

93. P. ZANNELLI. — Fattori del sangue e trasfusione.

Riassunto. — L'A. ha esposta la evoluzione storica e scientifica dei fattori sanguigni e delle corrispondenti agglutinine regolari ed irregolari, e ne ha dimostrata l'importanza nella classificazione dei gruppi sanguigni, nella trasfusione e nella clinica.

La trattazione di questi complessi problemi è stata più ampia per il fattore Rh ed i processi isoimmunitari collegati alla sua presenza nel sangue umano.

Résumé. — L'A. a fait une exposition sur l'évolution historique et scientifique des facteurs sanguins et des correspondantes agglutinines régulières et irrégulières, et a démontré l'importance de ces éléments dans la classification des groupes sanguins, la transfusion et la clinique.

L'étude de ces complexes problèmes a été plus étendue pour le facteur Rh et les processus d'iso-immunisation liés à sa présence dans le sang humain.

Summary. — A survey has been made by the A. of the historical and scientific evolution of the blood factors and the corresponding regular and irregular agglutinins of which he has demonstrated the importance in the classification of the blood groups, in the transfusion and in clinic.

In discussing these intricate problems, the part relating to the Rh factor and the iso-immunization processes connected with its presence in the human blood has been more extensively dealt with.

Zusammenfassung. — Der Verfasser hat die geschichtliche und wissenschaftliche Entwicklung der Blutfaktoren und der entsprechenden regel- und unregelmässigen Agglutininen geschildert und hat deren Wichtigkeit in der Klassifizierung der Blutgruppen, in der Transfusion und in der Klinik nachgewiesen.

Die Behandlung dieser komplizierten Probleme ist für den Rh Faktor und für die mit seinem Vorkommen im menschlichen Blut verbundenen Isoimmunitätsprozesse, ausführlicher gewesen.

CENNI STORICI SULLA TRASFUSIONE DEL SANGUE

Il sangue a scopo curativo presso antichi popoli veniva somministrato per via orale come elemento non solo di forza fisica ma anche spirituale, poichè si riteneva che in esso fosse la sede dell'anima.

Plinio e Celso narrano che il popolo romano si precipitasse nella pubblica arena a bere il sangue dei gladiatori morenti.

Secondo la leggenda, Tanaquilla, moglie di Tarquinio Prisco, 677 a. C., offrì il proprio sangue per salvare il consorte ferito a morte per assassinio.

Di terapia trasfusionale fa cenno Ovidio nel libro VII delle *Metamorfosi*, quando racconta che Medea, per ringiovanire Pelia, consigliò di dissanguarlo, e di riempire le sue vene di sangue giovanile.

I primitivi medici Egizi prescrivevano il bagno di sangue ai Faraoni ed ai principi dell'Impero, ed eseguivano anche la trasfusione, di cui si trovano pure tracce all'epoca della civiltà ebraica, romana ed araba.

In un antico libro ebraico citato dal dott. Davide Eichmann è riferito che il re di Siria Naam, malato di lebbra, ricorse ai medici del tempo, i quali, per guarirlo, tolsero sangue dalle sue vene e lo sostituirono con altro sangue.

Dopo la caduta dell'impero romano mancano notizie relative alla terapia per mezzo del sangue, la quale venne poi ripresa nel medio evo verso il XIV e XV secolo.

Marsilio Ficino nel 1479, allo scopo di prolungare la vita, consigliava ai vecchi di bere sangue di giovani sani e robusti, assicurando loro successi meravigliosi.

Il Vittori nella vita di Girolamo Savonarola narra che la prima trasfusione di sangue venne eseguita nell'aprile del 1492 al papa Innocenzo VIII da un medico ebreo per mezzo di sangue prelevato a tre fanciulli decenni, i quali morirono poco dopo, verosimilmente, per l'abbondante salasso subito.

Anche Gregorovius sembra confermare tale episodio che tuttavia non è storicamente accertato.

Più tardi, un notevole progresso si ebbe nella pratica emotrasfusionale con la scoperta della trasfusione del sangue fatta dal nostro Andrea

Cesalpino nel 1569 e pubblicata nel 1571 nel suo libro « *Quaestionum peripateticarum* », quindi circa mezzo secolo prima della comunicazione fatta da Harvey nel 1628 nella sua monografia « *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* ».

Girolamo Cardano e Mario Pagelio nel XVI secolo pensano alla possibilità di trasfondere sangue dalla vena di un individuo a quella di un altro.

Nel 1615 Liborius di Halle, sebbene non risulti che abbia effettivamente eseguita la trasfusione di sangue ne descrisse la tecnica quasi simile a quella in uso ai nostri tempi che merita di essere ricordata per la sua precisione.

Egli scrive: « Si è in presenza di un giovane robusto, pieno di sangue spiritoso e di un vecchio smilzo, emaciato, esausto di forze, capace di ritenere, a stento, la sua anima.

L'operazione si esegue per mezzo di due tubi d'argento.

Aperta l'arteria del giovane, vi si introduce un tubo fissandolo nel vaso, ed immediatamente, aperta l'arteria del vecchio ed introdottovi l'altro tubo, i due tubi vengono insieme congiunti, ed il caldo e spiritoso sangue del giovane si verserà nel vecchio come una fonte di vita, e la sua debolezza scomparirà ».

Circa la stessa epoca venivano praticate trasfusioni di sangue tra animali della stessa specie, e nel 1667 in Francia Denys professore di filosofia, di matematica e di medicina, in collaborazione col chirurgo Emmeretz eseguì la prima trasfusione nell'uomo immettendo nella vena di un luetico sangue prelevato dalla carotide di un agnello.

Le prime due trasfusioni vennero eseguite senza alcun incidente ma alla terza il braccio del paziente divenne rosso, edematoso, la fronte si coprì di sudore, le orine divennero nerastre, mentre il malato accusava dolore ai lombi ed eccitamento al vomito.

Alla quarta trasfusione seguì esito letale.

La moglie del morto ricorse alla Corte di Giustizia, la quale, pur esonerando il Denys da ogni responsabilità, proibì le trasfusioni di sangue, a meno che i medici non venissero autorizzati dalla facoltà di medicina.

E più tardi, in seguito al rinnovarsi di altri accidenti letali, il parlamento francese legalizzò il divieto della trasfusione di sangue.

In Italia, nell'istesso periodo di tempo, non mancarono ricerche sulla trasfusione del sangue da animali all'uomo per opera di alcuni studiosi, come Girolamo Cardano, Giovanni Colle di Cividale e Francesco Folli il quale merita di essere ricordato in maniera particolare.

Nato in Arezzo nel 1624 e morto a S. Sepolcro nel 1685, fu medico insigne e di vasta cultura in ogni settore della medicina.

Egli ebbe un concetto ben chiaro sulla possibilità di eseguire la trasfusione del sangue non solo nella cura di alcune malattie, ma anche per il ringiovanimento dei soggetti minorati con gli anni nelle loro attività. Ed a tale scopo egli ideò un ingegnoso apparecchio descritto da Adalberto Pazzini in un discorso commemorativo che egli tenne a Poppi il 29 settembre 1935 sull'opera del Folli. Nella stessa epoca l'artigiano Guglielmo Riva di Roma, Manfredi, Baglivi, Vallisneri ed altri eseguirono trasfusioni di sangue da animali all'uomo.

Intanto le difficoltà della tecnica, l'assenza di esatte indicazioni terapeutiche, gli inconvenienti gravi e talora letali consecutivi alle trasfusioni da animali all'uomo, ne fece cadere l'uso in tutto il mondo per un periodo di centocinquanta anni.

Fu soltanto nel 1818 che il chirurgo inglese James Blundell, constatando i numerosi casi di morte che si verificavano nelle sale di maternità pensò di ricorrere alla trasfusione interumana.

Contemporaneamente ricerche venivano eseguite per migliorare e semplificare la tecnica della trasfusione allo scopo di impedire la coagulazione del sangue, e di conoscere le cause degli incidenti che si verificavano nella trasfusione da animali all'uomo e da uomo a uomo.

Per quanto riguarda la tecnica essa venne perfezionata verso il 1900 da chirurghi americani.

Fra questi George Crile de Cleveland, allo scopo di mantenere costante ed immodificato il flusso del sangue, riuscì, per mezzo di una piccola cannula, ad anastomizzare la vena del donatore con quella del ricevente per modo che il rivestimento continuo dell'intima impedisse la coagulazione del sangue.

Per quanto ingegnosa, la tecnica del Crile venne abbandonata perchè richiedeva una particolare abilità chirurgica, e non era possibile mi-

surare la quantità di sangue da trasfondere. Oltre a ciò l'arteria non poteva essere utilizzata che una o due volte.

In seguito la tecnica venne semplificata con l'uso di cannule e di apparecchi paraffinati per impedire la coagulazione.

Nel campo scientifico Landois e Pannum ⁽¹⁾ dimostrarono che mentre un animale salassato veniva conservato in vita con la trasfusione di di sangue di un animale della stessa specie moriva, invece, se si fosse adoperato sangue di un animale di specie differente.

Landois, inoltre, pose in evidenza che nella miscela in vitro di sangue umano con sangue di altri animali si verificava l'emolisi delle emazie.

Di notevole importanza furono le successive ricerche di Bordet ⁽²⁾ il quale dimostrò che il siero di sangue di un animale agglomerava i globuli rossi di un animale di specie differente.

Tale fenomeno è, talvolta, di una intensità veramente sorprendente, come nel caso del siero di sangue di pollo che agglomera istantaneamente le emazie del ratto e del coniglio.

Quasi nello stesso tempo, da ricerche di altri studiosi risultò che il siero di alcuni malati era capace di agglutinare le emazie di individui sani, attribuendo alla isoagglutinazione un valore diagnostico.

SCOPERTA DEI GRUPPI SANGUIGNI

Anche Landsteiner ⁽³⁾ fece occasionalmente le stesse osservazioni, ma proseguendo, nelle sue indagini dimostrò poi, per il primo, l'esistenza di un potere agglutinante nel siero di individui normali, e che le proprietà isoagglutinanti erano differenti negli individui per cui essi potevano essere distinti in tre gruppi.

La scoperta di Landsteiner, per la quale egli venne insignito del premio Nöbel, fu decisiva per rialzare le sorti della trasfusione del sangue che era stata sostituita dall'uso di soluzioni di cloruro di sodio, di glucosio e di altre sostanze perchè di più facile applicazione e, generalmente, esenti da inconvenienti più o meno gravi o mortali che sembravano inevitabili nella pratica emotrasfusionale.

⁽¹⁾ LANDOIS e PANNUM, *Die transfusion des Blutes* Leipzig (1875).

⁽²⁾ BORDET, *Ann. Inst. Pasteur*, 12, 688 (1898).

⁽³⁾ LANDSTEINER, *Zentralbl. f. Bakt., Parasiten und Infektions Krankh.*, 27, 357 (1900); *Id., Wien. Klin. Woch.*, 14, 1132 (1901).

Gruppi sanguigni A, B, AB, O. — I tre gruppi sanguigni furono così classificati: 1°) individui di cui le emazie non sono agglutinate dai sieri dei gruppi 2 e 3, ma il cui siero agglutina le emazie dei gruppi 2 e 3; 2°) individui di cui le emazie sono agglutinate dai sieri 1 e 3, e il cui siero agglutina le emazie 3; 3°) individui di cui le emazie sono agglutinate dai sieri 1 e 2 e di cui il siero agglutina le emazie 2.

In successive ricerche Decastello e Sturli, collaboratori di Landsteiner, constatarono l'esistenza di un quarto gruppo privo di sostanze agglutinanti, ma di cui le emazie venivano agglutinate dai sieri 1, 2, 3.

Jansky (1907) e Moss (1910), studiando il problema dei gruppi sanguigni, indipendentemente l'uno dall'altro, ne stabilirono i rapporti in due schemi differenti soltanto per la numerazione inversa dei gruppi I e IV.

Dungern e Hirszfeld (1910) proposero un'altra nomenclatura in cui le emazie venivano considerate come agglutinogeni e le sostanze agglutinanti isoagglutinine.

Gli agglutinogeni vennero designati con le lettere A, B, AB, O; e le isoagglutinine con le lettere greche α e β .

Esse sono termostabili fino a 60°, e reagiscono con gli agglutinogeni in assenza del complemento.

I rapporti tra agglutinogeni ed isoagglutinine sono riassunti nella formula seguente $A\beta$, $B\alpha$, AB_0 , $O\alpha\beta$. Nel gruppo A l'agglutinogeno A coesiste con l'isoagglutinina β o anti B; nel gruppo B l'agglutinogeno B coesiste con l'isoagglutinina α o anti A; il gruppo AB è privo di isoagglutinine; nel gruppo O (zero) mancano gli agglutinogeni A e B e sono presenti le isoagglutinine anti A e anti B. I rapporti tra le nomenclature indicate sono esposti nella seguente tabella.

V. Dungern—Hirszfeld	Jansky	Moss
A	II	II
B	III	III
AB	IV	I
O	I	IV

L'esistenza di queste tre diverse classificazioni poteva dar luogo ad errori nella determinazione dei gruppi sanguigni con conseguenze gravi per la trasfusione del sangue e pertanto la Commissione Internazionale

per lo studio dei gruppi sanguigni tenuta a Parigi presso l'Istituto di Antropologia il 15 luglio 1929, riconoscendo la necessità di adottare una sola nomenclatura, prescelse quella di Dungern e Hirszfeld.

Le sostanze gruppo specifiche presenti nel sangue ne costituiscono la individualità i cui caratteri sono immutabili.

E' da notare che tali sostanze oltre che nel sangue si trovano, pur in quantità diverse, nei tessuti ed in molti individui detti secretori anche nei liquidi e nelle secrezioni del corpo.

Per maggiore esattezza, quindi, osserva Lattes, i gruppi sanguigni, in un più largo significato biologico, dovrebbero essere considerati come particolari gruppi cellulari.

La seguente tabella riportata da Wiener mostra la diversa concentrazione di alcune di queste sostanze.

RELATIVE CONCENTRATION OF GROUPS-SPECIFIC SUBSTANCE IN VARIOUS
BODY FLUIDS AFTER PUTKONEN

Saliva	.	.	.	.	.	128	-	1024
Semen	.	.	.	.	.	128	-	1024
Amniotic fluid	.	.	.	.	.	64	-	256
Erythrocytes	.	.	.	.	.	8	-	32
Tears	.	.	.	.	.	2	-	8
Urine	.	.	.	.	.	2	-	4
Cerebrospinal fluid	.	.	.	.	.	0		

Sottogruppi A₁, A₂. — Studi successivi di V. Dungern e Hirszfeld ⁽⁴⁾, Landsteiner e Levine ⁽⁵⁾, come vedremo in seguito, con maggiori dettagli, misero in evidenza che l'agglutinogeno A non era una singola sostanza, ma di essa esistevano due varietà o sottogruppi, A₁, A₂ e che la isoagglutina anti A risultava composta di due frazioni, un'isoagglutina anti A propriamente detta ed un'isoagglutina anti A₁.

