors require regular supervision and quantitative analysis of blood count, plasma proteins and liver function.

e da volontari immunizzati intenzionalmente. In Inghilterra le donne naturalmente immunizzate sono selezionate in base ad un alto titolo di anti-D e ci si attende che metà delle donatrici, dopo iniezione di richiamo con sangue Rh positivo, raggiungano una concentrazione di anti-D nel siero di 50 µg/ml⁷⁷. Come dosi di richiamo sono sufficienti quantità molto piccole di sangue Rh positivo, ad esempio 0,5 ml. Sono stati pubblicati (W.H.O.¹⁸¹) consigli generali sullo schema di immunizzazione per i volontari.

Da una sintesi dei dati riguardanti la immunizzazione sperimentale di volontari Rh negativi si ricava che probabilmente non vi è alcun vantaggio nell'usare come dose sensibilizzante una quantità di emazie superiore a 5 ml e che anzi una quantità minore potrebbe essere sufficiente. Se dopo un riposo di 6 mesi, si pratica un ulteriore stimolo dell'ordine di 2 ml di emazie Rh positive, almeno il 50 % dei soggetti dovrebbe dar luogo a formazione di anti-D. Dopo il terzo o i successivi stimoli, il 65-70 % dei riceventi forma anticorpi. Possono essere dati ad intervalli di qualche mese piccoli stimoli di varia entità, a seconda del titolo di anticorpi; in tal modo è possibile raggiungere una concentrazione di anti-D nel siero di 50 µg/ml.

Tutti ritengono che per ottenere delle preparazioni di gammaglobuline più uniformi è necessario partire da un pool di non meno di 60 l di plasma, proveniente da 10 o più donatori. Per ottenere ciò, in molti Centri si esegue ora la plasmaferesi routinaria secondo la tecnica di base descritta da KLIMAN e LESSES⁹⁴. Sono stati seguiti vari schemi, per esempio 200-250 ml di plasma sono prelevati 2 volte alla settimana da ogni donatore, oppure 600-700 ml ogni 2 mesi. Non sembrano esservi difficoltà nell'ottenere almeno 10 l di plasma all'anno da ogni donatore. Sebbene non sembri che possano esservi effetti dannosi, è tuttavia necessario controllare periodicamente i donatori con analisi quantitative degli elementi figurati del sangue, delle proteine plasmatiche e della funzionalità epatica.

The most widely used method for the separation and concentration of anti-D from pooled plasma is the cold ethanol fractionation method in which a large proportion of the IgG is found in fraction II. The yield of anti-D varies within the range 50-70 % and the amount of IgM in the final preparation is of the order of 0.5-1.0 % of total protein. It is likely that newer methods using DEAE column separation or Sephadex will be used in the future. The stability of these gammaglobulin preparations has been investigated. It has been known for some time that gammaglobulin preparations kept at 4 °C for long periods may undergo a certain amount of degradation with the formation of 3.5S fragments. In part this is due to the conversion of plasminogen to plasmin. In practice, however, there is no evidence that anti-D preparations in 0.3 molar glycine as solvent have shown significant deterioration even with quite long periods of storage.

Requirements for anti-D gammaglobulin

In any population in which approximately one-sixth of individuals are Rh-negative, 10 % of all pregnancies involve an Rh-negative mother and Rh-positive infant. To take an example, in England and Wales, with approximately 18,000 births annually for each million of the population, there are each year 1,800 Rh-incompatible births per million of population. This number therefore represents the number of doses of anti-D required annually per million of population, if all Rh-negative mothers are treated after every such pregnancy irrespective of parity and ABO blood groups. In countries where supplies of anti-D are good, mothers are being treated after abortions and only approximate estimates of the requirements for this purpose can be made. Where supplies are limited it seems reasonable to give priority to treating mothers after the early Rh-positive ABO-compatible pregnancies.

One suitable donor of anti-D can supply, without being subjected to undue

Per la separazione e la concentrazione dell'anti-D dal pool di plasma, il metodo più usato è quello del frazionamento a freddo con etanolo: una gran parte delle IgG si ritrova nella frazione seconda. La percentuale di anti-D varia dal 50 al 70 % e la quantità di IgM nella preparazione finale è dell'ordine dello 0,5-1,0 % delle proteine totali. È probabile che in futuro si utilizzeranno i più moderni metodi di separazione su colonne di DEAE o di Sephadex. È stata studiata la stabilità di queste preparazioni di gammaglobuline; è noto da tempo che le preparazioni di gammaglobuline conservate a 4 °C per un lungo periodo di tempo possono presentare un certo grado di clivaggio con la formazione di frammenti 3,5S. Ciò è dovuto in parte alla trasformazione del plasminogeno in plasmina. In pratica comunque non vi sono indicazioni che preparazioni di anti-D in glicina 0,3 M presentino un significativo deterioramento anche dopo lunghi periodi di conservazione.

Richiesta di gammaglobuline anti-D

In tutte quelle popolazioni in cui circa un sesto dei soggetti è Rh negativo, il 10 % delle gravidanze sono costituite da una madre Rh negativa e da un figlio Rh positivo. Per esempio, in Inghilterra e nel Galles, poiché su ogni milione di abitanti si hanno annualmente 18.000 nascite, ogni anno si hanno 1.800 nati Rh incompatibili per ogni milione di abitanti. Tale numero perciò corrisponde al numero di dosi di anti-D richieste annualmente per ogni milione di abitanti, nel caso che tutte le madri Rh negative siano trattate dopo ogni gravidanza Rh incompatibile, indipendentemente dalla compatibilità o meno per il sistema ABO. Nei paesi dove vi sono buone fonti di anti-D, le madri sono trattate anche dopo gli aborti e in tal caso si può avere solo una stima approssimata della richiesta. Dove le fonti sono limitate, sembra ragionevole dare la precedenza nel trattamento alle madri dopo la prima gravidanza Rh positiva ABO compatibile.

Un donatore idoneo di anti-D, senza essere sottoposto a plasmaferesi con ec-

frequent plasmapheresis, 1,500 doses of 200 µg anti-D annually, sufficient to give such a dose to all Rh-negative mothers following ABO-compatible pregnancies over a period of one year in a population of one million.

Assay of anti-D preparations

It is likely that the important factor determining the ability of an anti-D preparation to produce immunosuppression is the amount of antibody which binds to the circulating Rh-positive red cells. HUGHES-JONES⁷⁵ has shown that under conditions of equilibrium the amount of anti-D binding to red cells depends: a) on the total concentration of anti-D, b) on the average equilibrium constant and c) on the heterogeneity of the equilibrium constant.

HUGHES-JONES⁷⁵ described the 'indirect' method for assaying anti-D concentrations. A series of volumes of anti-D serum are brought into equilibrium with differing concentrations of Rh-positive red cells. ¹²⁵I-labelled anti-gammaglobulin is added and the amount of bound anti-gammaglobulin measured. The antiglobulin used is calibrated with standard anti-D preparations and thus the amount of anti-D bound to red cells can be determined. More recently, a more accurate 'direct' method in which the anti-D preparation itself is labelled with ¹²⁵I has been described⁸⁰. The SCATCHARD plot in which r/Ag is plotted against r , where r is the concentration of bound anti-D at equilibrium and Ag is the concentration of unbound antigen sites, enables the concentration of anti-D to be read off. The resulting curve is curvilinear and POLLACK and KOCHESKY¹⁴⁰ have recently suggested that if the two parameters are plotted logarithmically, a straight line relationship results and a more accurate reading can be made.

The equilibrium constant of an anti-body reflects the energy with which that

cessiva frequenza, può fornire ogni anno 1.500 dosi di 200 µg ciascuna di anti-D, sufficienti a garantire, per il periodo di 1 anno e per una popolazione di 1 milione di abitanti, una dose a tutte le madri Rh negative che abbiano avuto una gravidanza ABO compatibile.

Controllo della preparazione di gammaglobuline anti-D

È probabile che il fattore principale che determina la capacità di una preparazione di anti-D di produrre immunosoppressione sia la quantità di anticorpi che si lega alle emazie Rh positive circolanti. HUGHES-JONES⁷⁵ rilevò che in condizioni di equilibrio la quantità di anti-D che si lega alle emazie dipende: a) dalla concentrazione totale di anti-D, b) dalla costante di equilibrio media e c) dalla eterogeneità della costante di equilibrio.

HUGHES-JONES⁷⁵ ha descritto il metodo « indiretto » per misurare la concentrazione di anti-D. Una serie di differenti quantità di siero anti-D è lasciata equilibrare con varie concentrazioni di emazie Rh positive, quindi vengono aggiunti anticorpi anti-gammaglobuline marcati con ¹²⁵I e si misura la quantità di anti-gammaglobuline legata ai globuli rossi. L'antiglobulina usata è calibrata con una preparazione standard di anti-D e così può essere determinata la quantità di anti-D legata alle emazie. Più recentemente è stato descritto un metodo « diretto » più accurato, in cui la stessa preparazione di anti-D⁸⁰ è marcata con ¹²⁵I. Il grafico di SCATCHARD in cui le coordinate sono date dai valori di r/Ag e di r , quando r sia la concentrazione dell'anti-D legato all'equilibrio e Ag la concentrazione dei determinanti antigenici non legati, permette di leggere la concentrazione dell'anti-D. La curva che ne origina è curvilinea e POLLACK e KOCHESKY¹⁴⁰ hanno recentemente proposto di segnare i due parametri su scala logaritmica, ottenendo così una linea retta che permette una più accurata lettura.

La costante di equilibrio di un anticorpo dipende dall'energia con la quale

antibody combines with specific antigen and a method of determining this was described by HUGHES-JONES⁷⁶. As all antibodies show marked heterogeneity, what is really measured is the average equilibrium constant, K_0 . It is also possible to express the extent of heterogeneity of anti-D as a 'heterogeneity index' and this has been measured for many anti-D preparations by HUGHES-JONES and GARDNER⁷⁶. The effect of increased heterogeneity is to increase the percentage of antibody bound to red cells, particularly when these are in low concentration. This is because under these conditions the equilibrium laws will result in molecules with high equilibrium constants preferentially binding with the surface antigens and such high affinity antibodies are more likely to be present when there is greater heterogeneity.

HUGHES-JONES et al.⁷⁷ have argued that because of the relatively small range of variability in K_0 and heterogeneity index found on testing anti-D gamma-globulin preparations produced in many different centres, it was, in practice, unnecessary to estimate these values in every case but that measurement of the anti-D concentration alone was a practical guide to the protective dose required. It is perhaps important to note that data obtained from in vitro studies may not necessarily always reflect what will happen when a particular amount of anti-D is injected into a subject in whom a variable amount of Rh-positive blood is circulating. It is possible that at certain crucial sites in the body the expected equilibrium relationship between antibody and antigen do not occur and thus the in vitro studies can only act as a useful guide.

MECHANISM OF IMMUNOSUPPRESSION

The phenomenon of immunosuppression by specific antibody has been studied in considerable detail in recent years because it appears to play an im-

l'anticorpo si combina con l'antigene specifico e un metodo per determinarla è stato descritto da HUGHES-JONES⁷⁶. Poiché in realtà tutti gli anticorpi sono fortemente eterogenei, ciò che in realtà viene misurato è la costante di equilibrio media, K_0 . È anche possibile esprimere l'ampiezza della eterogeneità dell'anti-D con un « indice di eterogeneità » che, per molte preparazioni di anti-D, è stato misurato da HUGHES-JONES e da GARDNER⁷⁶. L'aumentata eterogeneità eleva la percentuale di anticorpi legati alle emazie, specialmente quando queste siano in bassa concentrazione. Ciò avviene perché in queste condizioni le leggi di equilibrio si applicano a molecole con alte costanti di equilibrio che con facilità si legano agli antigeni di superficie: questi anticorpi ad elevata attività si presentano infatti con più facilità quando esiste grande eterogeneità.

HUGHES-JONES e Coll.⁷⁷ ritengono che, essendo relativamente piccolo il grado di variabilità del K_0 e dell'indice di eterogeneità ritrovato tra le varie preparazioni di anti-D esaminate, provenienti da diversi Centri, non è necessario in pratica valutare questi parametri in ogni caso, ma che per avere una guida pratica per il dosaggio da usarsi per la protezione è sufficiente valutare la concentrazione di anti-D. È forse importante far notare che non sempre i dati ottenuti *in vitro* riflettono necessariamente ciò che avviene quando una certa dose di anti-D è iniettata in un soggetto nel quale è presente in circolo una quantità variabile di sangue Rh positivo. È perciò possibile che in certi punti cruciali dell'organismo non avvenga l'attesa relazione di equilibrio tra antigene ed anticorpo e che così gli studi *in vitro* non rappresentino altro che una utile guida.

MECCANISMO DELL'IMMUNOSOPPRESSIONE

Il fenomeno dell'immunosoppressione da parte di anticorpi specifici è stato studiato molto accuratamente in questi ultimi anni, poiché pare che esso giochi

portant part in physiological regulation of the immune response¹⁶⁶. There are basically three ways in which antibody can be conceived as interfering with the normal immune response.

1) Destruction or deviation of antigen

This first possibility implies either the complete destruction in effective form of antigen with degradation and rapid removal from the body or a deviation of antigen away from sites in the tissues in which further stages of the immune response could occur. Against this being the usual explanation for immunosuppression by antibody is the specificity which has been demonstrated in several systems^{11, 29, 117, 139}. There are certain situations in which antibodies have a non-specific effect, the prevention of Rh immunisation in man by naturally occurring anti-A and anti-B being a good example of this. Here it is known that most of the incompatible cells are rapidly cleared to the liver which is poor in antigen-sensitive cells. It may be that where the antigen-antibody reaction involves considerable physico-chemical change in the antigenic particle, possibly involving complement fixation, deviation to immunologically incompetent areas with rapid sequestration by macrophages occurs, followed by degradation of the whole antigenic complex. In such a situation immunosuppression would be non-specific.

In the case of immunosuppression by anti-D it is known that the Rh-positive cells are removed to the spleen and it is unlikely that this mechanism is operating here.

2) Blocking of antigenic determinants

At present this is thought to be the most likely basis for the action of IgG anti-D. A simple picture of antibody induction involves the taking up by macrophages in immunologically competent

un ruolo importante nel meccanismo della regolazione fisiologica della risposta immune¹⁶⁶. Tre sono fondamentalmente le vie per le quali gli anticorpi possono interferire con la normale risposta.