Fattori sanguigni M, N, MN. — Landsteiner e Levine ⁽⁶⁾ osservarono inoltre che, inoculando nei conigli sangue di uno dei quattro gruppi

⁽⁴⁾ V. DUNGERN e HIRSZFELD, Zeits. f. Immunitäts, 8, 526 (1911).

⁽⁵⁾ LANDSTEINER e LEVINE, Journ. of Immunol., 18, 87 (1930).

⁽⁶⁾ LANDSTEINER e LEVINE, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 24, 600-945 (1927); Id., J. Exp. Med., 47, 775, 757 (1928).

sanguigni, si otteneva un siero immune che, assorbito dai rispettivi antigeni, agglutinava ancora un certo numero di emazie umane nelle quali essi identificarono altri due fattori o agglutinogeni designati con i simboli M e N.

Si ebbero, così, altri tre tipi di sangue, un tipo M contenente un agglutinogeno M, un secondo tipo N contenente l'agglutinogeno N ed un terzo tipo MN che li contiene entrambi.

Gli agglutinogeni M N si trovano normalmente in ciascuno dei quattro classici gruppi sanguigni formando le seguenti combinazioni: A M, A N, A M N; B M, B N, B M N; A B M, A B N, A B M N; O M, O N, O M N.

Isoagglutinine anti M ed anti N mancano nei sieri normali e solo eccezionalmente furono riscontrate isoagglutinine anti M in nove sieri, e isoagglutinine anti N in sette.

Altri fattori. — Gli stessi AA., inoltre, in sieri assorbiti dagli agglutinogeni A, B, M, N trovarono un anticorpo che agglutinava altri eritrociti umani il quale venne indicato col nome di agglutinina anti P.

Questa agglutinina può anche ottenersi, con successive prove di saturazione, da sieri di cavallo e di maiale, e la sua presenza è stata trovata, sebbene assai raramente, anche in qualche siero umano.

Il corrispondente agglutinogeno venne designato con il simbolo P.

Una varietà dell'agglutinogeno P è rappresentata, probabilmente, dall'agglutinogeno Q isolato, per saturazione, dal siero di maiale da Furukata e Imamura (⁷).

Schiff (⁸) constatò che gli immunisieri anti M e anti N possono contenere un'altra agglutinina che reagisce con un agglutinogeno che fu indicato col simbolo G, che sarebbe identico all'agglutinogeno X di Andresen.

Lo stesso A. ha descritto inoltre un agglutinogeno H, il quale reagisce con agglutinina H isolata dal siero di montone mediante la tecnica dell'adsorbimento, ed è presente nel 68% delle emazie umane.

Sugishita (⁹) ha trovato che il siero normale di anguilla agglutina a diverso titolo alcune emazie umane, identificando in esse due sostanze

(⁷) FURUKATA e IMAMURA, Jap. J. Genetic (in giapponese), 11, 91 (1935).

(⁸) SCHIFF, Wissensch. Woch. Frankfurt (1935), T. I. 145.

(⁹) SUGISHITA, Inzenkai (Japanese), 40 (1938) e ibid., 40, 3367 (1935) riportato da ALEXANDER S. WIENER. Blood Groups and transfusion.

E ed e di natura ereditaria, analoghe a quelle dimostrabili con il siero anti O.

Riassumendo, fino al 1935, gli agglutinogeni noti nei gruppi e sottogruppi sanguigni umani erano i seguenti: A₁, A₂, B, AB, A₁B, A₂B, O, M, N, P, Q, G, H, E.

Una differenza fondamentale tra questi tipi di sangue risulta dalla presenza di isoagglutinine dette regolari nel sangue contenente gli agglutinogeni A₁, A₂ e B e nel sangue del gruppo O, le quali mancano nel sangue contenente gli altri fattori salvo qualche eccezione per le isoagglutinine anti M, anti N e anti P.

Le agglutinine che si riscontrano nel sangue contenente tali fattori sono dovute ad un processo di immunizzazione legato allo stimolo dei corrispondenti agglutinogeni.

Esse vengono chiamate agglutinine irregolari o immunagglutinine.

La scoperta dei quattro gruppi classici e degli altri fattori risultò di eccezionale importanza nella trasfusione del sangue, poichè consentì di conoscere le cause di incompatibilità rimaste precedentemente ignorate, e di suggerire le norme per eliminarle.

La classificazione dei vari tipi di sangue bene a ragione, può definirsi, quindi, la fase iniziale della trasfusione.

E', pertanto, utile esporne la tecnica dalla cui esattezza dipende, soprattutto, l'esito favorevole della emotrasfusione.

DETERMINAZIONE DEI FATTORI NEI GRUPPI SANGUIGNI

Fattori A, B, AB, O. — Questa consiste nel porre a contatto il sangue da classificare con sieri emodiagnostici contenenti le isoagglutinine anti A e anti B. La prova può eseguirsi con l'uso dei vetrini portaoggetti comuni o con due concavità, delle note vaschette Cuboni, di tubi, ed anche di speciali cartoni (Centro della trasfusione - Parigi).

I sieri emodiagnostici devono possedere un titolo elevato circa 1/128 per l'agglutinina anti A, ed 1/64 per l'agglutinina anti B, ed essere prive di emolisine la cui presenza può mascherare od anche inibire l'agglutinazione.

Ad evitare tale inconveniente si riscalda il siero a 56° per mezz'ora, o si usa dopo averlo tenuto per circa una settimana in frigorifero a +4° C.

I sieri emodiagnostici umani sono preferibili a quelli ottenuti mediante immunizzazione degli animali.

Quanto al sangue si è dimostrato adatto alla prova una sospensione di emazie di media sensibilità al 2% in soluzione di cloruro di sodio 0,85%. (In seguito questa soluzione verrà indicata semplicemente soluzione salina).

Tale sospensione si ottiene versando in un cm^3 di soluzione salina una goccia di sangue, cm^3 0,02, prelevato dal dito o dal lobulo dell'orecchio.

Quando si voglia disporre di una maggiore quantità, il sangue si preleva da una vena versandolo in un tubo contenente un anticoagulante.

L'anticoagulante da me comunemente usato è così composto:

Citrato trisodico	g	100
Cloruro di sodio	g	12,50
Acqua distillata sterile	g	1000

Per la dose di anticoagulante da aggiungere al sangue si tenga presente che per evitare la coagulazione di 100 cm^3 di sangue occorrono g 0,40 di citrato trisodico.

Il sangue reso incoagulabile si centrifuga a 1000 giri per cinque minuti primi per eliminare il plasma, e poi si lava con soluzione salina e si centrifuga ancora una od al massimo due volte.

Ciò fatto, dopo aver aspirato la soluzione salina per mezzo di una pipetta Pasteur sterile, cercando di non toccare la superficie del sedimento, si prepara la sospensione salina di sangue al 2%.

Praticamente cm^3 0,10 di sangue si aggiungono a cm^3 5 di soluzione salina.

Adoperando vetrini o vaschette Cuboni per mezzo di due differenti pipette si pone una goccia di siero anti B (gruppo A) a sinistra ed una goccia di siero anti A (gruppo B) a destra.

A ciascuna goccia di siero si aggiunge una goccia della sospensione di sangue evitando di usare la stessa pipetta adoperata per i sieri.

Le pipette devono essere protette con cotone all'estremità prossimale allo scopo di evitare che la saliva, la quale può contenere sostanze gruppo specifiche, venga a contatto con le isoagglutinine e le assorba.

Per mezzo di una bacchettina di vetro o con movimenti ondulatori dei vetrini o delle vaschette si cercherà di rendere omogenea la miscela.

Solo dopo dieci minuti, ad occhio nudo o per mezzo di una lente a mano, si procede alla lettura della reazione che è utile protrarre fino a 30° minuti.

Quando l'agglutinazione è positiva le emazie si riuniscono in ammassi più o meno grandi e, se sottoposti a moderato scuotimento, si dividono in aggregati più piccoli galleggianti in liquido chiaro.

Se negativa i corpuscoli rossi si mostrano dispersi in maniera uniforme nel liquido colorato in rosa.

Se l'agglutinazione si nota nella miscela posta a sinistra il sangue appartiene al gruppo B, se a destra il sangue appartiene al gruppo A, se esiste in entrambe le miscele il sangue appartiene al gruppo AB, se manca il sangue appartiene al gruppo O.

Un duplice controllo è poi necessario, porre, cioè, a contatto i sieri emodiagnostici adoperati con emazie di cui è accertata l'appartenenza ai gruppi A e B ed il grado di sensibilità e trattare le emazie con i sieri dei gruppi AB ed O.

E' sempre utile inoltre eseguire l'esame microscopico a debole ingrandimento (oculare 4 c, obiettivo 3-5 K).

A tale scopo si preleva una goccia di sangue da ciascuna miscela con una pipetta Pasteur e per mezzo della sua estremità distale si distende su un vetrino porta oggetti con delicatezza per evitare la disgregazione degli agglutinati specie nel caso di reazioni deboli.

Questo inconveniente può verificarsi anche applicando sulla miscela un vetrino coprioggetti.

Un metodo pressochè identico descritto da Riddel viene adoperato nei laboratori russi e differisce dal precedente perchè si adopera sangue non diluito.

Una goccia di siero insieme con una goccia di sangue intero è posta in una capsula di vetro opale a superficie liscia ed omogenea.

In caso di necessità i tecnici russi si servono di piccole capsule bianche per inchiostro di china, e, financo, di piattini di caffè rovesciati.

In ambiente molto freddo è opportuno porre la miscela in termostato o riscaldare la capsula prima dell'uso.

L'agglutinazione positiva deve essere visibile entro pochi minuti, altrimenti la miscela, essiccandosi verso la periferia e divenuta più densa nel centro, può dar luogo all'impilamento.

Il metodo garantisce una facile ed esatta diagnosi purchè si adoperi una concentrazione di sieri non minore di 1/100.

Presso il servizio di trasfusione di sangue a Londra il metodo è stato eseguito con successo nella determinazione di gruppo su circa 10.000 donatori di sangue.

Allorchè si esegue la determinazione di gruppo per mezzo di tubi si adoperano tubi da emolisi lunghi 6-8 cm con diametro interno di 7 mm.

La miscela sangue e siero agglutinante si compie come è stato indicato precedentemente.

La reazione, in genere, è visibile entro pochi minuti, ma la lettura definitiva deve essere fatta dopo un'ora.

Essa può accelerarsi e rendersi più evidente centrifugando i tubi a 2000 giri per circa un minuto.

Anche usando questo metodo non si deve omettere il duplice controllo precedentemente indicato, e l'osservazione microscopica.

Un altro metodo è quello capillare di Ponzold ⁽¹⁰⁾.

Si usano tubetti capillari a pareti sottili, lunghi 8-10 cm, larghi da 1/2-1 mm.

Il siero, presso a poco una goccia, viene aspirato per capillarità nel tubetto occupando circa un quarto della sua lunghezza. Vi si aggiunge la stessa quantità di sospensione 2% di emazie in maniera che queste vengano a contatto con il siero senza interposizione di aria.

Con alterni movimenti di inclinazione del tubetto si rende omogenea la miscela. Non è necessario chiudere il capillare.

La lettura della reazione si esegue ad occhio nudo e può venire facilitata incollando il tubetto nella direzione della lunghezza su una lastra di vetro bianco opaco.

Quando è positiva le emazie sono allineate come in un filo di perle.

Mancando la evaporazione l'andamento della reazione può essere osservato più a lungo il che rappresenta un vantaggio per sieri testo deboli ed agglutinogeni resistenti.

(10) PENZOLD, Munch. Med. Woch., 80, 1594 (1935).

Il metodo richiede inoltre piccole quantità di materiale e viene utilizzato per ricerche in serie.

PROVA CROCIATA

Quando si tratti di trasfusione d'urgenza e non si conoscano i gruppi del donatore e del ricevente si ricorre alla prova crociata.

Da un dito o dal lobulo di un orecchio del donatore e del ricevente si prelevano tre-quattro gocce di sangue che si versano in un tubo contenente 3-4 cm³ di una soluzione salina con l'aggiunta del 3% di citrato trisodico.

Il plasma separato per mezzo della centrifugazione si aspira con una pipetta e colle emazie sedimentate con la tecnica indicata si prepara una soluzione 2%.

Da una parte di un vetrino si pone una goccia di plasma del ricevente ed una goccia della sospensione di sangue del donatore e dall'altra parte una goccia di plasma del donatore ed una goccia della sospensione di sangue del ricevente.

Se all'esame microscopico non si nota agglutinazione i gruppi sono compatibili ed il sangue del donatore può essere trasfuso.

Sottogruppi A₁ A₂. — Nel 1910 Dungern e Hirszfeld notarono che, ponendo a contatto un siero di gruppo B, anti A, con sangue di gruppo A, decorso un certo tempo, il siero rimosso previa centrifugazione non agglutinava più le emazie che lo aveva assorbito, ma conservava, tuttavia, la proprietà di agglutinare emazie di altri gruppi A e AB.

Da queste osservazioni, come si è già fatto cenno precedentemente, risultò che l'agglutinogeno A non era una sostanza unica, ma era costituito da due varietà distinte A₁ e A₂ riconoscendo, così, nel gruppo A e nel gruppo AB la esistenza di due sottogruppi A₁ e A₂ e A₁B e A₂B.

Si dimostrò poi che l'agglutinina anti A era composta di due frazioni differenti e cioè l'agglutinina anti A propriamente detta, la quale reagiva con gli agglutinogeni A₁ e A₂ e l'agglutinina anti A₁ che reagiva con l'agglutinogeno A₁ e praticamente non con quello A₂.

Da queste premesse si rileva la necessità, che, per una esatta classificazione dei gruppi A e AB occorre determinare anche i sottogruppi dell'agglutinogeno A.

Un criterio orientativo per la classificazione di questi sottogruppi è basato sulla circostanza che essendo A_1 più sensibile verso il siero anti A in confronto di A_2 , se nella comune prova per la determinazione del gruppo A la reazione è più rapida ed intensa si tratta del sottogruppo A_1 mentre se più lenta e debole si tratta del sottogruppo A_2 .

Ma una più esatta determinazione di questi sottogruppi si ottiene per mezzo del così detto siero assorbito B.