1) Distruzione o allontanamento dell'antigene

La prima possibilità implica o la completa reale distruzione dell'antigene per degradazione e rapida scomparsa dall'organismo, oppure un allontanamento dell'antigene da quei tessuti in cui potrebbero avvenire gli stadi successivi della risposta immune. Contro questa ipotesi, che è poi la spiegazione usuale per l'immunosoppressione mediata da anticorpi, sta la specificità che è stata osservata in molti sistemi^{11, 29, 117, 139}. Vi sono alcune situazioni in cui gli anticorpi hanno un effetto non specifico: un buon esempio di ciò è dato dalla prevenzione dell'immunizzazione Rh nell'uomo da parte degli anticorpi naturali anti-A e anti-B. È noto che la maggior parte delle cellule incompatibili sono rapidamente eliminate dal fegato, che contiene scarse cellule sensibili agli antigeni (*antigen-sensitive cells*). È probabile che, qualora la reazione antigene-anticorpo coinvolga gravi alterazioni fisico-chimiche della particella antigenica, determinando anche la fissazione del complemento, si abbia una deviazione verso organi non competenti immunologicamente, ma in grado di determinare per mezzo dei macrofagi rapido sequestro dell'antigene, seguito dalla distruzione di tutto il complesso antigenico.

È noto che nel caso dell'immunosoppressione da parte dell'anti-D la distruzione delle cellule Rh positive avviene nella milza ed è quindi poco probabile che in questo caso avvenga il meccanismo di cui si è parlato.

2) Blocco dei determinanti antigenici

Al momento si pensa che questa sia l'ipotesi più probabile per spiegare l'azione delle IgG anti-D. Il processo di induzione degli anticorpi può così essere schematizzato: il complesso anti-

tissues of the antigenic complex, possibly followed by some kind of processing within this cell. Antigenic determinants are then presented, possibly at the surface of dendritic macrophages in germinal centres, in such a way that they are able to come in contact with the surface of antigen-sensitive cells. Specific interaction between antigenic determinants and surface receptors on the antigen-sensitive cells leads to proliferation and then differentiation of these cells with the release of antibody. Passive antibody can therefore be conceived as competing in this system for antigenic determinants with the specific receptors on antigen-sensitive cells. Experimental support for this concept comes from the cell culture experiments of MOSIER¹²² and PIERCE¹³⁷. Indirect evidence comes from the observation that the higher the combining affinity of antibody the greater is the immunosuppressive effect¹⁷¹. The evidence that the $F(ab')_2$ fragment of antibody can still produce specific immunosuppression also provides indirect support for this view^{35, 36, 162}.

3) Suppression of antigen-sensitive cells

This possibility was suggested by ROWLEY and FITCH¹⁴⁹ on the basis of the finding that spleen cells, exposed to anti-sheep red cell antibody did not produce an immune response when transferred to a recipient animal which was then challenged with the sheep red cells. Others have since not been able to confirm these findings. Moreover, the *in vitro* studies of PIERCE¹³⁷ are against this mechanism. He found that in a cell culture system, exposure of lymphoid cells to antibody prior to adding them to the culture, did not lead to immunosuppression whilst exposure of macrophages to the antibody did so.

COMMENT

Whatever the mechanism, the immunosuppressive action of anti-D appears

genico viene fagocitato e probabilmente elaborato dai macrofagi dei tessuti immunologicamente competenti; quindi, probabilmente nei centri germinali, sulla superficie di macrofagi dendritici, i determinanti antigenici sono presentati in modo tale da poter venire in contatto con la superficie delle *antigen-sensitive cells*; la specifica interazione tra i determinanti antigenici e i recettori di superficie delle *antigen-sensitive cells* porta alla differenziazione di queste cellule e alla formazione di anticorpi. Gli anticorpi passivi possono dunque in questo sistema entrare in competizione per i determinanti antigenici con i recettori specifici delle *antigen-sensitive cells*. Le basi sperimentali di questa ipotesi vengono dagli esperimenti di colture cellulari di MOSIER¹²² e PIERCE¹³⁷. Il fatto che più elevata è l'affinità degli anticorpi più grande è l'effetto immunosoppressore¹⁷¹, può rappresentare una prova indiretta di questo punto di vista. Prove indirette vengono anche dall'osservazione che il frammento $F(ab')_2$ può ancora produrre immunosoppressione specifica^{35, 36, 162}.

3) Soppressione delle antigen-sensitive cells

Questa possibilità è stata suggerita da ROWLEY e FITCH¹⁴⁹ basandosi sul seguente esperimento: cellule spleniche, esposte ad anticorpi anti-emazie di montone, non erano in grado di dare origine ad una risposta immune quando venivano trasferite in un animale ricevente che era poi stimolato con emazie di montone. Finora nessun altro è riuscito a confermare questi dati, anzi gli studi *in vitro* di PIERCE¹³⁷ sono contro questo meccanismo; questo A. trovò infatti che trattando i linfociti con anticorpi prima di aggiungerli in una coltura cellulare non si otteneva immunosoppressione, fenomeno che invece avveniva quando si trattavano i macrofagi.

COMMENTO

Qualunque sia il meccanismo, l'azione immunosoppressiva dell'anti-D rap-

to provide a safe and highly successful method of preventing Rh immunisation by pregnancy. It is likely that this method will have a permanent place in the management of the Rh problem. In theory it might be possible to produce immunosuppression by other means, but it seems unlikely that they would be as safe. WADE *et al.*¹⁶⁹ have used cyclophosphamide and cytarabine to suppress the immune response of rats to human group O Rh-positive red cells, without observing toxic side-effects. It seems inconceivable that this approach can ever be applied as it means giving potentially dangerous drugs to healthy women, many of whom would not have affected babies even if no treatment was given.

presenta un metodo sicuro e di buona riuscita per prevenire l'immunizzazione Rh da gravidanza. È probabile che questo metodo venga definitivamente adottato per il trattamento del problema Rh. In teoria è possibile produrre immunosoppressione con altri mezzi, ma è improbabile che essi siano così sicuri. WADE e Coll.¹⁶⁹ si sono serviti della ciclofosfamida e della citarabina per sopprimere nei ratti la risposta immune ai globuli rossi umani di gruppo O, Rh positivo, senza osservare effetti collaterali tossici. Sembra tuttavia impensabile che tale sistema possa mai essere applicato, poiché ciò significa somministrare farmaci potenzialmente pericolosi a donne sane, molte delle quali non avrebbero bambini malati anche se non si praticasse loro alcun trattamento.

RIASSUNTO

L'eritroblastosi fetale può essere considerata come una forma molto limitata di rigetto immunologico del feto. Il passaggio di eritrociti dal feto alla madre può avvenire prima del parto e dar luogo talvolta alla formazione di anticorpi materni nel corso della gravidanza. Più frequentemente tale passaggio si verifica in occasione del travaglio e, essendo dipendente dal volume cellulare, può dar luogo alla formazione di anticorpi nei mesi successivi o durante la successiva gravidanza. La gravità della malattia emolitica nel feto dipende da una complessa interazione di vari fattori in aggiunta alla concentrazione e alle caratteristiche leganti dell'anticorpo IgG nella madre. Il parto precoce, la trasfusione di scambio e la trasfusione intrauterina, in unione con le migliorate possibilità di stabilire la gravità della malattia fetale, hanno determinato una più rapida guarigione dei bambini colpiti, di circa il 92% in alcuni centri. E attualmente possibile prevenire l'immunizzazione Rh nella maggior parte delle madri Rh negative somministrando IgG anti-D intramuscoli immediatamente dopo la gravidanza Rh positiva. Questa profilassi si è dimostrata efficace in almeno il 95% dei casi, quando la prevenzione dello sviluppo di anticorpi veniva eseguita dopo il parto, e in circa il 90% dei casi, allorché i tests venivano praticati nel corso della successiva gravidanza Rh positiva. Utile può risultare l'impiego di anti-D gammaglobulina i.v., particolarmente in caso di passaggio di notevoli quantità di emazie Rh incompatibili. Il ruolo della terapia anti-D praticata prima del parto è tuttora incerto.

SUMMARY

Erythroblastosis foetalis can be looked upon as a very limited form of immunological rejection of the foetus. Foeto-maternal transfusion of erythrocytes can occur *ante-partum* and occasionally results in maternal antibody formation during pregnancy. Most commonly such transfusion occurs in relation to labour and, depending on the volume of cells, it may result in antibody formation in subsequent months or during the subsequent pregnancy. The severity of haemolytic disease in the foetus depends on a complex interaction of several factors in addition to the concentration and binding characteristics of IgG antibody in the mother. Early delivery, exchange transfusion and intrauterine transfusion, combined with improved assessment of the severity of the disease in the foetus, have resulted in a high salvage rate of affected infants, approximately 92% in some centres. It is now possible to prevent Rh immunisation in most Rh-negative mothers by administering IgG anti-D intramuscularly immediately after each Rh-positive pregnancy. This prophylaxis is at least 95% successful as judged by the prevention of the development of antibody in the post-delivery period, or approaching 90% as judged by tests in the subsequent Rh-positive pregnancy. There may be a place for intravenous anti-D gammaglobulin particularly in the case of large Rh-incompatible transfusion. The place of *ante-partum* anti-D therapy is at present uncertain.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to acknowledge with thanks the following authors for permission to quote their personal data: F. K. BARTSCH, P. BÖRNER, E. BORST-EILERS, J. M. BOWMAN, D. I. BUCHANAN, M. G. DAVEY, H. DEICHER, J. EKLUND, H. H. HOPPE, A. JOUVENCEAUX, J. Y. MACDOUGALL, W. D'A MAYCOCK, H. R. NEVANLINNA, W. POLLACK, J. G. ROBERTSON, L. A. M. RYTTERING, L. SANDBERG, M. SHAPIRO, J. SCHNEIDER, J. WALLACE.

I am grateful to *Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano*, for permission to reproduce fig. 1 and to the C. V. Mosby Company for fig. 2.

REFERENCES

- 1) ADAMSONS K., FRED A. V. J., JAMES L. S., TOWELL M. E.: Prenatal Treatment of Erythroblastosis Fetalis Following Hysterotomy - *Pediatrics* 35, 848, 1965.
- 2) ALLEN F. H., DIAMOND L. K., JONES A. R.: Erythroblastosis Fetalis: IX. The Problems of Stillbirth - *New Engl. J. Med.* 251, 453, 1954.
- 3) ALTHOFF W., SCHELLONG G., STAHL M.: Praktische Probleme bei der Immunprophylaxe der Rh Sensibilisierung - *Münch. med. Wschr.* 111, 1386, 1969.
- 4) ANDERSON J. M.: Immunological Inertia in Pregnancy - *Nature (Lond.)* 206, 786, 1965.
- 5) ANDRESEN R. H., MONROE C. W.: Experimental Study of the Behaviour of Adult Human Skin Homografts during Pregnancy - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 84, 1096, 1962.
- 6) ARMITAGE P., MOLLISON P. L.: Further Analysis of Controlled Trials of Treatment of Haemolytic Disease of the Newborn - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.* 60, 605, 1953.
- 7) ASENSIO S. H., FIGUEROA-LONGO J. G., PELEGRINA I. A.: Intrauterine Exchange Transfusion - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 95, 1129, 1966.
- 8) BARANDUN S., KISTLER P., JEUNET P., ISLIKER H.: Intravenous Administration of Human Globulin - *Vox Sang. (Basel)* 7, 157, 1962.
- 9) BARTSCH F. K.: Bilirubin in the Amniotic Fluid. A Review - In: ROBERTSON J. G., DAMBROSIO F. (Eds): *The Rh Problem. Proceedings of the International Symposium on the Management of the Rh Problem. Milan, 1969 - Ann. Ostet. Ginec. (Special number)*, 73, 1970.
- 10) BARTSCH F. K., RYTTERING L. A. M., SANDBERG L.: Personal Communication, 1970.
- 11) BENACERRAF B., GELL P. G. H.: Studies on Hypersensitivity. III. The Relation between Delayed Reactivity to the Picryl Group of Conjugates and Contact Sensitivity - *Immunology* 2, 219, 1959.
- 12) BERK H., SUSSMAN L.: Spectrophotometric Analysis of Amniotic Fluid during Early Pregnancy - *Obstet. and Gynec.* 35, 170, 1970.
- 13) BETKE K., NIERHAUS K.: Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten im mütterlichen Blut - *Münch. med. Wschr.* 110, 509, 1968.
- 14) BEVAN I. D. G., TRUSKETT I. D.: The Identification of the High Risk Patient in Rhesus Sensitization by the Use of Post-Partum Foetal Cell Counts - *Med. J. Aust.* 1, 551, 1969.
- 15) BEVIS D. C. A.: Blood Pigments in Haemolytic Disease of the Newborn - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.* 63, 68, 1956.
- 16) BILLINGHAM R. E.: Transplantation Immunity and the Maternal-Fetal Relation - *New Engl. J. Med.* 270, 667, 1964.
- 17) BONSNES R. W.: Model 202 Analyzes Bilirubin Content of Amniotic Fluid - *Instrument News* 16, 14, 1965.
- 18) BÖRNER P., DEICHER H., HOPPE H. H.: Personal Communication, 1970.
- 19) BÖRNER P., DEICHER H., HOPPE H. H., HITSCHOLD H., HOLTZ S., SEIFERT A.: Prophylaxe der Rhesus-Sensibilisierung durch intravenöse Gabe von Immunglobulin G anti-D. I. Klinische Ergebnisse und Untersuchungen zur Anti-D-Dosierung - *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 29, 203, 1969.
- 20) BÖRNER P., DEICHER H., HOPPE H. H., PIXBERG H. U., STEG W.: Clearance of Rh-Positive Foetal Erythrocytes from the Blood of Rh-Negative Adults by Intravenously Applicable Immunglobulin G anti-D - *Vox Sang. (Basel)* 17, 362, 1969.
- 21) BORST-EILERS E.: Personal Communication, 1970.
- 22) BOWMAN J. M.: Personal Communication, 1970.
- 23) BOWMAN J. M., CHOWN B.: Prevention of Rh Immunization after Massive Rh-Positive Transfusion - *Canad. med. Ass. J.* 99, 385, 1968.
- 24) BOWMAN J. M., PEDDLE L. J., ANDERSON C.: Plasmapheresis in Severe Rh Iso-Immunitization - *Vox Sang. (Basel)* 15, 272, 1968.
- 25) BOWMAN J. M., POLLOCK J. M.: Amniotic Fluid Spectrophotometry and Early Delivery in the Management of Erythroblastosis Fetalis - *Pediatrics* 35, 815, 1965.