Per la preparazione di questo siero occorre prima rimuovere dal siero emodiagnostico contenente la comune agglutinina anti A facendola assorbire da emazie A. Eliminata tale agglutinina rimane l'agglutinina anti A_1 la quale si fa reagire con altre emazie A.

Se si ha agglutinazione il sangue appartiene al sottogruppo A_1 se essa manca il sangue appartiene al sottogruppo A_2 .

Un campione di sangue di tale sottogruppo si lava due volte con soluzione salina e, dopo centrifugazione, si rimuove il liquido soprastante.

Ciò fatto, un siero di gruppo B (anti A), se fresco si inattiva a 56° per 10 minuti, si mescola con $\frac{1}{4}$ del suo volume di emazie A_2 lavate.

La miscela si tiene per $\frac{1}{2}$ -1 h. a temperatura della stanza e poi si centrifuga per separare il siero.

Questo siero non reagirà più con A_2 e A_2B ma distintamente con A_1 e A_1B .

Se l'assorbimento risulta incompleto si ripeterà la prova aggiungendo piccole quantità di sangue A_2 .

Il siero così ottenuto è il siero assorbito B, il quale mantenuto in frigorifero a $+4^\circ$ C conserva la sua attività almeno per un anno.

Fattori M, N, MN. — La determinazione si pratica per mezzo di sieri immuni anti M ed anti N ottenuti dalla inoculazione nei conigli di sangue contenente i fattori M ed N.

La prova si esegue per mezzo di comuni vetrini e vetrerie similari o per mezzo di tubi.

Con il primo metodo occorre disporre di sieri ad alto titolo p. e. $1/64$. Sieri a titolo più basso o non danno luogo all'agglutinazione o questa compare tardivamente per cui si rende difficile una interpretazione esatta della prova.

Usando il secondo metodo ad un tubo da emolisi si pone una goccia di siero anti M ed una goccia di soluzione salina ed in un altro tubo una goccia di siero anti N ed una goccia dell'istessa soluzione.

A ciascun tubo si aggiunge una goccia di sospensione 1% di globuli rossi lavati che devono essere utilizzati entro 24 h.

Con lieve agitazione dei tubi si rende omogenea la miscela che si lascia per $\frac{1}{2}$ h. a temperatura di laboratorio. Dopo centrifugazione a 500-1000 giri per 30-60 secondi, si procede alla lettura della reazione cercando mediante leggere scosse di staccare il sedimento dal fondo del tubo.

Se l'agglutinazione è negativa si osserva una sospensione globulare omogenea, se positiva si avrà la formazione di piccoli agglutinati o di una pellicola aderente al liquido chiaro.

Il controllo si esegue adoperando note emazie M, N, e MN.

L'uso delle emazie M N è utile perchè, secondo osservazioni di Landsteiner e Levine, il fattore N è più fortemente agglutinato dall'agglutinina anti N se è solo nelle emazie, che quando coesiste col fattore M.

Infine anche in questo caso l'esame microscopico conferisce alla prova una maggiore esattezza di giudizio.

CAUSE DI ERRORE NELLA DETERMINAZIONE DEI GRUPPI SANGUIGNI

Autoagglutinazione. — Come si è detto, nella costituzione dei quattro gruppi sanguigni il siero non contiene isoagglutinine attive verso gli eritrociti del proprio sangue.

Tuttavia, in condizioni normali, fu osservato il fenomeno di agglutinazione (autoagglutinazione) degli eritrociti in individui per opera del proprio siero, nel quale si trova un'agglutinina che reagisce con il corrispondente agglutinogeno presente nelle emazie [Landsteiner e Levine ⁽¹¹⁾].

Inoltre, il siero contenente tali agglutinine, può reagire anche verso il sangue di altri individui di gruppo compatibile.

Queste agglutinine che possono essere rimosse con la tecnica dell'assorbimento sono, in generale, dimostrabili a bassa temperatura tra 0°-5° C, ma reagiscono anche fino a 20°-25° C.

⁽¹¹⁾ LANDSTEINER e LEVINE, J. Immunol., 12, 441 (1926).

A temperatura superiore non sono più dimostrabili e solo in qualche raro caso a temperatura del corpo.

Oltre che in condizioni normali le agglutinine sono state osservate, con maggiore frequenza ed a titolo elevato, nella emoglobinuria parossistica, nella leucemia, nella malattia di Reynaud, nella cirrosi epatica, nella tripanomiasi, nell'ittero emolitico, nella sifilide ed in altri stati morbosi.

Il primo caso di autoagglutinazione venne segnalato nel 1890 da Klein in un soldato sofferente di cirrosi epatica.

Interessante è il caso osservato da Hirszfeld in un soldato serbo in cui l'autoagglutinazione era talmente rapida da ostacolare, malgrado l'alta diluizione del sangue nella pipetta, il conteggio globulare.

Per distruggere le autoagglutinine fu necessario riscaldare il sangue.

La presenza di autoagglutinine che reagiscono a temperatura ambiente è una tra le cause di errore nella determinazione di gruppo, poichè il sangue, erroneamente, può essere assegnato al gruppo AB.

L'autoagglutinazione si evita eseguendo le prove a 37° C e lavando le emazie con soluzione salina alla stessa temperatura.

Un errore diagnostico può anche verificarsi nella prova crociata se il siero del ricevente contenendo autoagglutinine reagisce verso le emazie del donatore indipendentemente dal gruppo.

L'inconveniente si elimina separando il siero del ricevente a 0° C-5° C, poichè a tale temperatura le autoagglutinine vengono assorbite dalle emazie.

Pseudoagglutinazione. — Consiste nel così detto impilamento (*rouleaux*) delle emazie le quali, all'esame microscopico, si presentano unite per la loro faccia piana come monete sovrapposte, mentre nell'agglutinazione vera sono unite per una parte qualsiasi della loro superficie.

Il fenomeno può verificarsi quando la prova di determinazione di gruppo si esegue ad alta temperatura o si adoperano sieri molto concentrati. Basta infatti aggiungere alla miscela sangue più siero qualche goccia di soluzione salina perchè l'impilamento scompaia, mentre nell'agglutinazione vera gli agglutinati permangono anche se disgregati in ammassi più piccoli.

Si ritiene che la pseudoagglutinazione sia in rapporto con una accentuata sedimentazione delle emazie o con la presenza di una sostanza

non identificata nel siero del paziente la quale ne modifica la viscosità, e, probabilmente, anche con un aumento del fibrinogeno.

PANAGGLUTINAZIONE - AGGLUTINAZIONE BATTERIOLOGICA

Fenomeno di Hübener - Thomsen Friedenreich. — In questo tipo di agglutinazione, descritto la prima volta da Hubener ⁽¹²⁾, Schiff e Halberstaedter ⁽¹³⁾ le emazie umane divengono agglutinabili, non solo dal siero di tutti i gruppi sanguigni ma anche dal siero al quale esse appartengono.

Wiener ⁽¹⁴⁾ osservò tale fenomeno nel sangue mestruale e nel sangue postmortem.

Thomsen ⁽¹⁵⁾, sospettando che il fenomeno fosse di origine batterica lo riprodusse aggiungendo ad una soluzione salina di sangue fresco qualche goccia di sangue con emazie panagglutinate.

Friedenreich ⁽¹⁶⁾ isolò da sangue panagglutinabile due microbi, bacillo M e bacillo J, ed aggiungendo uno di essi al sangue fresco notò che le emazie divenivano panagglutinabili.

I germi uccisi non danno luogo alla panagglutinazione.

Questi microbi produrrebbero una enzima capace di trasformare un ricettore preesistente nelle emazie, in un agglutinogeno attivo designato come T. Agglutinine anti T sarebbero presenti in quasi tutti i sieri umani, ad eccezione di quelli dei bambini, e reagirebbero sulle emazie così trasformate come se queste appartenessero al gruppo AB.

Praticamente, per evitare il fenomeno della panagglutinazione nella determinazione dei gruppi sanguigni, il sangue deve essere usato più presto possibile, raccolto e conservato sterilmente proteggendolo, in tal modo, contro eventuali contaminazioni.

Un mezzo semplice per dimostrare la panagglutinazione consiste nel trattare le emazie con siero del gruppo AB, privo di agglutinine, il

⁽¹²⁾ HÜBENER, Zeits f. Immunitäts, 45, 223 (1925).

⁽¹³⁾ SCHIFF and HALBERTSTAEDER, Zeits. f. Immunitäts, 48, 414 (1926).

⁽¹⁴⁾ WIENER, Journ. of the Amer. Med. Ass., 97, 1245 (1931).

⁽¹⁵⁾ THOMSEN, Zeits. f. Immunitäts, 52, 85 (1927).

⁽¹⁶⁾ FRIEDENREICH, The Thomsen hemagglutination phenomenon, Levine and Munksgaard, Copenhagen (1930).

quale non le agglutina se sono normali, e le agglutina se trasformate in agglutinabili.

Un altro tipo di panagglutinazione chiamato H per distinguerlo da quello T di Friedenreich si verificherebbe, secondo Davidson e Toharsky, a causa di modificazioni nei sieri testo dovute ad un prodotto batterico presente in filtrati di cultura.

Agglutinine da freddo. — Nei sieri normali possono trovarsi agglutinine le quali agiscono a bassa temperatura 0° - 5° C, e sono chiamate agglutinine da freddo (in Germania kalteagglutinen, e Coldagglutinins nei paesi di lingua inglese).

Di rado esse reagiscono, a temperatura ambiente; a 37° C la reazione scompare. Tuttavia possono reagire a temperatura superiore a 37° C se il loro titolo è molto elevato.

La loro attività viene ostacolata usando una sospensione concentrata di sangue, 5-10% (Schiff).

Si conoscono due specie di agglutinine da freddo, aspecifiche e specifiche.

Le prime agglutinano tutte le emazie indipendentemente dal gruppo, e poichè agglutinano anche le emazie dell'individuo dal quale provengono, per tale comportamento, rientrano nel gruppo delle autoagglutinine.

Le agglutinine da freddo specifiche più frequenti sono le α_1 che agglutinano i globuli rossi A_1 e A_1B , e quelle α_2 che agglutinano la maggior parte dei gruppi A_2 e tutti i gruppi O.

Anche le isoagglutinine che raramente si trovano nei gruppi M, N, P possono reagire a bassa temperatura.

Le agglutinine da freddo non sono frequenti e quindi rari i danni che derivano dalla loro presenza. Ma poichè possono essere evitati è necessario che la prova per la classificazione dei gruppi sanguigni venga eseguita anche a bassa temperatura.

Variazioni del titolo delle isoagglutinine e della sensibilità degli agglutinogeni. — Nello stato normale e patologico esistono alcune variazioni nel tessuto sanguigno capaci di alterare i normali rapporti tra le isoagglutinine e gli agglutinogeni i quali possono dar luogo ad inconvenienti nella determinazione dei gruppi sanguigni.

Isoagglutinine. — Secondo Hirszfeld (¹⁷) e Hirszfeld, Zborowski (¹⁸) Hara e Wakao (¹⁹) le isoagglutinine non esistono nel neonato e, quando sono presenti, deriverebbero da quelle materne filtrate attraverso la placenta.

Jones (²⁰), con particolari artifici di tecnica, sebbene non frequentemente, ha trovato, invece, isoagglutinine nei neonati e financo in un feto di sette mesi.

Anche Happ (²¹) le avrebbe accertate nella percentuale del 22% in feti di tre mesi e del 31% in feti da quattro a sei mesi.

Comunque, a parte questi risultati discordi che nella classificazione dei gruppi hanno importanza, soprattutto, in medicina legale, dopo i primi sette o dieci giorni di vita compaiono le isoagglutinine personali.

Il loro titolo, è sempre basso, ed aumenta piuttosto rapidamente fino alla pubertà o secondo Breitner (²²) fino a trent'anni.

In questa epoca della vita in cui si compie « l'evoluzione sierologica delle isoagglutinine » Thomsen e Keitel (²³) hanno trovato che il massimo potere agglutinante è tra cinque e dieci anni.

Segue poi tra i quaranta ed i cinquanta anni la fase di « involuzione sierologica » descritta da Schiff e Mendlovich (²⁴) nella quale il tasso delle isoagglutinine può ridursi quasi a quello della prima infanzia, o scomparire [Pierret, Breton, Christiaens (²⁵)].

Furono inoltre osservate differenze nel titolo di tali anticorpi in individui della stessa età come pure nei due tipi A e B, nei quali le proprietà del primo sarebbero più energiche di quelle del secondo sia nei corrispondenti gruppi sanguigni che nel gruppo O.

Oltre l'età altri fattori possono determinare variazioni nel titolo delle isoagglutinine.

(¹⁷) HIRSZFELD, C.R.S.B., T. XCIV, 205 (1926); Id., Klin. Woch., 741, 744 (1926).

(¹⁸) HIRSZFELD e ZBOROWSKI, Klin. Woch., 4, 155 (1925).

(¹⁹) HARA e WAKAO, Kinderheilk, 114, 313 (1926).

(²⁰) JONES, Amer. Journ. of Dis. of Children, 22, 586 (1921).

(²¹) HAPP, Journ. of the Amer. Med. Ass., 82, 22 (1924).

(²²) BREITNER, Wien. Klin. Woch., n. 19 (1924).

(²³) THOMSEN e KETTEL, Zeits f. Immunol E. LXIII, 67 (1926).

(²⁴) SCHIFF e MEDDLOVICH, Zeits f. Immunitätsforsch., 48, 1 (1926).

(²⁵) PIERRET, BRETON CHRISTIAENS, Presse Med., 47, 594 (1939).

Esso può aumentare (Schneider e Grunwald, n. 2 delle pubblicazioni librarie) durante la prima metà della gravidanza specie se il feto e la madre non appartengono all'istesso gruppo sanguigno, dopo un parto normale od un aborto e con maggior frequenza nelle donne di gruppo O, durante alcune malattie infettive, negli individui immunizzati con l'anatossina difterica verosimilmente perchè essa contiene l'agglutinogeno A, nei profilassati con vaccino misto T.A.B., con vaccino jenniano e con altri stimoli aspecifici come iniezioni di sangue di gruppo A o B in individui del gruppo O.

La diminuzione del titolo delle isoagglutinine può, invece, verificarsi nel digiuno, nella narcosi, durante il periodo mestruale, nella tubercolosi avanzata, nel cancro, nella leucemia, nelle malattie da siero.

Esiste pure una influenza di razza. Bais e Verhoef ⁽²⁶⁾ hanno osservato che i sieri dei Malesi possiedono un potere agglutinante più forte di quello degli Europei.

Le proprietà isoagglutinanti non sono, quindi fisse ma variano a causa di stimoli di differente natura.

Agglutinogeni. — A differenza delle isoagglutinine gli agglutinogeni sono presenti fin dalla nascita, e sono stati messi in evidenza nel feto anche dopo 37 giorni della vita intrauterina.

Aumentano fino all'età di venti anni per rimanere costanti dopo tale epoca.

Gli agglutinogeni A e B appartenenti ad individui diversi posti a contatto con sieri testo dell'istesso titolo, mostrano, nelle prove di classificazione, una sensibilità differente che può variare entro limiti alquanto ampi per l'agglutinogeno A, meno ampi per l'agglutinogeno B.

Tale comportamento non solo si nota per gli agglutinogeni isolati A e B, ma anche per quelli che coesistono nel gruppo AB, dove secondo Thomsen ⁽²⁷⁾ l'agglutinogeno B si mostra, d'ordinario, più attivo in confronto di quello A.

Kemp ⁽²⁸⁾ ha trovato che la sensibilità all'agglutinazione delle emazie nei neonati è soltanto del 20% in confronto di quella degli adulti.

⁽²⁶⁾ BAIS e VERHOEF, Institut international d'anthropologie section, Amsterdam (1927).

⁽²⁷⁾ THOMSEN, Zeits f. Rassenphysiol., 5, 122 (1932).

⁽²⁸⁾ KEMP, C.R.S.B., T. XCIX, 419, 420 (1926).

Mentre i corpuscoli rossi di adulti sono p. e. agglutinati fino alla diluizione $1/500$, per quelli del neonato occorre un siero nella concentrazione $1/100$.

Anche in questa progressiva ascesa dell'agglutinabilità esistono differenze tra i due agglutinogeni.

Secondo l'istesso A. calcolando a 100 la sensibilità delle emazie nel periodo tra 5 e 12 anni, il valore dell'agglutinogeno B è tra 40 e 50, mentre quella di A è tra 60 e 70.

Dopo i venti anni, verso l'età adulta e la vecchiaia, la sensibilità delle emazie tende gradatamente a diminuire.

Schiff e Hübener ⁽²⁹⁾ per studiarne il comportamento posero a contatto globuli rossi appartenenti ad individui diversi con siero testato di titolo noto, e riscontrarono che l'agglutinabilità variava da un minimo di $1/25$ ad un massimo di $1/800$. Prendendo come unità la diluizione $1/25$ ritennero che il grado medio di sensibilità poteva considerarsi di 3 unità corrispondente cioè, alla diluizione di $1/75$.

Altri AA. per determinare il grado medio di sensibilità usarono emazie di differenti persone ponendole a contatto con siero o plasma a basso titolo diluiti in proporzione aritmetica $1/10$, $1/20$, $1/30$, $1/40$, $1/50$, $1/60$. ecc.

Essi riscontrarono limiti variabili tra $1/10$ e $1/50$ e considerarono emazie di media sensibilità quelle con punto limite $1:30$.

Si può ritenere che delle emazie umane, l'85-90% possiede un grado di sensibilità medio, il 12% elevato, il 2% scarso.

Nella classificazione dei gruppi sanguigni per evitare errori di tecnica devono adoperarsi quindi emazie con un grado medio di sensibilità.

Il sangue, inoltre, deve essere usato fresco od al massimo dopo uno o due giorni sebbene anche entro questo tempo si possa verificare una diminuzione di sensibilità delle emazie.

Le emazie in sospensione a $+4^{\circ}$ C perdono lentamente la loro sensibilità la quale a temperatura elevata diminuisce con rapidità; se non sono sospese si conservano più a lungo.

Allorchè occorre fare determinazioni di gruppi in serie non avendo ogni giorno a disposizione individui con emazie di nota sensibilità, si ricorre al sangue conservato con uno dei metodi seguenti.

⁽²⁹⁾ SCHIFF e HÜBENER, Zeits f. Immunitäts, 45, 207 (1925).

Mediante venopuntura si raccoglie in un tubo una quantità di sangue sufficiente per un certo numero di prove, e si lascia coagulare.

Si separa il siero sostituendolo con una piccola quantità di soluzione di cloruro di sodio 0,85%. Il tubo si pone in frigorifero a 4°-5° C poichè a 0° C si produce emolisi.

In tali condizioni secondo Schiff il sangue si conserva per 2-3 settimane, secondo altri AA. non oltre sette o dieci giorni, poichè sotto l'influenza di un più lungo invecchiamento e di eventuale contaminazione i globuli rossi si lasciano agglutinare dal siero di tutti i gruppi e non sono quindi più utilizzabili.

Al momento dell'uso il coagulo si agita leggermente e l'emulsione così ottenuta si lava con soluzione di cloruro di sodio 0,85%, si centrifuga poi a 1000 giri per due minuti ripetendo tale operazione per 2-3 volte.

Un numero maggiore di lavaggi potrebbe distruggere l'agglutinogeno che passa nell'acqua di lavaggio.

A tale proposito Schiff, Wohlish, Hallaner, Davidson avrebbero constatato che le emazie del gruppo A perdono l'agglutinogeno dopo 12-20 lavaggi e quelli del gruppo B dopo 5-10. Ciò si osserva anche per i globuli rossi del gruppo AB dove si verifica prima la scomparsa dell'agglutinogeno B.

L'altro metodo consiste nel raccogliere il sangue in un tubo contenente un anticoagulante preparato secondo la formula indicata a pag. 1400.

Il tubo si pone in frigorifero a 4°-5°C, e le emazie prima di essere utilizzate per le prove si lavano 2-3 volte secondo la tecnica precedentemente indicata.

Il periodo di conservazione è di circa otto-dieci giorni.

Gli AA. americani consigliano di aggiungere al sangue in tal modo preparato mertiolato (Lilly) nella concentrazione di 1.5000.

Una conservazione di maggiore durata potrebbe ottenersi adoperando come anticoagulante la soluzione di Pons e Turner così composta: 2 parti di soluzione di citrato di sodio 3,8% più 5 parti di soluzione di glucosio 6,4%. Una parte di essa si aggiunge a tre parti di sangue.

Qualunque sia il metodo adoperato per la conservazione del sangue, dopo i lavaggi con le emazie sedimentate si prepara la sospensione salina 2% per la esecuzione della prova.

Da quanto ho esposto le variazioni delle isoagglutinine e degli agglutogeni rappresentano la risposta dell'organismo a stimoli di differente natura nel quadro immutevole della individualità del sangue.

La loro conoscenza integra le norme tecniche già esposte per evitare incerte ed inesatte interpretazioni nella classificazione dei gruppi sanguigni, come può verificarsi, ad esempio, per scarsa sensibilità delle emazie o per debole potere delle isoagglutinine, o per tutte e due queste circostanze.

SINTOMATOLOGIA DELLA INCOMPATIBILITÀ NEL SISTEMA SANGUIGNO A, B, AB O NELLA TRASFUSIONE DI SANGUE

Gli effetti della incompatibilità sono quasi sempre legati all'azione delle isoagglutinine del ricevente verso le emazie del donatore, e, meno frequentemente, all'azione degli anticorpi del donatore verso le emazie del ricevente come nel caso del donatore del gruppo O.

I sintomi di incompatibilità insorgono all'inizio, durante la trasfusione, dopo alcuni minuti ed anche un'ora terminata la trasfusione.

La loro intensità è varia.

Ad una trasfusione iniziale possono seguire sintomi talmente lievi da passare inosservati, o ritenersi dipendenti da altre cause.

Ciò può verificarsi quando gli anticorpi del ricevente hanno un titolo poco elevato o è scarsa la quantità del sangue trasfuso.

In alcuni stati morbosì, come per esempio nella leucemia, il potere agglutinante del siero è assai basso.

Viene riferito il caso [Wiener e Schäfer ⁽³⁰⁾] di un leucemico del gruppo O che ricevette sangue di gruppo B senza risentirne danni apprezzabili.

Allorchè ad una prima trasfusione con sangue incompatibile segue una lieve reazione le emazie del ricevente non rimangono indifferenti all'azione degli antigeni incompatibili A o B, ma vengono sensibilizzate alla formazione di anticorpi che, generalmente, dopo 15, 20 giorni acquistano un titolo più alto del normale.

In tale circostanza una nuova trasfusione tra individui di gruppo incompatibile, potrà provocare reazioni assai violente.

⁽³⁰⁾ WIENER e SHÄFER, Amer. of N. Med. Clin., 24, 705 (1940).

Reazioni gravi possono però verificarsi anche dopo una prima trasfusione se, il siero del ricevente possiede normalmente agglutinine di titolo assai elevato ed è notevole la quantità del sangue trasfuso.

In questi due casi dopo una trasfusione, anche di solo 10 cm³ di sangue, il ricevente accusa forte cefalea, senso di oppressione e di formicolio, irrequietezza ed un improvviso e caratteristico dolore acuto alla regione lombare.

Possono pure insorgere sintomi più gravi, dispnea, tosse, brivido, nausea, vomito, caduta della pressione, emoglobinuria.

E' raro l'esito letale.

La trasfusione deve allora interrompersi immediatamente praticando, senza indugio, le cure suggerite dall'esperienza clinica.

Talvolta, sospesa la trasfusione, anche dopo un'ora, insorge un brivido intenso, la temperatura sale a 41°-42° C con delirio e compaiono emorragie delle gengive e nei punti della inoculazione per via venosa o di una iniezione sottocutanea eseguita a scopo terapeutico.

Frequente, sebbene non costante, sono l'ittero e l'emoglobinuria.

Il paziente può superare questa fase acuta, nota come fase di intervallo, ma il miglioramento è temporaneo.

Anche dopo 1-2 settimane sopraggiunge la fase renale con oliguria, anuria, uremia, convulsioni ed esito letale.

Reazioni di incompatibilità vengono segnalati, inoltre, tra il sangue di gruppo O, donatore universale, ed il siero del gruppo B che contiene, sebbene raramente, l'agglutinina α_2 la quale reagisce non solo con emazie A₂ e A₂B ma anche, e più intensamente, con emazie di tutti i gruppi O, tanto che venne designata come agglutina anti O. E per questo comportamento che l'agglutinina α_2 non è ritenuta di natura strettamente specifica.

Un terzo tipo di incompatibilità infragruppo nella trasfusione di sangue riguarda ancora il gruppo O.

In questo caso il meccanismo della reazione è diverso, poichè non sono gli anticorpi del ricevente che reagiscono verso le emazie del donatore ma quelle del donatore verso le emazie del ricevente.

Questa condizione si realizza allorchè le isoagglutinine anti A e anti B del donatore di gruppo O, le quali si ritengono generalmente innocue, con titolo elevato possono reagire contro le emazie del ricevente.

Titoli elevati nel siero di gruppo O sono stati da me osservati tra i datori di sangue iscritti al Comitato Provinciale di Roma.

Per le agglutinine anti A ho trovato titoli fino a 1.80 e per le agglutinine anti B fino a 1.100.

A tale proposito Gresal e Chandra ⁽³¹⁾ riconoscono come donatori universali o di prima scelta soltanto quelli le cui agglutinine possiedono un titolo non superiore 1/16.

Gli AA. chiamano, poi, di seconda scelta i donatori universali con agglutinine di titolo 1/25 e considerano dannosi coloro con agglutinine 1/50-1/100.

Levine e Malée ⁽³²⁾ Freemann e Whitehouse ⁽³³⁾ affermano che l'uso del sangue del gruppo O, in cui le agglutinine hanno un alto titolo non è esente da inconvenienti, e consigliano che trasfusioni con sangue O possono eseguirsi senza la preventiva titolazione delle agglutinine, solo, eccezionalmente, in casi di urgenza.

Anche secondo disposizioni del Codice Sanitario dello Stato di New York (1941) i donatori universali possono essere utilizzati solo a condizione che le agglutinine fossero di basso titolo.

Da queste osservazioni risulta che l'uso del sangue del gruppo O, considerato, finora, senza alcuna riserva, donatore universale, può dar luogo ad inconvenienti che sono però evitabili con la preventiva determinazione del titolo delle agglutinine anti A e anti B.

Il titolo di questi anticorpi dovrebbe inoltre essere segnato nei recipienti delle emoteche per la trasfusione indiretta del sangue.

ALTRI TIPI DI INCOMPATIBILITÀ

La incompatibilità dovuta ai fattori M N non è frequente anche perchè, solo eccezionalmente, come si è detto, è stata dimostrata nel sangue umano la presenza di corrispondenti anticorpi naturali.

Tuttavia, fenomeni di incompatibilità possono verificarsi in seguito a ripetute trasfusioni di sangue se p. e. il donatore possiede un fattore M o N differente da quello del ricevente.

⁽³¹⁾ GRESAL e CHANDRA, The indian Medical Gazette, 2, 461 (1939).

⁽³²⁾ LEVINE e MALEÉ, Journ. of Immunol., 8, 425 (1923).

⁽³³⁾ FREEMANN e WHITEHOUSE, Amer. Journ. Med. Sci., 172, 664 (1926).

In queste condizioni, come avviene per altri fattori, si determina un processo di isoimmunizzazione e la conseguente comparsa nel sangue del ricevente, di anticorpi che reagiscono verso le emazie del donatore.

Nel sangue contenente i fattori P e Q raramente si osservano isoagglutinine; vi si possono trovare, invece, immuniagglutinine in seguito a processi immunizzanti per opera di tali agglutinogeni.

Incompatibilità infragruppo dovuta al sesso.

Questo argomento, sul quale brevi cenni si trovano nel II Congrès Intern. Transf. Sanguine - Paris 1937, vol. 131, p. 93, è stato oggetto di una recente comunicazione di A. Hustin e R. Remy ⁽³⁴⁾.

Gli AA, su 864 trasfusioni fra gruppi omologhi eseguite presso il Centro trasfusionale dell'Ospedale universitario Saint Pierre di Bruxelles, hanno constatato che reazioni post trasfusionali si verificavano con maggiore frequenza ed intensità allorchè il donatore è di sesso femminile ed il ricevente di sesso maschile, o se donatore e ricevente appartengono a questo stesso sesso.

Su tali inconvenienti osservati in qualche caso anche dalla dottoressa Gaetano del Comitato Provinciale datori di Sangue di Roma, mi propongo di eseguire sistematiche ricerche per studiarne la genesi finora ignota.

Qualunque sia il tipo di incompatibilità tra i suddetti fattori e le agglutinine regolari ed irregolari, i processi emolitici che si svolgono in parte sono dovuti ad una eritrofagocitosi per opera dei leucociti polimorfi nucleari neutrofili, ma, specie nelle forme gravi, la distruzione dei globuli rossi del donatore, o del ricevente come nel caso del gruppo O, si compie per l'azione emolitica diretta degli anticorpi circolanti.