- 26) BOYD W. C., McMASTER M. H., WASCZENKO-ZACHARCZENKO E.: Specific Inhibition of Anti-Rh Serum by 'Unnatural' Sugars - *Nature (Lond.)* 184, 989, 1959.
- 27) BOYD W. C., REEVES E.: Specific Inhibition of anti-D Antibody by Colominic Acid - *Nature (Lond.)* 191, 511, 1961.
- 28) BRAZIE J. V., BOWES W. A., IBBOTT F. A.: An Improved, Rapid Procedure for the Determination of Amniotic Fluid Bilirubin and its Use in the Prediction of the Course Rh Sensitized Pregnancies - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 104, 80, 1969.
- 29) BRODY N. I., WALKER J. G., SISKIND G. W.: Studies on the Control of Antibody Synthesis. Interaction of Antigenic Competition and Suppression of Antibody on the Immune Response - *J. exp. Med.* 126, 81, 1967.
- 30) BUCHANAN D. I.: Personal Communication, 1970.
- 31) BUCHANAN D. I., BELL R. E., BECK R. P., TAYLOR W. C.: Use of Different Doses of Anti-Rh IgG in the Prevention of Rh Immunisation - *Lancet* 2, 288, 1969.
- 32) CARLTON M. A., SINHA R.: Liquor Bilirubin Values in Early Pregnancy - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth* 77, 221, 1970.
- 33) CARTER B., WILLIAMSON A. C., LOUGHREY J., INGRAM C. H.: Evolution of Rh Hapten - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 72, 655, 1956.
- 34) CASSADY G., CAILLETEAU J., LOCKARD D., MILSTEAD R.: The Hazard of Fetal-Maternal Transfusion after Transabdominal Amniocentesis - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 99, 284, 1967.
- 35) CEROTTINI J. C., MCCONAHEY P. J., DIXON F. J.: The Immunosuppressive Effect of Passively Administered Antibody IgG Fragment - *J. Immunol.* 102, 1008, 1969.
- 36) CHANG H., SCHNECK S., BRODY N. I., DEUTSCH A., SISKIND G. W.: Studies on the Mechanism of the Suppression of Active Antibody Synthesis by Passively Administered Antibody - *J. Immunol.* 102, 37, 1969.
- 37) CHERRY S. H., KOCKWA S., ROSENFELD R. E.: Bilirubin-Protein Ratio in Amniotic Fluid as an Index of the Severity of Erythroblastosis Fetalis - *Obstet. and Gynec.* 26, 826, 1965.
- 38) CHERRY S. H., ROSENFELD R. E., KOCKWA S.: Mechanisms of Accumulation of Amniotic Fluid Pigment - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 106, 297, 1970.
- 39) CHOWN B.: Anemia from Bleeding of the Fetus into the Mother's Circulation - *Lancet* 1, 1213, 1954.
- 40) CHOWN B. and co-Authors: Prevention of Primary Rh Immunization. First Report of the Western Canadian Trial, 1966-1968 - *Canad. med. Ass. J.* 100, 1021, 1969.
- 41) CHRISTENSEN J.: Haemoglobin-F. Serological Conditions and Occurrence in Normal Adults and Normal Pregnant and Post Partum Women with Particular Reference to Foeto-Maternal Haemorrhage - *Dan. med. Bull.* 15, 166, 1968.
- 42) CLARKE C. A., DONOHOE W. T. A., MCCONNELL R. B., WOODROW J. C., FINN R., KREVANS J. R., KOLKE W., LEHANE D., SHEPPARD P. M.: Further Experimental Studies in the Prevention of Rh-Haemolytic Disease - *Brit. med. J.* 1, 979, 1963.
- 43) CLARKE C. A., ELSON C. J., BRADLEY J., DONOHOE W. T. A., LEHANE D., HUGHES-JONES N. C.: Intensive Plasmapheresis as a Therapeutic Measure in Rhesus-Immunised Women - *Lancet* 1, 793, 1970.
- 44) CLAYTON E. R., FELDHAUS W. D., WHITEACRE F. E.: Fetal Erythrocytes in the Maternal Circulation of Pregnant Women - *Obstet. and Gynec.* 23, 915, 1964.
- 45) CLEMENS K., WALSH R. J.: The Frequency of Immunisation of Rh-Negative Women by Rh Antigens - *Med. J. Aust.* 2, 707, 1954.
- 46) COHEN B. H.: ABO-Rh Interaction in an Rh-Incompatible Mated Population - *Amer. J. hum. Genet.* 12, 180, 1960.
- 47) COHEN F., ZUELZER W. W., GUSTAFSON D. C., EVANS M. M.: Mechanisms of Isoimmunization. I. The Transplacental Passage of Fetal Erythrocytes in Homospecific Pregnancies - *Blood* 23, 621, 1964.
- 48) COHEN F., ZUELZER W. W., HSU T. H. J., TERUYA J.: Rh Hemolytic Disease in ABO-Incompatible Offspring - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 105, 232, 1969.
- 49) COLEBATCH J. H., PITTS D., MADDISON T. G.: Feto-Maternal Transfusion. Another Case of Post Hemorrhagic Anemia of the Newborn - *Med. J. Aust.* 2, 209, 1956.
- 50) COOKE B. R., BRADLEY M. A., WALSH R. J.: Some Factors Influencing Rh Immunisation during Pregnancy - *Med. J. Aust.* 2, 437, 1965.
- 51) DAVEY M. G.: Personal Communication, 1970.
- 52) DONALDSON I. A., MADHAVA RAU S.: A Case of Transplacental Haemorrhage - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth* 70, 512, 1963.
- 53) DUDOK DE WIT C., BORST-EILERS E.: Failure of Anti-D Immunoglobulin Injection to Protect against Rhesus Immunisation after Massive Foeto-Maternal Haemorrhage. Report of Four Cases - *Brit. med. J.* 1, 152, 1968.