Nè meno gravi sono la trombosi dei capillari prodotta dalle emazie agglutinate e la embolia.

SCOPERTA DEL FATTORE Rh

Un ulteriore contributo clinico e scientifico in questo settore della ematologia venne dalle successive ricerche di Landsteiner e Wiener ⁽³⁵⁾.

⁽³⁴⁾ A. HUSTIN et R. REMY, Influence du sexe des « Donneurs » et des « Recepteurs » sur la fréquence et la gravité des incidents survenant au cours des transfusions sanguines.

⁽³⁵⁾ LANDSTEINER e WIENER, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 43, 223 (1940); Id., Journ. of Immunol., 33, 19 (1937).

Nel 1937 questi AA., inoculando sangue di una scimmia *Macacus Rhesus*, ottennero la produzione di anticorpi che agglutinavano le emazie di tali scimmie ed elementi cellulari.

Ma l'esperienza acquistò particolare interesse allorchè gli AA. dimostrarono che gli immunisieri dei conigli agglutinavano anche alcune emazie umane nelle quali veniva riconosciuta la esistenza di un nuovo fattore simile a quello esistente nelle emazie del *Macacus Rhesus*, e che dalle due prime lettere del nome di questa scimmia fu designato con il simbolo Rh.

Le corrispondenti agglutinine vennero chiamate anti Rh, e per mezzo di esse il fattore Rh fu trovato nella proporzione di 85% nel sangue della popolazione di razza bianca, di 92% nei negri e del 100% nei cinesi.

Gli individui vennero così classificati in due categorie, Rh positivi e Rh negativi o rh.

Il fattore Rh non esiste nei tessuti e nelle secrezioni dell'uomo, come gli agglutinogeni A e B ed è indipendente dagli antigeni globulari già descritti A, B, O, M, N, P, Q, H.

Il suo potere antigene è dovuto probabilmente alla presenza di un polisaccaride.

Agglutinine anti Rh naturali non sono state mai riscontrate, in maniera certa nel sangue umano.

Il fattore Rh viene trasmesso ereditariamente come carattere mendeliano dominante ed è composto di due serie di alleli Rh e rh, situati in cromosoni differenti da quelli dei geni determinanti gli agglutinogeni A, B, O, M, N.

Poichè ogni individuo possiede un paio di geni di ciascuna serie allelica uno derivante dal padre e l'altro dalla madre si hanno tre genotipi Rh RH, Rh rh, rh rh.

Quando i due geni trasmissibili sono simili l'individuo dicesi omozigote, quando differenti eterozigoti.

Gli individui Rh negativi possiedono un genotipo rh rh e sono sempre omozigoti; gli individui Rh positivi possono essere omozigoti, genotipo Rh Rh, o eterozigoti, genotipo Rh rh.

I figli di genitori rh rh avranno solo figli rh; se uno dei genitori è Rh positivo e l'altro Rh negativo i figli saranno tutti Rh positivi se il genitore Rh positivo è omozigote, mentre i figli saranno per metà Rh po-

sitivi e per l'altra metà Rh negativi se il genitore Rh negativo è eterozigote.

Se i genitori sono Rh positivi i figli saranno Rh positivi a meno che i genitori sieno entrambi eterozigoti nel qual caso il quarto dei figli sarà Rh negativo.

Intanto, nel fervore di successivi studi, fu dimostrato che nel sangue umano non esisteva soltanto un antigene Rh ed un anticorpo anti Rh, ma che questi due elementi costituivano il centro di un sistema genetico e sierologico più complesso.

Sottogruppi Rh. — Infatti, in alcuni sieri umani anti Rhesus vennero identificate due varietà di agglutinine, l'una che con emazie umane dava il 70% di reazioni positive, e l'altra il 30%, le quali vennero designate la prima anti Rh' e la seconda anti Rh''.

La prima agglutinina scoperta anti Rh venne poi indicata col simbolo anti Rh₀.

Questi tre differenti anticorpi reagiscono con tre fattori differenti cioè Rh₀, Rh', Rh'' i quali insieme con le loro combinazioni costituiscono i seguenti tipi Rh: Rh₀, Rh', Rh'', Rh₁ o Rh'₀ (cioè Rh₀ + Rh'), Rh₂ o Rh''₀ (cioè Rh₀ + Rh'') ai quali vanno aggiunti il tipo rh e quelli scoperti successivamente Rh₃ combinazione di Rh₀ + Rh' + Rh'' e Rh₄ considerato come Rh' + Rh'' sebbene non ancora ben definito.

A proposito di questa nomenclatura è opportuno ricordare che Wiener distingue i tipi Rh in positivi e negativi, positivi quelli che contengono il fattore Rh₀ solo o associato (Rh₁ Rh₂ Rh₃) e negativi quelli che non lo contengono Rh' Rh'', Rh₄, rh.

Tale suddivisione è importante poichè considerare tutti i tipi positivi può costituire una causa di incompatibilità nel sistema Rh in caso di trasfusione di sangue.

Infatti se p. e. individui Rh' Rh'' vengono trasfusi con sangue contenente il fattore Rh₀ del quale essi sono privi, possono subire un processo di isoimmunizzazione con formazione di agglutinine anti Rh₀ capaci di reagire con corrispondenti antigeni in caso di ripetute trasfusioni.

Il danno risulta particolarmente grave per le donne Rh' metà delle quali, come risulta dalle statistiche, vengono immunizzate con sangue Rh₁.

E' quindi opportuno includere tra i fattori Rh negativi i tipi Rh' e Rh'', i quali del resto rappresentano solo 1% nel sistema Rh, con riserva però che possono ricevere sangue del corrispondente fattore.

Inconvenienti possono verificarsi anche in altre condizioni come nel seguente caso da me recentemente osservato.

Padre A Rh ₀ negativo	Madre O Rh ₀ positivo	Figlio A Rh' positivo
Rh' positivo	Rh' negativo	
Rh'' negativo	Rh'' negativo	

La madre Rh₀ positiva ha subito per mezzo del fattore Rh' un processo di isoimmunizzazione che ha determinato nel feto una non lieve forma di anemia emolitica congenita.

Un altro tipo diverso dai precedenti sotto l'aspetto genetico e serologico venne descritto da Levine e Javert (³⁶).

Questi AA. nel siero di una madre Rh positiva con bambino affetto da anemia emolitica congenita (in seguito sarà indicata con le lettere A.E.C.), trovarono un'agglutinina che dava il 30% di reazioni positive con emazie Rh negative e con alcune emazie Rh positive.

Gli AA. denominarono tale agglutinina anti Hr la quale svelava un corrispondente fattore Hr.

Quasi contemporaneamente, anche Race e Taylor (³⁷) nel siero di una madre Rh positiva, della quale il secondo e terzo figlio affetti da A.E.C., dimostrarono la presenza di un'agglutinina, designata ST dalle iniziali del cognome della donna, la quale agglutinava l'80% dei sangui includendovi tutti quelli Rh negativi ed altri Rh positivi.

Da ulteriori osservazioni risultò che i due sieri, entrambi poi indicati come ST, possedevano la stessa proprietà.

La causa del differente potere agglutinante fu messa in chiaro da successive ricerche, alle quali accenno brevemente.

Il fattore ST, come si è detto, si trova sia nel sangue Rh negativo che in quello Rh positivo e, precisamente, in quello contenente gli agglutogeni Rh₀ Rh'' Rh₂, mentre manca nel sangue che possiede gli agglutogeni Rh' e Rh₁.

(³⁶) LEVINE e JAVERT, *Jaar. Book of pathology and immunology*, 509, Chicago.

(³⁷) RACE, *Nature*, 153, 771 f. (1944); RACE e TAYLOR, *Brit. Med. Journ.*, 1, 288 (1944).

L'agglutinogeno ST quando è presente nel sangue Rh negativo omozigote, contiene due fattori negativi, o, come suol dirsi comunemente, una doppia dose di ST, mentre nel sangue Rh positivo eterozigote, esso risulta costituito da un solo fattore o da una singola dose di ST.

Ora se un siero ST, come quello trovato da Levine e Javert, era dotato di scarso potere agglutinante, in presenza di una dose unica del corrispondente agglutinogeno dava scarsa o non apprezzabile reazione che, invece, si rendeva evidente verso lo stesso agglutinogeno a doppia dose.

Diverso comportamento aveva un siero anti ST con elevato potere agglutinante come quello di Race e Taylor poichè reagiva con eguale intensità sia con una unica che con una doppia dose di agglutinogeno ST.

Ciò spiega la più bassa percentuale, 30% di reazioni positive con l'agglutinina di Levine e Javert, in confronto della percentuale più alta ottenuta con quella di Race e Taylor.

Anche il fattore ST, sebbene raramente, può essere causa di A.E.C. quando la madre ST negativa appartenente ai genotipi Rh_1 e Rh' riceva trasfusione di sangue ST positivo presente nei genotipi Rh_0 , Rh'' , Rh_2 .

Maggiore importanza invece ha il fattore Hr per la prova di paternità presunta.

Gli individui Hr negativi del tipo Rh_1 sono quasi sicuramente omozigoti, mentre gli individui Hr positivi dello stesso tipo sono quasi sempre eterozigoti e contengono un gene rh.

Nel descrivere i tipi Rh ho seguito la nomenclatura di Wiener che fu poi da lui modificata soprattutto per far risaltare la importanza clinica del fattore Rh_0 .

Egli designò con la lettera maiuscola solo i tipi contenenti tale fattore e con la lettera minuscola i rimanenti.

I tipi risultavano quindi rappresentati dai simboli Rh_0 , Rh_1 , Rh_2 , Rh_z , rh, rh', rh'', rh_y.

I geni poi con la soppressione della lettera h vennero indicati nel modo seguente: R_0 , R_1 , R_2 , R_z , r, r', r'', r_y.

Ho ritenuto utile riportare queste varie nomenclature per evitare confusione ed inesatte interpretazioni da parte degli studiosi che non hanno familiarità con il sistema Rh.

Teorie di Wiener e di Fischer. — Nella struttura genetica di questo complesso sistema secondo Wiener i tipi Rh si riferiscono ad una serie di alleli situati in un solo locus del cromosomo nel quale i geni elementari possono sostituirsi l'uno all'altro, e dar luogo a geni complessi determinando i corrispondenti antigeni.

Alla teoria di Wiener, Fischer oppose una differente concezione genetica nella quale il genotipo Rh è determinato da tre paia di geni allelomorfi situati in tre loci di un cromosomo e strettamente legati fra loro come risulta dallo schema accanto.

D	{	o	I corrispondenti antigeni vennero designati con le lettere
			maiuscole D, C, E, e con le minuscole d, c, e.
d	{	o	L'antigene D-Rh ₀ reagisce con un anticorpo anti D od anti
C			Rh ₀ ; l'antigene C-Rh' con anti C od anti Rh'; l'antigene E con
c	{	o	anti E od anti Rh''.
E			I geni D, C, E assenti vengono sostituiti da altri allelomorfi
e	{	o	d, c, e che, a loro volta, determinano altri tre antigeni e reagis-
			scono con anticorpi corrispondenti.
			Race, Taylor e collaboratori nel siero di una giovane don-

na, trovarono un anticorpo che dalla iniziale della paziente Willis fu definito Cw, il quale reagiva con un terzo allelomorfo nel locus Cc, e che può sostituire sia l'antigene C che l'antigene c.

L'antigene Cw presente nella popolazione inglese nella percentuale del 2% ha dato luogo ad una reazione posttrasfusionale in una malata del tipo CC che aveva ricevuto sangue da un datore CwC.

Anche l'antigene Cw è ereditario, ed è stato trovato parecchie volte nella combinazione CwDe; assai rare sono le combinazioni CwDE e CwDE.

Ometto di proposito una disamina sul valore e sulla utilità pratica di questi due tipi di nomenclatura perchè, esigendo essa conoscenze profonde di genetica, sorpasserebbe i limiti di questo lavoro.

Fischer e Race indicarono poi con lettere greche gli antisieri corrispondenti agli antigeni, ma il sistema non incontrò favore tra gli studiosi.

Ricorderò infine che Murray propose di applicare una numerazione ai sieri anti Rh indicati con i simboli di Wiener e di Fischer. Si ebbe così il seguente schema:

anti Rh' (anti C)	.	.	.	siero 1
anti Rh ₀ (anti D)	.	.	.	siero 2
anti Rh ₁ (anti C + D).	.	.	.	siero 1, 2
anti Rh'' (anti E)	.	.	.	siero 3
anti Rh ₂ (anti D + E)	.	.	.	siero 2, 3
St siero (anti c anti Hr)	.	.	.	siero 4

Anche tale nomenclatura non ebbe successo perchè rendeva ancora più difficile la terminologia del sistema Rh già così complesso nella sua struttura genetica.

Ho creduto utile per gli studiosi riassumere nel seguente quadro i rapporti esistenti nel sistema Rh tra gli antigeni elementari, le loro combinazioni e gli anticorpi già descritti.

In esso, per motivi di semplicità e di chiarezza sono riportati soltanto i simboli delle nomenclature di Wiener e di Fischer.

Dopo la scoperta del fattore Rh Peters e Wiener (³⁸) comunicarono quattro casi, dei quali due mortali, di reazioni posttrasfusionali tra gruppi sanguigni omologhi. Il ricevente era Rh negativo ed il donatore Rh positivo, il cui sangue, agendo come antigene verso le emazie del ricevente, aveva dato luogo alla formazione di anticorpi irregolari, classificati come agglutinine anti Rh e causa delle reazioni emolitiche.

Le reazioni per incompatibilità Rh non si osservano mai dopo una prima trasfusione, come avviene, in determinate circostanze, per quelle già descritte tra i gruppi sanguigni contenenti agglutinogeni non compatibili.

Gli individui Rh negativi sono privi di anticorpi naturali anti Rh, e, prima che nel loro siero compaiano agglutinine immuni anti Rh capaci di reagire verso emazie Rh positive e determinare fenomeni di incompatibilità, occorre una fase di sensibilizzazione conseguente ad una o più trasfusioni.

Nella immunizzazione che si verifica per il sistema Rh, è premimente l'azione del fattore Rh₀ che si trova nell'85% degli individui di razza bianca nei tipi Rh₀, Rh₁, Rh₂.

Un processo di immunizzazione identico può verificarsi in una donna gestante Rh negativa sebbene si svolga con differenti modalità.

(³⁸) PETERS e WIENER, Ann. Int. Med., 13, 2306 (1940).

Sieri anti Rh		Rh ₀ cDe	Rh ₁ CDe CwDe	Rh ₂ cDE	Rh ₃ CDE CwDE	Rh ₄ CDE CwDE	Rh ₅ CDE CwDE	Rh ₆ CDE CwDE	Rh ₇ CDE CwDE	rh cde
Wiener	Fischer									
anti Rh ₀	anti D	+	+	+	+	+	+	+	(-)	-
anti Rh'	anti C + Cw	-	+	-	-	-	-	-	(+)	-
	anti C	-	+	-	-	-	-	-	(-)	-
anti Rh''	anti E	-	-	+	+	+	+	+	(+)	-
anti Rh ₁	anti C + Cw + D	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
	anti C + D	+	+	+	+	+	+	+	(-)	-
anti Rh ₂	anti D + E	+	-	-	+	+	+	+	(+)	-
anti Hr--ST	anti c	+	-	+	+	+	+	+	(-)	+
	anti d ⁽¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	anti e ⁽²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-

⁽¹⁾ L'agglutinina anti d è stata identificata da Diamond e Boy, ma il suo comportamento verso gli antigeni del sistema Rh non è stato ancora chiarito.

⁽²⁾ L'agglutinina anti e, secondo Mourant, reagirebbe contro gli antigeni prodotti dai geni Rh₀, Rh₁, Rh', rh e non reagirebbe con i tipi Rh₂Rh₂, Rh₂Rh'', Rhz.

A causa di modificazioni strutturali anche lievi della placenta, se sangue fetale Rh positivo entra nella circolazione materna, stimola la produzione di anticorpi anti Rh i quali, a loro volta, passano nella circolazione fetale determinando la lisi dei globuli rossi e la consecutiva anemia emolitica.

Oltre a ciò, per l'azione delle agglutinine si formano ammassi globulari più o meno cospicui i quali aderenti alle pareti vasali limitano o sopprimono la circolazione provocando fenomeni tossiemici molto gravi specie allorchè vengono colpiti il cervello ed il fegato.

Si stabilisce, così, quella complessa sindrome morbosa oggidì definita anemia emolitica congenita dei neonati (A.E.C.) descritta dagli AA. secondo i vari sintomi prevalenti, come anemia dei neonati, eritroblastosi fetale, edema fetoplacentare, ittero dei neonati.

Anche in questi casi come avviene per l'incompatibilità Rh nella trasfusione del sangue, il maggiore responsabile della immunizzazione è il fattore Rh₀ presente nei tipi Rh₁ e precisamente per il 55% del tipo Rh₁ e per il 12% nel tipo Rh₁ Rh₂.

Delle lesioni dell'A.E.C. che generalmente si osservano qualche giorno dopo la nascita darò una descrizione riassuntiva relativa ai tessuti più gravemente compromessi.

Alterazioni del sangue - Anemia. — Il numero dei globuli rossi che alla nascita è di 5 a 5 milioni e 500 mila, dal secondo o terzo giorno decresce fino a 2-1 milioni se il decorso della malattia si prolunga fatalmente, e non s'interviene con una trasfusione di sangue.

Vi è notevole leucocitosi con un certo numero di elementi immaturi mielociti, metamielociti, promielociti che può arrivare fino a 100 mila per mm³.

Le cellule della serie rossa comprendono policromatofili ed eosinofili, i preeritroblasti e gli eritroblasti basofili frequentemente in mitosi si riscontrano specialmente nelle forme più gravi.

Vi è anisocitosi e propriamente una macrocitosi. Le emazie sono giovani e più grandi delle normali con un diametro medio di μ tra 8 e 9,5.

Esiste, inoltre, un aspetto particolare di poichilocitosi in cui le emazie si presentano affilate ad una estremità a forma di pera o ad entrambe le estremità e, talvolta, con un filamento ad un lato e con due o tre filamenti all'altro opposto.

Lesioni del fegato. — Nell'ittero grave macroscopicamente il fegato si presenta aumentato di volume fino a g 400, ed alla superficie si osservano, sovente, piccole emorragie.

Le lesioni che si notano all'esame istologico, senza entrare in particolari dettagli, sono rappresentate, in complesso, da una cospicua dilatazione dei capillari sanguigni ripieni di elementi morfologici del sangue, in gran numero eritroblasti e leucociti.

Esiste, inoltre, una quantità di piccoli focolai eritroblastici circondati da cellule di Kupffer ipertrofiche ed iperplastiche.

Ad eccezione di qualche nucleo picnotico le cellule epatiche non appaiono profondamente alterate.

Particolarmente notevole è l'accumolo di elementi biliari sotto forma di corpi rotondi di colore e grandezza variabili, privi di ferro e di cui i più piccoli si trovano nelle cellule.

Nell'anasarca feto-placentare il fegato è rigonfio, occupa quasi tutto l'addome e pare nuotare nell'abbondante liquido amniotico di colore giallo ambra.

L'ittero ha una duplice origine, emolitica dovuta alle profonde alterazioni del sangue, ed una epatica a causa della ostruzione dei canalicoli biliari.

Queste alterazioni del fegato, provocate dal fattore Rh, secondo alcuni AA. sono fra le cause della cirrosi epatica infantile.

Una complicazione neuropsichica dell'A.E.C. è rappresentata dall'ittero nucleare, Kernicterus di Smorl, che può manifestarsi subito o dopo mesi ed anni dalla nascita.

Nel primo caso insieme con i sintomi dell'A.E.C. si osservano segni di sonnolenza, di quasi immobilità ed inerzia del bambino il quale non si attacca al seno per cui, talora, occorre nutrirlo per mezzo della sonda esofagea. Nel terzo e quarto giorno generalmente sopravviene coma e morte.

Se la sindrome però non è grave, con opportune trasfusioni di sangue, il paziente può superare la crisi e sopravvivere.

In questo caso l'ittero scompare lentamente, l'anemia migliora ma, successivamente, mentre non si osservano più i segni della pregressa malattia, si osservano nel bambino manifestazioni neuropsichiche con disor-

dini motori, distrofie muscolari, ritardo di sviluppo fisico e psichico fino all'idiozia.

All'autopsia si notano lesioni più o meno cospicue e varie secondo le sedi del sistema nervoso centrale. Esse che possono riscontrarsi anche in casi di ittero nucleare di origine diversa consistono in una infiltrazione biliare diffusa, transitoria che scompare rapidamente dopo la morte, in una infiltrazione edematosa degli elementi nervosi, nella presenza di piccoli corpuscoli dovuti a processi disintegrativi della glia e di guaine perivascolari.

Esistono, inoltre, processi degenerativi neuro-ganglionari con profonde alterazioni cellulari i quali costituiscono la sindrome istologica nota col nome di malattia grave di Nissl.

Tali processi sono connessi ad alterazioni trafiche (biotrofismo) delle cellule nervose senza fenomeni flogistici acuti e senza lesioni marginali (satellitosi).

Su queste manifestazioni cliniche lo studioso potrà trovare una più ampia descrizione in lavori che trattano particolarmente dell'ittero nucleare.

La influenza dannosa del fattore Rh durante la gestione è confermata da osservazioni statistiche di Levine, Katzin, Burnham, Vogel ⁽³⁹⁾ le quali dimostrano che uno su duecento neonati la A.E.C. si osserva in feti Rh positivi nati da padri Rh positivi e da madri Rh negative.

Se si tiene conto, però, che in una gravidanza su dieci il feto è Rh positivo da padre Rh positivo con madre Rh negativa, la frequenza della malattia dovrebbe essere maggiore.

Sulla genesi di tale discordanza le seguenti osservazioni possono considerarsi di soddisfacente attendibilità.

A) Non tutte le donne, come anche le persone dell'altro sesso, sono sensibili al fattore Rh.

In una recente comunicazione Wiener ⁽⁴⁰⁾ ritiene che « negli individui l'attitudine ad essere sensibilizzati è trasmessa ereditariamente a mezzo di una coppia di geni alleli K e k dove K conferisce l'attitudine ad essere sensibilizzati e k è il gene normale contrastante. Circa il 97% degli individui di razza bianca appartiene al genotipo k k e perciò resiste

⁽³⁹⁾ LEVINE, KATZIN, BURRHAM e VOGEL, Amer. Journ. Obst and Gyn., 42, 925 (1941).

⁽⁴⁰⁾ WIENER, Advances in internal medicine, II, 439, 80, New York (1947).

alla sensibilizzazione od almeno non è facilmente sensibilizzabile. Circa il 3% appartiene al genotipo K k: questi sono gli individui nei quali usualmente si sviluppano manifestazioni cliniche di sensibilizzazione Rh.

I rari individui che appartengono al genotipo K K sono presumibilmente i più facili a sensibilizzarsi.

B) Nella prima o nelle due prime due gravidanze non si osserva la malattia perchè le madri hanno bisogno di una o più gravidanze per divenire sensibilizzate al fattore Rh.

C) Se il padre è omozigote, genotipo Rh Rh, tutti i figli sono Rh positivi e quindi idonei a sensibilizzare la madre. Se invece il padre è eterozigote, genotipo Rh rh, solo per metà i figli sono Rh positivi e quindi anche se la madre è Rh negativa, in assenza di figli Rh positivi, manca uno degli elementi per la formazione di agglutinine anti Rh.

D) Alcuni AA. hanno osservato che la immunizzazione della gestante verso il fattore Rh avviene più spesso se nel sistema dei gruppi sanguigni ABO il gruppo del feto è compatibile con quello della madre, quando cioè esiste una gravidanza omospecifica.

Quando invece si tratta di gravidanza eterospecifica nella quale il gruppo sanguigno del feto è diverso da quello della madre meno frequentemente si sviluppa la malattia emolitica.

In tali condizioni Wiener ed altri AA. suppongono che durante la gestazione i tessuti materni sono sottoposti alla influenza dei fattori fetali A B, e del fattore Rh. Ora essendo i primi antigeni più attivi del secondo lo sviluppo delle agglutinine anti A e anti B impedirebbe quello delle agglutinine anti Rh.

Il fenomeno sarebbe favorito allorchè i feti sono secretori di sostanze A, B, le quali, perchè in soluzione, potrebbero passare nella circolazione materna anche se questa non presentasse alcuna alterazione nella sua struttura.

Stratton ⁽⁴¹⁾ non consente in tali ipotesi poichè dalle sue ricerche risulta che il fattore Rh è presente nell'embrione umano di mm 48, quando gli agglutinogeni A e B si trovano all'inizio della loro formazione. Analoghe sono le osservazioni di MacFarlane ⁽⁴²⁾ il quale nel feto di 10-12 settimane ha trovato emazie fortemente Rh positive.

⁽⁴¹⁾ STRATTON, Nature, 152, 449 (1943); Id., id., 158, 25 (1945).

⁽⁴²⁾ Mc FARLANE e CAPPEL, Nature, 155, 542 (1945).

La gravidanza eterospecifica quindi, non eserciterebbe un'azione inibitrice allo sviluppo delle agglutinine anti Rh.

INCOMPATIBILITÀ TRA MADRE E FETO NEL SISTEMA DEI QUATTRO GRUPPI
SANGUIGNI CAUSA DI ANEMIA EMOLITICA NEL FETO

Fin dal 1905 Dienst ⁽⁴³⁾ riconobbe come causa della eclampsia gravidica una improvvisa lesione della placenta che consentiva l'entrata nella circolazione materna di sangue fetale incompatibile.

Identica era l'opinione di Ottemberg ⁽⁴⁴⁾ sulla genesi della tossiemia gravidica.

A queste ipotesi prive di prove cliniche e serologiche venne data scarsa importanza.

Maggiore considerazione fu attribuita alla teoria di Hirszfeld ⁽⁴⁵⁾ il quale sostenne, invece, che nel caso di gravidanza eterospecifica il feto poteva essere danneggiato dagli anticorpi materni a causa della permeabilità della placenta.

Da ricerche serologiche di Jonson ⁽⁴⁶⁾ e di Smith ⁽⁴⁷⁾ risultò che, durante la gravidanza eterospecifica, aumentava il titolo delle normali agglutinine materne.

In simili circostanze anche Polayes ⁽⁴⁸⁾, Kellsull ⁽⁴⁹⁾, Wiener ⁽⁵⁰⁾, Boorman ⁽⁵¹⁾ ed altri AA. trovarono che isoagglutinine materne acquistano un titolo 10-20 volte superiore a quelle normali.

Sulla base di tali osservazioni era giustificabile la ipotesi che anticorpi materni a titolo elevato potessero determinare processi emolitici nel feto allorchè non erano dimostrabili condizioni di incompatibilità Rh e Hr.

⁽⁴³⁾ DIENST, Zentral. f. Gynäk, 21, 651 (1905).

⁽⁴⁴⁾ OTTEMBERG, Journ. of the Amer. Med. Ass., 81, 205 (1923).

⁽⁴⁵⁾ HIRSZFELD, Konstitutionsserologie und Blut gruppen forschung citato da WIENER, Pubblicazioni librerie n. 5.

⁽⁴⁶⁾ JONSON, Acta Phath. Microb. Scandinav., 13, 424 (1936).

⁽⁴⁷⁾ SMITH, J. Path. and Bact., 67, 113 (1945).

⁽⁴⁸⁾ POLAYES, Americ. Journ. Dis. Child., 69, 99 (1945).

⁽⁴⁹⁾ KELSULL, Med. Journ. Australia, 2, 236 (1944).

⁽⁵⁰⁾ WIENER J., Lab. and Clin. Med., 30, 957 (1945).

⁽⁵¹⁾ BOORMAN, DODD e MOLLISON, Journ. Obst. and Gynac. Brit. Emp., 56, 1, (1944).

Differente è l'opinione di Tovey che ha studiato accuratamente tale problema.

Egli sostiene che reazioni di incompatibilità nel sistema A B O dovute alla presenza di fattori diversi nel sangue materno e nel sangue fetale non possono verificarsi poichè esiste una protezione delle emazie fetali contro le isoagglutinine materne le quali vengono fissate dalle sostanze A e B contenute nel plasma fetale e nel liquido amniotico.

Le emazie fetali possiedono inoltre una scarsa sensibilità verso gli anticorpi A e B per cui, a causa delle deboli reazioni che eventualmente si verificassero, non riuscirebbe agevole l'accertamento della incompatibilità.

E' pure da tener presente che gli anticorpi materni costituiti di molecole grandi difficilmente riescono a passare attraverso la placenta.

Maggiori difficoltà s'incontrano poi nel riconoscere come causa dell'A.E.C. la incompatibilità tra madre e feto nel sistema A B O quando nella gravidanza eterospecifica la madre è Rh negativa ed il feto Rh positivo.