- 54) EKLUND J., NEVANLINNA H. R.: Personal Communication, 1970.
- 55) FINN R., CLARKE C. A., DONOHUE W. R. A., MCCONNELL R. B., SHEPPARD P. M., LEHANE D., KULKE W.: Experimental Studies on the Prevention of Rh Haemolytic Disease - *Brit. med. J.* 1, 1486, 1961.
- 56) FREDA V. J.: The Rh Problem in Obstetrics and a New Concept of its Management Using Amniocentesis and Spectrophotometric Scanning of Amniotic Fluid - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 92, 341, 1965.
- 57) FREDA V. J., ADAMSONS K.: Exchange Transfusions in Utero. Report of a Case - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 89, 817, 1964.
- 58) FREDA V. J., GORMAN J. G., GALEN R. S., TREACY N.: The Threat of Rh Immunisation from Abortion - *Lancet* 2, 147, 1970.
- 59) FREDA V. J., GORMAN J. G., POLLACK W.: Successful Prevention of Experimental Rh Sensitization in Man with an Anti-Rh Gamma Globulin: a Preliminary Report - *Transfusion (Philad.)* 4, 26, 1964.
- 60) FREDA V. J., GORMAN J. G., POLLACK W., ROBERTSON J. G., JENNINGS E. R., SULLIVAN J. F.: Prevention of Rh Isoimmunization. Progress Report of the Clinical Trial in Mothers - *J. Amer. med. Ass.* 199, 390, 1967.
- 61) FRIESEN R.: Problems of the Closed Technique of Intrauterine Transfusion - In: ROBERTSON J. G., DAMBROSIO F. (Eds): The Rh Problem. Proceedings of the International Symposium on the Management of the Rh Problem. Milan, 1969 - *Ann. Ostet. Gynec. (Special number)*, 134, 1970.
- 62) FRIESEN R. F., BOWMAN J. F.: The Role Played by Rh Immunisation in Pregnancy Wastage - *Canad. med. Ass. J.* 93, 1333, 1965.
- 63) GODEL J. C., BUCHANAN D. I., JAROSCH J. M., MCHUGH M.: Significance of Rh-Sensitization during Pregnancy: its Relation to a Preventive Programme - *Brit. med. J.* 4, 479, 1968.
- 64) GREEN G. H., LILEY A. W., LIGGINS G. C.: The Place of Foetal Transfusion in Haemolytic Disease - *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaec.* 5, 53, 1965.
- 65) HACKEL E., SMOLKER R. E., FENSKE S. A.: Inhibition of Anti-Rh and Anti-Lutheran Sera by Ribonucleic Acid and Derivatives - *Vox Sang. (Basel)* 3, 402, 1958.
- 66) HAERING VON M.: Arbeitstagung zur Prophylaxe der Rhesus-Sensibilisierung mit Immunglobulin Anti-D. January 1968, Freiburg - *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 28, 586, 1968.
- 67) HALITSKY V., KRUMHOLZ B. A.: Amniotic Fluid Analysis in Erythroblastosis Fetalis. I. The Effect of Oxyhemoglobin, Methemalbumin and Meconium - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 106, 1209, 1970.
- 68) HALITSKY V., KRUMHOLZ B. A.: Amniotic Fluid Analysis in Erythroblastosis Fetalis. II. Quantitative Bilirubin Relationships - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 106, 1214, 1970.
- 69) HALITSKY V., KRUMHOLZ B. A.: Amniotic Fluid Analysis in Erythroblastosis Fetalis. III. The Chloroform Extract and its Relationship to the Log Δ OD 450 - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 106, 1218, 1970.
- 70) HAMILTON E. G.: Prevention of Rh Isoimmunization by Injection of anti-D Antibody - *Obstet. and Gynec.* 30, 812, 1967.
- 71) HELLER S., PFEIDERER A.: Erythrozyten mit fetalem Hämoglobin bei Schwangeren - *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 29, 366, 1969.
- 72) HESLOP R. W., KROHN P. L., SPARROW E. M.: The Effect of Pregnancy on the Survival of Skin Homografts in Rabbits - *J. Endocr.* 10, 325, 1954.
- 73) HOPKINS D. F.: Rhesus Phenotypes and Rh(D) Haemolytic Disease of the Newborn - *Vox Sang. (Basel)* 16, 195, 1969.
- 74) HOWARD J. A., MARTIN R., BOTHAMLEY J.: Feto-Maternal Haemorrhage at Therapeutic Abortion - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth* 77, 137, 1970.
- 75) HUGHES-JONES N. C.: The Estimation of the Concentration and Equilibrium Constant of Anti-D - *Immunology* 12, 565, 1967.
- 76) HUGHES-JONES N. C., GARDNER B.: The Equilibrium Constants of Anti-D Immunglobulin Preparations Made from Pools of Donor Plasma - *Immunology* 18, 347, 1970.
- 77) HUGHES-JONES N. C., HOLBURN A. M., CLEGHORN T. E.: The Production of Anti-D Preparations Used in the Prevention of Rh Immunization - *Vox Sang. (Basel)* 16, 418, 1969.
- 78) HUGHES-JONES N. C., HUGHES M. I. J., WALKER W.: The Amount of Anti-D on Red Cells in Haemolytic Disease of the Newborn - *Vox Sang. (Basel)* 12, 279, 1967.
- 79) HUGHES-JONES N. C., MOLLISON P. L.: Failure of a Relatively Small Dose of Passively Administered Anti-Rh to Suppress Primary Immunization by a Relatively Large Dose of Rh-Positive Red Cells - *Brit. med. J.* 1, 150, 1968.
- 80) HUGHES-JONES N. C., STEVENSON M.: The Anti-D Content of IgG Preparations for Use in the Prevention of Rh Haemolytic Disease - *Vox Sang. (Basel)* 14, 401, 1968.

- 81) HUNTER O. B. J.: Cortisone in Rh Incompatibility - *J. Amer. med. Ass.* 154, 905, 1954.
- 82) HUTCHINSON D. L., MAXWELL N. G., TURNER J. H.: Advantages of Use of Maternal Erythrocytes for Fetal Transfusion - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 99, 702, 1967.
- 83) JACOBS W. R.: Fetal Survival Rates in Rh-Immunized Gravidas: Correlation of Antibody Titers and Past Obstetric History - *Obstet. and Gynec.* 19, 806, 1962.
- 84) JANDL J. H., JONES A. R., CASTLE W. B.: The Destruction of Red Cells by Antibodies in Man. I. Observations on the Sequestration or Lysis of Red Cells Altered by Immune Mechanisms - *J. clin. Invest.* 36, 1428, 1957.
- 85) JONES P., McNAY A., WALKER W.: Association between Foeto-Maternal Bleeding and Hypertension in Pregnancy - *Brit. med. J.* 3, 738, 1969.
- 86) JONES R. A., SILVER S.: The Detection of Minor Erythrocyte Populations by Mixed Agglutinates - *Blood* 13, 763, 1958.
- 87) JØRGENSEN J.: Rhesus-Antibody Development after Abortion - *Lancet* 2, 1253, 1969.
- 88) JOUVENCEAUX A.: Personal Communication, 1970.
- 89) JOUVENCEAUX A., ADENOT N., BERTHOUX F., REVOL L.: Gammaglobuline anti-D lyophilisée intra-veineuse pour la prévention de l'immunisation anti-Rh - Paper presented at 8th Congrès National de Transfusion Sanguine, Marseille, 1970.
- 90) KEITH L., CUVA A., HOUSER K., WEBSTER A.: Suppression of Primary Rh-Immunization by Anti-Rh - *Transfusion (Philad.)* 10, 143, 1970.
- 91) KELSALL G. A., VOS G. H., KIRK R. L.: Case for Induction of Labour in Treatment of Haemolytic Disease of the Newborn - *Brit. med. J.* 2, 486, 1958.
- 92) KIRBY D. R. S.: Transplantation and Pregnancy - In: RAPAPORT F. T., DAUSSET J. (Eds): *Human Transplantation*. Grune and Stratton, N.Y. and London, 1968; pp. 565-586.
- 93) KLEIHAUER E., BRAUM H., BETKE K.: Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten eines Blutaussstriches - *Klin. Wschr.* 35, 637, 1957.
- 94) KLIMAN A., LESSES M. F. L.: Plasmapheresis as a Form of Blood Donation - *Transfusion* 4, 486, 1964.
- 95) KNOX E. G.: Obstetric Determinants of Rhesus Sensitization - *Lancet* 1, 433, 1968.
- 96) KNOX E. G., MURRAY S., WALKER W.: Location of the Adventitious Factors in Haemolytic Disease of the Newborn - *Brit. J. prev. soc. Med.* 14, 77, 1960.
- 97) KNOX E. G., MURRAY S., WALKER W.: The Mechanisms of Rhesus Immunization - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth* 68, 11, 1961.
- 98) KNOX E. G., WALKER W.: Nature of the Determinants of Rhesus Immunization - *Brit. J. prev. soc. Med.* 11, 126, 1957.
- 99) KRISTOFFERSON K.: The Diagnostic Significance of Alkali-Resistant Haemoglobin in Maternal Blood during Pregnancy and Delivery - *Dan. med. Bull.* 2, 201, 1964.
- 100) LALEZARI P., BERNARD E.: An Isologous Antigen-Antibody Reaction with Human Neutrophils Related to Neonatal Neutropenia - *J. clin. Invest.* 45, 1741, 1966.
- 101) LEE D., NNATU S. N. N., HOUSTON J. K.: Incidence of Feto-Maternal Transfusion in Spontaneous Abortion - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth* 76, 1120, 1969.
- 102) LEVINE P.: The influence of the ABO System on Rh Haemolytic Disease - *Hum. Biol.* 30, 14, 1958.
- 103) LIGGINS G. C.: Current Indications for Intrauterine Transfusion - In: LUCEY J. F., BUTTERFIELD L. J. (Eds): *Intra-Uterine Transfusion and Erythroblastosis Fetalis: Report of 53rd Ross Conference on Pediatric Research* Columbus, Ohio, Ross Laboratories; p. 33.
- 104) LILEY A. W.: Liquor Amnii Analysis in the Management of the Pregnancy Complicated by Rhesus Sensitization - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 82, 1359, 1961.
- 105) LILEY A. W.: Errors in Assessment of Hemolytic Disease from Amniotic Fluid - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 86, 485, 1963.
- 106) LILEY A. W.: Intrauterine Transfusion of Foetus in Haemolytic Disease - *Brit. med. J.* 2, 1107, 1963.
- 107) LILEY A. W.: Intrauterine Transfusion - In: ROBERTSON J. G., DAMBROSIO F. (Eds): *The Rh Problem. Proceedings of the International Symposium on the Management of the Rh Problem*. Milan, 1969 - *Ann. Ostet. Gynec. (Special number)*, 130, 1970.
- 108) McLAREY C. D., FISH S. A.: Fetal Erythrocytes in the Maternal Circulation - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 95, 824, 1966.
- 109) MANDELBAUM B., LACROIX G. C., ROBINSON A. R.: Determination of Fetal Maturity by Spectrophotometric Analysis of Amniotic Fluid - *Obstet. and Gynec.* 29, 471, 1967.
- 110) MANDELBAUM B., ROBINSON A. R.: Amniotic Fluid Pigment in Erythroblastosis Fetalis - *Obstet. and Gynec.* 28, 118, 1966.
- 111) MARTI H. R., BÜTLER R.: Hämoglobin F- und Hämoglobin A₂ Vermehrung bei der Schweizer Bevölkerung - *Acta haemat. (Basel)* 26, 65, 1961.