Si è affermato che in tal caso gli antigeni A e B perchè più forti tendono a sopraffare l'antigene Rh e quindi la sensibilizzazione delle emazie fetali si verifica soltanto verso gli antigeni A e B, o al più contemporaneamente anche verso l'antigene Rh, mai però soltanto verso quest'ultimo. Ora poichè è dimostrato che la formazione del fattore Rh precede quella dei fattori A e B, non si comprende come questa priorità di origine, nella ulteriore evoluzione somatica, influisca sfavorevolmente sulla proprietà antigenica del fattore Rh.

Comunque, senza disconoscere il valore delle teorie esposte, allo stato attuale delle nostre conoscenze, non esiste un orientamento definitivo di giudizio che si attende da ulteriori ricerche su questo interessante problema.

DIFESA DEL FETO CONTRO L'ANEMIA EMOLITICA CONGENITA NEL SISTEMA Rh

La difesa contro tale malattia si compie durante due periodi, prenatale e postnatale.

Periodo prenatale. — In questo periodo, in caso di una prima gravidanza, occorre dimostrare, con ricerche serologiche, le cause che pos-

sono determinare l'insorgenza dell'A.E.C. e cioè padre Rh positivo e quindi feto Rh positivo e madre Rh negativa.

Accertate tali condizioni può essere tentata con qualche successo una difesa specifica.

A tale scopo si inoculano più volte nella madre gestante Rh negativa piccole quantità di sangue contenenti agglutinogeni differenti da quelli del suo gruppo.

Con questo trattamento si svolgerà un processo di immunizzazione per opera degli eteroagglutinogeni i quali si fisseranno su tutti o su gran parte dei ricettori ematici.

A causa di questo bloccaggio totale o parziale uno stimolo sensibilizzante del fattore Rh verso le emazie materne risulterà nullo o scarso e di conseguenza si potrà evitare la formazione di anticorpi anti Rh o limitarne la quantità.

Le immuni agglutinine anti A e anti B formatesi non risulteranno dannose per il feto, perchè esse verrebbero neutralizzate dalle sostanze A e B contenute nel plasma, nel liquido amniotico, nei liquidi dei tessuti e nelle secrezioni del feto.

Partendo da analogo concetto Wiener inietta sottocute un vaccino antitifico od antipertosse, e sembra all'A. che il trattamento abbia avuto successo in un caso di madre Rh negativa che, dopo aver avuto un figlio con A.E.C. diede alla luce un figlio sano.

Se questi tentativi avranno esito negativo al quinto o sesto mese di gravidanza si formeranno nel sangue materno agglutinine anti Rh le quali potranno provocare nel feto l'A.E.C. in favorevoli condizioni di immunizzazione delle emazie materne.

E poichè in tali circostanze l'arte medica non dispone di mezzi terapeutici efficaci potrebbe essere proposta la interruzione della gravidanza con le responsabilità di ordine clinico e sociale del chirurgo ed avvertendo la madre che con tale intervento non può essere assicurata in modo assoluto la incolumità del feto.

Comunque, nell'attesa del parto, è necessario essere pronti per una trasfusione di sangue Rh negativo sia per il feto che per la madre contro eventuali emorragie.

Una difesa preventiva a carattere sociale potrebbe attuarsi con il proibire matrimoni fra persone di sesso maschile Rh positivo e quelle di sesso femminile Rh negativo.

Poichè nella popolazione sono prevalenti gli individui Rh positivi 85% in confronto delle persone Rh negative 15%, il divieto non rappresenterebbe una grave limitazione della libertà del matrimonio.

Esso potrebbe, perciò, inserirsi tra le disposizioni legislative relative all'obbligatorietà dell'esame prematrimoniale.

Infine, con ampia riserva sulle gravi conseguenze sociali del sistema, accennerò che in America, allo scopo di eliminare la causa prima dell'A.E.C. si applica la inseminazione artificiale mediante individuo Rh negativo.

Periodo postnatale. — Sospetta od accertata la diagnosi di A.E.C. il trattamento razionale consiste nel trasfondere al neonato sangue compatibile Rh negativo.

In mancanza di un donatore idoneo si può far uso dei globuli rossi della madre previo accurato lavaggio per eliminare le agglutinine anti Rh.

La trasfusione si pratica per via venosa utilizzando la vena malleolare interna od altre vene superficiali, la giugulare esterna ed anche attraverso il seno longitudinale superiore.

Buoni risultati si ottengono anche mediante la puntura della tibia, mentre la inoculazione per via intramuscolare non ha dato risultati incoraggianti.

La trasfusione può compiersi al momento della nascita per via ombelicale, lasciando prima defluire il sangue dall'arteria ombelicale e sostituendolo con sangue Rh negativo.

Tenendo presente che il peso medio di un neonato è tra kg 3 e 3,500 con un volume di sangue di circa 250 cm³ tre trasfusioni di 70 cm³ ciascuna sono d'ordinario sufficienti.

In casi gravi possono praticarsi anche cinque, sei trasfusioni o si ricorre subito dopo la nascita alla esanguino trasfusione che consiste nella sottrazione totale o subtotale del sangue al neonato sostituito contemporaneamente dal sangue del donatore.

I vari metodi indicati a tale scopo esigono una particolare competenza del medico trasfusore.

Con la trasfusione di sangue gli eritrociti Rh positivi, talora in numero ultranormale a causa di una ematopoiesi eccessivamente attiva, vengono, poco a poco, sostituiti da eritrociti Rh negativi verso i quali le agglutinine anti Rh non potranno esercitare alcuna azione nociva.

Per la difesa del bambino è, inoltre, da ricordare che le agglutinine anti Rh presenti nel sangue della madre si trovano anche nel latte e, quindi, non è consigliabile che il bambino venga allattato al seno materno.

A tale proposito, è da tenere presente che le agglutinine dopo alcune settimane scendono ad un titolo talmente basso per cui il latte non risulta più dannoso.

In tal caso, previo accertamento serologico, può consentirsi il ripristino dell'allattamento materno.

Occasionalmente poi, se il latte materno è abbondante, può essere estratto ed utilizzato previo riscaldamento a 60° per distruggere le agglutinine.

Determinazione del fattore Rh. — Della scoperta del fattore Rh si ebbero notizie solo nell'agosto 1944, successivamente alla liberazione di Roma, da riviste fornite gentilmente da autorità alleate e da informazioni personali di colleghi inglesi ed americani.

Per iniziare gli studi su tale fattore occorreva disporre di sieri anti Rh che vennero preparati immunizzando conigli e cavie con la tecnica consigliata da Landsteiner e Wiener.

Ai conigli nella vena marginale dell'orecchio vennero inoculati per tre settimane 2 cm³ di una sospensione di emazie 5% appartenenti a due esemplari di *Macacus Rhesus* unici rimasti delle numerose scimmie già esistenti nello stabulario dell'Istituto Superiore di Sanità.

Dopo sette giorni dall'ultima inoculazione si prelevava dal cuore un campione di sangue dal quale, dopo coagulazione si separava il siero.

Assorbite le eteroagglutinine umane anti A e anti B con emazie A e B il siero si cimentava con emazie del M. R.

Se la prova risultava positiva si procedeva al salasso dell'animale.

In caso contrario venivano inoculate altre due o tre dosi di emazie di M. R.

I sieri si conservavano in frigorifero a + 4°.

I titoli erano sempre bassi 1.4, 1.8, in qualche raro caso 1.16 verso emazie umane.

Inoltre l'attività diminuiva gradatamente, e si esauriva in venti, venticinque giorni.

Le cavie si sceglievano tra quelle con mantello bianco che, d'ordinario, non possiedono agglutinine antiumane.

Esse venivano inoculate per via peritoneale cinque volte con intervallo di cinque giorni con un volume di emazie lavate corrispondente a due volumi di sangue.

Durante il trattamento, dopo due o tre iniezioni gli animali divenivano cachettici e nella percentuale del 50-70% morivano prima dell'ultima inoculazione.

Dopo una settimana dalla quinta iniezione si controllava il titolo del siero e nel caso favorevole l'animale veniva salassato.

I sieri ottenuti dalle cavie possedevano titoli più elevati di agglutinine 1/100 a 1/220 verso emazie umane, ma anche la loro attività era limitata.

Nel complesso i sieri animali così preparati non hanno dati risultati molto soddisfacenti.

Si è tentato poi di provvedersi di sieri anti Rh da madri di bambini affetti da A.E.C. ma difficoltà di varia natura non hanno consentito di raccogliere sieri in tale quantità ed a titolo elevato per lo studio del fattore Rh.

Il lavoro potè procedere con metodo ed alacrità allorchè fu possibile disporre di sieri umani anti Rh acquistati in America, Inghilterra, Olanda dall'Istituto Superiore di Sanità.

Questi sieri sono più attivi di quelli ottenuti dagli animali i quali, inoltre, presentano lo svantaggio di essere idonei a classificare soltanto il tipo Rh₀, e di agglutinare intensamente i globuli rossi del feto e del neonato siano Rh positivi che Rh negativi.

Per la dimostrazione del fattore Rh si è seguita la tecnica raccomandata da Landsteiner e Wiener.

Il sangue prelevato da una vena del gomito viene posto in un tubo conico contenente un anticoagulante.

Si lava due volte con soluzione salina e si centrifuga per eliminare il plasma.

Preparata una sospensione di emazie 2% in soluzione salina, per mezzo di una pipetta Pasteur, se ne versa una goccia in un tubo a fondo

curvo alto cm 6-7 e con diametro interno di mm 5-7 alla quale con altra pipetta Pasteur si aggiunge una goccia di siero anti Rh.

Le pipette devono essere calibrate perchè nella miscela i componenti abbiano l'istesso volume.

E' necessario eseguire le prove con tre sieri anti Rh di ciascun tipo anti Rh₀, anti Rh', Rh''.

Per controllo si allestiscono tubi nei quali tutti i sieri si mescolano con note emazie Rh positive ed Rh negative; in un altro tubo alle emazie si aggiunge soltanto soluzione salina. I tubi si agitano per rendere la miscela omogenea e poi, soprapponendovi un coperchio di vetro per evitare la evaporazione e le eventuali contaminazioni, si mantengono in termostato a 37° C per un'ora.

Sebbene alcuni sieri diano reazioni soddisfacenti a temperatura della stanza da lavoro quelle a 37° C sono più intense.

Per la lettura delle reazioni è conveniente servirsi di una lente a mano.

Quando la reazione è negativa il sedimento appare omogeneo, a contorni regolari, se è positiva si presenta a contorni irregolari, frastagliati.

Avendo osservato che, talvolta, una reazione macroscopicamente positiva risultava negativa all'esame microscopico questo come controllo integrativo della tecnica precedente non è stato mai omesso nelle prove da me eseguite.

Ricorderò a tale proposito che nell'eseguire con l'uso dei tubi determinazioni di gruppi sanguigni nel sistema A B O qualche rara volta, dopo centrifugazione, il sedimento mostrava l'aspetto caratteristico di una reazione positiva per il fattore Rh.

In tali casi all'esame microscopico si notavano emazie agglutinate ed emazie sotto forma di impilamento, che scomparve aggiungendo alla miscela qualche goccia di soluzione salina.

Nel distendere il sedimento sul vetrino per l'esame microscopico una delicatezza ancora maggiore occorre usare in questa prova, poichè gli agglutinati costituiti d'ordinario, da un numero di emazie più scarso di quello che si osserva nella determinazione di altri fattori più facilmente tendono a disgregarsi.

Determinazione delle agglutinine anti Rh. — La ricerca delle agglutinine anti Rh deve eseguirsi quando la gestante è Rh negativa ed il marito Rh positivo ed in tutti i casi di ripetute trasfusioni se al ricevente Rh negativo è stato trasfuso il sangue di un donatore Rh positivo.

Nel siero della madre gestante le agglutinine anti Rh non sono sempre dimostrabili anche in presenza di feti colpiti da grave A.E.C.

Ciò può dipendere dalla scarsa sensibilità delle emazie materne a produrre agglutinine e dall'epoca in cui si esamina il siero il cui potere agglutinante aumenta dopo il parto e raggiunge un titolo elevato fra sette e venti giorni.

E' questo il periodo più favorevole per dimostrare la presenza delle agglutinine anti Rh le quali, tuttavia, in qualche caso eccezionale, sono state riscontrate anche dopo 5 anni dal parto.

Un'altra possibile spiegazione è che tali agglutinine hanno tendenza a fissarsi alle cellule dei tessuti così che la quantità degli anticorpi circolanti è talmente scarsa da non essere dimostrabile.

Infine, come si vedrà in seguito, può trattarsi di anticorpi bloccanti od incompleti rilevabili con particolari accorgimenti di tecnica.

La determinazione delle agglutinine anti Rh si esegue con tecnica analoga a quella descritta per la ricerca del fattore Rh, sostituendo nella prova il siero anti Rh con il siero della gestante Rh negativa o con il siero del ricevente.

Per la titolazione delle agglutinine anti Rh si preparano diluizioni progressive del siero da 1:2 a 1:1024 e mettendo poi a contatto una goccia di ciascuna diluizione con una goccia di sospensione 2% di emazie Rh positive. La massima diluizione nella quale l'agglutinazione è nettamente positiva indica il titolo dell'agglutinina anti Rh.

Per una esatta valutazione della prova sono necessari alcuni rilievi.

Può accadere che la reazione con sieri non diluiti risulti meno evidente che con sieri diluiti, ed è perciò opportuno di variare nella prova la concentrazione del siero in esame.

La maggior parte delle agglutinine anti Rh sono dimostrabili alla temperatura di 37° C ma, in rari casi, solo a bassa temperatura. Queste « atipiche agglutinine da freddo » possono, quindi, nella prova dar luogo ad inesatte interpretazioni.

Anticorpi bloccanti od incompleti. — Ma un fenomeno più interessante e di notevole importanza pratica è stato descritto contemporaneamente da Wiener ⁽⁵²⁾ e Race ⁽⁵³⁾.

Alcuni sieri appartenenti a madri Rh negative portatrici di feti con A.E.C. invece di agglutinine anti Rh contengono anticorpi Rh capaci di fissarsi agli eritrociti senza agglutinarli, designati *anticorpi incompleti, bloccanti o agglutinoidi*.

Essi in vitro non danno luogo al fenomeno di agglutinazione, ma possono provocare nel feto reazioni emolitiche da trasfusione.

Per svelare la presenza di anticorpi bloccanti Wiener propose la seguente tecnica.

In un tubo da emolisi si pone una goccia del siero della madre ed una goccia di sospensione 2% di emazie O Rh positive.

Dopo che la miscela è stata mantenuta per 1 h. a 37° C si procede alla lettura macroscopica e microscopica della reazione.

Se non si nota alcuna agglutinazione e si ha il sospetto di anticorpi bloccanti si aggiunge alla miscela una goccia di siero anti Rh di sicura attività e si pone di nuovo in tubo a 37° C per un'ora.