- 112) MATTHEWS C. D., MATTHEWS A. E. B.: Transplacental Haemorrhage in Spontaneous and Induced Abortion - *Lancet* 1, 694, 1969.
- 113) MAYCOCK W. D'A.: Personal Communication, 1970.
- 114) MAYEDA K.: The Self Marker Concept as Applied to the Rh Blood Group System - *Amer. J. hum. Genet.* 14, 281, 1962.
- 115) MERRITT K., GALTON M.: Antibody Formation during Pregnancy - *Transplantation* 7, 562, 1969.
- 116) MISENHEIMER H. R.: Fetal Hemorrhage Associated with Amniocentesis - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 94, 1133, 1966.
- 117) MÖLLER G.: Studies on the Mechanism of Immunological Enhancement of Tumor Homografts. I. Specificity of Immunological Enhancement - *J. nat. Cancer Inst.* 30, 1153, 1963.
- 118) MOLLISON P. L.: Blood Group Antibodies and Red Cell Destruction - *Brit. med. J.* 2, 1035, 1959.
- 119) MOLLISON P. L.: *Blood Transfusion in Clinical Medicine* (4th edn.) - Blackwell Scientific Publications, 1967.
- 120) MOLLISON P. L., HUGHES-JONES N. C.: Clearance of Rh-Positive Cells by Low Concentration of Rh Antibody - *Immunology* 12, 63, 1967.
- 121) MOLLISON P. L., HUGHES-JONES N. C., LINDSAY M., WESSELY J.: Suppression of Primary Rh Immunization by Passively Administered Antibody. Experiments in Volunteers - *Vox Sang.* (Basel) 16, 421, 1969.
- 122) MOSIER D. E.: Cell Interactions in the Primary Immune Response in Vitro: a Requirement for Specific Cell Clusters - *J. exp. Med.* 129, 351, 1969.
- 123) MURRAY J., LATHE G. H., CLARK E. C., RATHVEN C. R. J., LEVINE M.: Inhibition of Haemagglutination by Lipids with Special Reference to Rh Hapten - *Brit. J. exp. Path.* 31, 566, 1950.
- 124) MURRAY S.: The Effect of Rh Genotypes on Severity in Haemolytic Disease of the Newborn - *Brit. J. Haemat.* 3, 143, 1957.
- 125) MURRAY S., BARRON S. L., McNAY R. A.: Transplacental Haemorrhage after Abortion - *Lancet* 1, 631, 1970.
- 126) NAIMAN J. L., PUNNETT H. H., LISCHNER H. W., DESTINE M. L., AREY J. B.: Possible Graft-Versus-Host Reaction after Intrauterine Transfusion for Rh Erythroblastosis Fetalis - *New Engl. J. Med.* 281, 697, 1969.
- 127) NEVANLINNA H. R.: Factors Affecting Maternal Rh Sensitisation - *Ann. Med. exp. Fenn.* 31, (suppl. 2), 1953.
- 128) NEVANLINNA H. R., VAINIO T.: The Influence of Mother-Child ABO Incompatibility on Rh Immunization - *Vox Sang.* (Basel) 1, 26, 1956.
- 129) NEVANLINNA H. R., VAINIO T.: An Attempt to Calculate the Probability of Rh Immunization during Pregnancy - *Proc. 8th Congr. int. Soc. Blood Transf., Tokyo* 1960, 1962.
- 130) NIERHAUS K., BETKE K.: Eine vereinfachte Modifikation der sauren Elution für die cytologische Darstellung von fetalem Hämoglobin - *Klin. Wschr.* 46, 47, 1968.
- 131) OVERWEG J., ENGELFRIET C. P.: Cytotoxic Leucocyte Iso-Antibodies Formed during the First Pregnancy - *Vox Sang.* (Basel) 16, 97, 1969.
- 132) OWEN R. D., WOOD H. R., FOORD A. G., STURGEON P., BALDWIN L. G.: Evidence for Actively Acquired Tolerance to Rh Antigens - *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 40, 420, 1954.
- 133) PEARSE W. H., HOBEL C.: Inhibition of Rh Antibodies - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 89, 46, 1964.
- 134) PEDDLE L. J.: Increase of Antibody Titer Following Amniocentesis - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 100, 567, 1968.
- 135) PEER L. A., BERNHARD W., WALKER J. C.: Full Thickness Skin Exchange between Parents and Their Children - *Amer. J. Surg.* 95, 229, 1968.
- 136) PENNINGTON G. W., HALL R.: Method for the Determination of Small Amounts of Bilirubin in Liquor Amnii and Other Body Fluids - *J. clin. Path.* 19, 90, 1966.
- 137) PIERCE C. W.: Immune Responses in Vitro. II. Suppression of the Immune Response in Vitro by Specific Antibody - *J. exp. Med.* 130, 365, 1969.
- 138) POLLACK W.: Personal Communication, 1970.
- 139) POLLACK W., GORMAN J. G., HAGER H. J., FRED A. V. J., TRIPODI D.: Antibody-Mediated Immune Suppression to the Rh Factor: Animal Models Suggesting Mechanism of Action - *Transfusion* (Philad.) 8, 134, 1968.
- 140) POLLACK W., KOCHESKY R. J.: The Importance of Antibody Concentration Binding Constant and Heterogeneity in the Suppression of Immunity to the Rh Factor - *Int. Arch. Allergy* 38, 320, 1970.
- 141) POLLOCK A.: Transplacental Haemorrhage after External Cephalic Version - *Lancet* 1, 612, 1968.

- 142) POWELL L. C. J.: Intense Plasmapheresis in the Pregnant Rh-Sensitized Woman - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 101, 153, 1968.
- 143) QUEENAN J. T.: Intrauterine Transfusion. A Co-Operative Study - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 105, 397, 1969.
- 144) QUEENAN J. T., GOETSCHEL E.: Amniotic Fluid Analysis for Erythroblastosis Fetalis - *Obstet. and Gynec.* 32, 120, 1968.
- 145) QUEENAN J. T., LANDESMAN R., NAKAMOTO M., WILSON K. H.: Post-Partum Immunization - *Obstet. and Gynec.* 20, 774, 1962.
- 146) RENKONEN K. O., SEPPÄLÄ M.: The Sex of the Sensitizing Rh-Positive Child - *Ann. Med. exp. Fenn.* 40, 108, 1962.
- 147) RENKONEN K. O., TIMONEN S.: Factors Influencing the Immunization of Rh-Negative Mothers - *J. med. Genet.* 4, 166, 1967.
- 148) ROBERTSON J. G.: Personal Communication, 1970.
- 149) ROWLEY D. A., FITCH F. W.: Homeostasis of Antibody Formation in the Adult Rat - *J. exp. Med.* 120, 987, 1964.
- 150) RUCKNAGEL D. L., CHERNOFF A. I.: Immunologic Studies of Hemoglobins. III. Fetal Hemoglobin Changes in the Circulation of Pregnant Women - *Blood* 10, 1092, 1955.
- 151) SAVAGE R. D., WALKER W., FAIRWEATHER D. V. I., KNOX E. G.: Quantitative Estimation of Bilirubin in Liquor Amnii - *Lancet* 2, 816, 1966.
- 152) SCHENKER S., DAWBER N. H., SCHMID R.: Bilirubin Metabolism in the Fetus - *J. clin. Invest.* 43, 32, 1964.
- 153) SCHNEIDER J.: Rh Immunization - *Proc. 11th Congr. Int. Soc. Blood Transf., Sydney, 1966. Part I (Karger, Basel/New York, 1968); p. 284.*
- 154) SCHNEIDER J.: Personal Communication, 1970.
- 155) SHAPIRO M.: Personal Communication, 1970.
- 156) SPENSIERI S., CARNEVALE A. E., CALDANA P. L.: Isoimmunizzazione Rh e passaggio trapiacentare di eritrociti fetali - *Monit. ostet.-ginec.* 39 (suppl.), 889, 1968.
- 157) STERN K., GOODMAN H. S., BERGER M.: Experimental Isoimmunization to Hemoantigens in Man - *J. Immunol.* 87, 189, 1961.
- 158) STERZL J.: Immunological Tolerance as the Result of Terminal Differentiation of Immunologically Competent Cells - *Nature (Lond.)* 209, 416, 1966.
- 159) STURGEON P., JENNINGS E. R.: Anti-Gammaglobulins in Women Treated with anti Rh Gammaglobulin - *Transfusion (Philad.)* 8, 343, 1968.
- 160) SULLIVAN J. F., JENNINGS E. R.: Transplacental Fetal-Maternal Hemorrhage - *Amer. J. clin. Path.* 46, 36, 1966.
- 161) SZELÉNYI J. G., HOLLÁN S. R.: A New Method for the Cytological Differentiation of Foetal and Adult Erythrocytes - *Vox Sang. (Basel)* 12, 234, 1967.
- 162) TAO T., UHR J. W.: Capacity of Pepsin-Digested Antibody to Inhibit Antibody Formation - *Nature (Lond.)* 212, 208, 1966.
- 163) TAYLOR J. F.: Sensitization of Rh-Negative Daughters by their Rh-Positive Mothers - *New Engl. J. Med.* 276, 547, 1967.
- 164) TERRY M. F.: A Management of the Third Stage to Reduce Feto-Maternal Transfusion - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth* 77, 129, 1970.
- 165) TOVEY D.: The Place of Antibody Titre Estimation in the Management of Women with Anti-D Antibodies - *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth* 76, 117, 1969.
- 166) UHR J. W., MÖLLER G.: Regulatory Effect of Antibody on the Immune Response - *Advanc. Immunol.* 8, 81, 1968.
- 167) VOAK D.: The Pathogenesis of ABO Haemolytic Disease of the Newborn - *Vox Sang. (Basel)* 17, 481, 1969.
- 168) VOIGT J. C., BRITT R. P.: Feto-Maternal Haemorrhage in Therapeutic Abortion - *Brit. med. J.* 4, 395, 1969.
- 169) WADE M. E., GORDON R. O., MITCHELL M. S.: Chemical Suppression of Primary and Anamnestic Maternal Immunization in Rh-Incompatible Pregnancies. An Animal Model - *Amer. J. Obstet. Gynec.* 106, 286, 1970.
- 170) WADE M. E., OGDEN J. A., DAVIS C. D.: Intrauterine Fetal Transfusion-Analysis of the Experience at the Yale-New Haven Medical Centre - *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaec.* 9, 67, 1969.
- 171) WALKER J. G., SISKIND G. W.: Studies on the Control of Antibody Synthesis. Effect of Antibody Affinity upon its Ability to Suppress Antibody Formation - *Immunology* 14, 21, 1968.
- 172) WALLACE J., MACDOUGALL J. Y.: Personal Communication, 1970.

- 173) WALSH J. J., LEWIS B. V.: Transplacental Haemorrhage Due to Termination of Pregnancy - J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth 77, 136, 1970.
- 174) WANG M. Y. F. W., MCCUTCHEON E., DESFORGES J. F.: Feto-Maternal Hemorrhage from Diagnostic Transabdominal Amniocentesis - Amer. J. Obstet. Gynec. 97, 1123, 1967.
- 175) WHITFIELD R. C., NEELY R. A., TELFORD M. E.: Amniotic Fluid Analysis in Rhesus Iso-Immunitization - J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth 75, 121, 1968.
- 176) WIMHÖFER H., SCHNEIDER J., LEIDENBERGER F.: Untersuchungen über die Einschwemmung fetaler Erythrozyten in den mütterlichen Kreislauf bei Spontangeburt und geburtshilflichen Eingriffen - Geburtsh. u. Frauenheilk. 22, 589, 1962.
- 177) WOODROW J. C.: Rh Immunization and its Prevention - Series Haematologica, Munksgaard, Copenhagen, III, 3, 1970.
- 178) WOODROW J. C., BOWLEY C. C., GILLIVER B. E., STRONG S. J.: Prevention of Rh Immunization Due to Large Volumes of Rh Positive Blood - Brit. med. J. 1, 148, 1968.
- 179) WOODROW J. C., DONOHOE W. T. A.: Rh-Immunization by Pregnancy: Results of a Survey and their Relevance to Prophylactic Therapy - Brit. med. J. 4, 139, 1968.
- 180) WOODROW J. C., FINN R.: Transplacental Haemorrhage - Brit. J. Haemat. 12, 297, 1966.
- 181) World Health Organization: The Suppression of Rh Immunization by Passively Administered Human Immunoglobulin (IgG) anti-D (anti-Rho) - Bull. Wld Hlth Org. 36, 467, 1967.
- 182) ZEITLIN R. A., BOORMAN K. E.: The Prognostic Value of Coombs and Partial Absorption Titrations in Haemolytic Disease of the Newborn - J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth 70, 798, 1963.
- 183) ZIPURSKY A., ISRAELS L. G.: The Pathogenesis and Prevention of Rh Immunisation - Canad. med. Ass. J. 97, 1245, 1967.
- 184) ZIPURSKY A., POLLOCK J., CHOWN B., ISRAELS L. G.: Transplacental Foetal Haemorrhage after Placental Injury during Delivery or Amniocentesis - Lancet 2, 493, 1963.
- 185) ZOUTENDYK A.: Haemolytic Disease of the Newborn in South Africa - S.A. Institute for Medical Research no. LI (vol. 12), Johannesburg, 1962.

Requests for reprints should be addressed to:

JOHN C. WOODROW
*Nuffield Unit of Medical Genetics
 University of Liverpool
 Liverpool - Great Britain*

Traduzione a cura della Redazione.