Alla seconda lettura non si osserverà agglutinazione o questa sarà assai debole in presenza di anticorpi bloccanti i quali, fissandosi sui ricettori posti alla superficie dei globuli rossi, hanno impedito al siero anti Rh di svolgere la sua azione agglutinante.

Se invece il siero del paziente non contiene anticorpi bloccanti si osserverà una chiara agglutinazione.

La prova descritta non offre risultati sicuri poichè può accadere che gli anticorpi bloccanti si fissino solo in parte sui ricettori globulari ed in tal caso il siero anti Rh aggiunto alla miscela, agendo sui rimanenti ricettori liberi, darà luogo alla formazione di piccoli ma evidenti ammassi di emazie.

Incerti risultati si ottengono, inoltre, in questa prova se nel siero materno coesistono agglutinine anti Rh ed agglutinoidi.

In tal caso questi, verso i quali le emazie hanno una maggiore avidità, si fisseranno prima delle agglutinine anti Rh ai ricettori ematici

⁽⁵²⁾ WIENER, Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., 173 (1944).

⁽⁵³⁾ RACE, Nature, 153, 771 (1944).

senza dar luogo all'agglutinazione per cui mancherà la dimostrazione della contemporanea presenza delle agglutinine anti Rh.

Metodo di conglutinazione di Wiener. — Per queste considerazioni, confermate anche da altri AA., Wiener (⁵⁴) propose un nuovo metodo, che definì di conglutinazione, nel quale l'agglutinazione si manifesta nella miscela di prova quando, oltre l'antigene Rh e l'anticorpo in esame, interviene una terza sostanza di natura colloidale che egli chiamò conglutinina, costituente plasmatico simile alla proteina X, complesso molecolare di globulina, albumina e fosfolipide.

In analogia con la funzione del complemento nella tecnica serologica, dal quale peraltro si distingue perchè resiste al riscaldamento a 60°, tale sostanza sensibilizza i globuli rossi all'azione di agglutinine anti Rh deboli od incomplete dando luogo all'agglutinazione.

In questa prova non deve usarsi la soluzione salina per preparare la sospensione dei globuli rossi al 2%, poichè la conglutinazione, in presenza di soluzioni saline, rapidamente si dissocia nei suoi componenti, e perde la proprietà sensibilizzatrice.

Gli eritrociti vengono, perciò, sospesi nel siero o meglio nel plasma del paziente, o di individui appartenenti al gruppo AB contenenti la conglutinina.

Il siero in esame si adopera non diluito, e nel caso che si voglia determinarne il titolo le diluizioni invece che con la soluzione salina si allestiscono con l'istesso diluente adoperato per la sospensione delle emazie.

Per la esecuzione della prova si osservano le stesse norme indicate per la ricerca delle agglutinine anti Rh.

Per mezzo della prova di conglutinazione Wiener spiega perchè i feti Rh positivi sensibilizzati da anticorpi anti Rh materni non sempre presentano alla nascita segni di A.E.C. che insorgono, invece, alcuni giorni dopo.

In tali casi, secondo l'A., gli anticorpi bloccanti contenuti nel siero materno sono incapaci di dare luogo ad agglutinazione in vitro ed a processi emolitici del feto in utero, perchè la proteina X, che è l'elemento indispensabile della reazione, non si trova nel plasma fetale, ma si forma subito dopo la nascita.

(⁵⁴) WIENER, Amer. Journ. Clin. Path., 12, 302 (1942).

Tale ipotesi è però contraddetta da osservazioni cliniche ed anatomiche patologiche dalle quali risulta che quando il siero materno è ricco di anticorpi bloccanti il feto muore prematuramente e spesso in stato di macerazione con reperto autopsico di grave anemia emolitica, e che verso il quinto mese di gestazione possono verificarsi aborti per idrope fetale.

Sotto l'aspetto tecnico è pure da osservare che quando il siero della madre contiene soltanto deboli anticorpi bloccanti, può aver luogo secondo alcuni AA. una pseudoagglutinazione priva di specificità, per cui si rende difficile una esatta interpretazione della prova.

Recentemente anche Lattes ⁽⁵⁵⁾ conferma tale inconveniente che egli attribuisce all'impiego di siero inattivato a 56° C.

ALTRI METODI PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI BLOCCANTI

Per la dimostrazione di anticorpi bloccanti Coombs, Mourant e Race ⁽⁵⁶⁾ hanno proposto un altro metodo basato sulla osservazione che se un siero materno che li contiene viene messo a contatto con globuli rossi Rh positivi le globuline vengono assorbite sulla loro superficie senza dar luogo ad agglutinazione, la quale si manifesterà con l'aggiunta di siero umano antiglobulinico.

La prova si esegue nel modo seguente.

Una goccia di siero da esaminare inattivato a 56° C per mezz'ora ed una goccia di una sospensione di emazie Rh positive al 2% in soluzione salina 0,85% si versano in un tubo da emolisi.

Previa agitazione il tubo si lascia in termostato a 37° C per mezz'ora e le emazie si lavano poi due volte con soluzione salina per rimuovere ogni traccia di siero.

Si prepara poi con l'istessa soluzione salina una nuova sospensione al 2% di questi globuli rossi della quale una goccia si versa in un tubo aggiungendovi poi una goccia di siero umano antiglobulinico.

Il tubo è di nuovo posto in termostato a 37° C per 1 h. L'agglutinazione, se si verifica, dimostrerà la presenza di anticorpi bloccanti.

⁽⁵⁵⁾ LATTES, Rassegna clinico scientifica, 673 (1947).

⁽⁵⁶⁾ COOMBS, MOURANT e RACE, Lancet, 2, 15 (1945); Id., Brit. J. Exp. Path., 26, 255 (1945).

Come controllo, seguendo la stessa tecnica, si adopera un siero inattivato a 56° per mezz'ora non contenente nè agglutinine nè agglutinoidi verso i globuli rossi adoperati.

Descriverò in ultimo un altro metodo proposto da Diamond e Alberson ⁽⁵⁷⁾ per la ricerca degli anticorpi bloccanti.

Una goccia di una sospensione di emazie 2% preparata con una soluzione 20% di albumina umana o bovina ed una goccia del siero materno si pongono in un vetrino.

Dopo un'ora di permanenza in termostato si procede alla lettura della reazione.

Gli AA. affermano che con tale metodo si mettono in evidenza anticorpi bloccanti anche se questi sono in tale quantità da inibire l'agglutinazione con la tecnica ordinaria.

Le reazioni positive raggiungono un'alta percentuale 99%.

Oltre quelle descritte un'altra prova diretta a svelare la sensibilizzazione delle emazie al fattore Rh e chiamata « prova biologica » è riferita da Wiener, Wexler and Gambrin ⁽⁵⁸⁾.

Essa non venne sperimentata perchè mancavano i mezzi opportuni per eseguire ricerche serologiche nel siero di madri Rh negative allo scopo di svelare anticorpi Rh.

La prova consiste nell'inoculare per via venosa alla paziente Rh negativa cm³ 50 di sangue Rh positivo o del marito o di un donatore Rh positivo di gruppo compatibile con quello della donna.

Il sangue viene mescolato con 100 cm³ di soluzione salina ed inoculato lentamente a gocce col metodo della gravità.

Per giudicare se la paziente è sensibilizzata al fattore Rh si osserva il colore del plasma prima e dopo la trasfusione.

Il colore più scuro del plasma dopo la inoculazione denota un processo emolitico consecutivo ad una precedente sensibilizzazione delle emazie.

Una valutazione più esatta a tale riguardo si ottiene mediante la determinazione dell'indice itterico.

Se invece il colore non ha subito alcuna modificazione la prova è da ritenersi negativa e nei casi dubbi può essere ripetuta.

⁽⁵⁷⁾ DIAMOND e ALBESON, Journ. lab. and Clin. med., 30, 204 (1945).

⁽⁵⁸⁾ WIENER, WEXLER and GAMBRIN, Journ. Dis. Child., 68, 317 (1944).

Se la prova risulta positiva compaiono nel siero della madre anticorpi anti Rh che, però, presto scompaiono.

La prova va eseguita con oculata prudenza, ed è consigliabile il ricovero della gestante in ospedale per un immediato intervento in caso di inconvenienti.

Oltre al fattore Rh sono stati descritti i seguenti antigeni.

Antigene H. Br. [Mourant ⁽⁵⁹⁾]. — Un paziente H. Br. gruppo O affetto da anemia emolitica di incerta natura, dopo aver ricevute numerose trasfusioni di sangue omologo, avvertì nelle ultime trasfusioni fenomeni che si ritennero dovuti ad incompatibilità

Il suo siero, ottenuto nell'aprile 1944, conteneva un anticorpo che agglutinava le emazie di circa il 96% di donatori di gruppo fino al titolo di 1/640.

Successivamente il titolo si abbassò fino a 1/20 nel gennaio 1945. In quest'epoca con tale siero furono provate le emazie di 662 donatori di gruppo O e di altri di cui mancano indicazioni di gruppo.

I risultati dimostrarono la presenza del fattore Br in 69 Rh negativi ed in 5 Rh positivi.

Lutheran antigen [Callender, Race, Paykoc ⁽⁶⁰⁾]. — E' presente nel 12% della popolazione inglese e non ha alcun rapporto con altri gruppi sanguigni.

Questo antigene aveva causato la formazione di corrispondenti anticorpi, anti Lutheran, in un ricevente dopo una trasfusione di sangue, ma non è noto se abbia determinato fenomeni reattivi.

«*Kell*» *antigen* [Coombs, Mourant, Race ⁽⁶¹⁾]. — E' responsabile probabilmente di A.E.C. in un neonato.

Il siero della madre «Kell» negativa agglutinava le emazie dei suoi bambini, del marito ed il 7% di sangue di individui esaminati a caso.

Anche questo antigene non ha alcun rapporto con altri gruppi sanguigni.

Antigene SI. — Recentemente Wiener e Gordon ⁽⁶²⁾ riferiscono il

⁽⁵⁹⁾ MOURANT, *Nature*, 155, 542 (1945).

⁽⁶⁰⁾ CALLENDER, RACE e PAYKOC, *Brit. Med. j.*, 2, 83 (1945).

⁽⁶¹⁾ COOMBS, MOURANT e RACE, *Lancet*, 1, 264 (1946).

⁽⁶²⁾ WIENER e SONN GORDON, *Revue d'Hematologie*, 21, P. 3 (1947).

caso di una donna di 63 anni la quale subì violente reazioni dopo una serie di trasfusioni di sangue apparentemente compatibili.

Con opportune indagini serologiche gli AA. dimostrarono che il siero di sangue dell'ammalata conteneva un anticorpo univalente anormale non riferibile ai gruppi sanguigni A, B, O, M, N, ed ai tipi Rh ed Hr e formatosi in seguito a sensibilizzazione da un fattore ignoto il quale venne designato con il simbolo S.I. che ricorda le prime due lettere del nome dell'ammalata.

Identificato per mezzo del siero della malata un donatore privo del fattore S.I. la paziente ricevette una trasfusione di 600 cm³ di sangue senza alcun inconveniente.

Questo fattore venne identificato nel 12,9% dei Caucasici.

La conoscenza di questi ultimi fattori che non hanno l'importanza del fattore Rh nella patogenesi dell'A.E.C. costituisce, tuttavia, una guida utile per gli studiosi che si interessano del problema dei gruppi sanguigni, allorchè nelle indagini serologiche trovassero agglutinine irregolari differenti dalle altre descritte.

RIASSUNTO DI RICERCHE SUL FATTORE Rh

Presso l'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il prof. De Sanctis Monaldi capo del laboratorio di analisi presso l'Ospedale di S. Camillo di Roma sono state eseguite 600 determinazioni per il fattore Rh, di cui 510 (85%) risultarono positivi e 90 (15%) negativi.

Di questi ultimi 41 individui fanno parte del Comitato datori di Sangue della Provincia di Roma e 19 appartengono ad istituti clinici, ospedalieri ed a privati.

Grazie alla cortesia di pediatri e di colleghi che ci hanno indirizzato i casi, abbiamo potuto inoltre studiare 24 famiglie affette da A.E.C. del neonato.

In 19 di queste famiglie la sindrome conclamata si è manifestata col progredire delle gravidanze, in genere dalla terza in poi, in 5 casi la sindrome emolitica si è stabilita già alla prima gravidanza.

In tutti i casi abbiamo potuto dimostrare che le madri, pur appartenendo ai vari gruppi A B O erano tutte Rh negative, mentre i nati ed i rispettivi padri erano Rh positivi.

Dei 24 nati, 9 sono morti e di questi:

- 6 per ittero grave progressivo;
- 1 per anemia eritroblastica;
- 1 per anasarca fetoplacentare;
- 1 per anemia grave.

Tre volte la gravidanza si è interrotta per aborto al 7° al 9° mese.

I 12 bambini sopravvissuti per l'azione benefica di trasfusioni di sangue omologo Rh negativo sono tutti in perfetta salute.

Di questi:

- 1 presentò ittero grave nei primi giorni di vita;
- 3 presentarono anemia eritroblastica;
- 4 ittero lieve;
- 4 anemia lieve.

Nel siero di sangue materno prelevato verso il 10° giorno dopo il parto sono state poste in evidenza le agglutinine irregolari anti Rh sia nella loro forma completa che come anticorpi bloccanti.

In genere i tassi di tali agglutinine si sono aggirati tra $1/2$ e $1/64$.

In parecchie madri abbiamo anche potuto mettere in evidenza gli anticorpi anti Rh nel latte, il che conferma il divieto di allattamento per le madri di bambini affetti da anemia emolitica.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Epidemiologia.
Agosto 1948.

PUBBLICAZIONI LIBRARIE

1. - L. LATTES, L'individualité du sang, Masson et C^{ie}, Editeurs, Paris (1929).
2. - R. DUJARRIE DE LA RIVIÈRE et N. KOSOVITCH, Les groupes sanguins, J. Baillière et fils, Editeurs, Paris (1936).
3. - P. INTROZZI, La trasfusione del sangue nei suoi effetti biologici e nelle sue indicazioni cliniche, Tipografia già Cooperativa Pavia (1937).
4. - FRITZ SCHIFF M. D. and WILLIAM C. BOY D. PH. D., Blood Grouping Technique Interscience Publishers, Inc. New York (1942).
5. - ALEXANDER S. WIENER A., Blood Groups and Transfusion, Charles C. Thomas Publisher, Springfield Illinois, Baltimore, Maryland (1943).
6. - Medical Research Council, War Memorandum n. 9, The Determination of Blood Groups, Published by his Majesty's Stationery Office (1943).
7. - DAVID HARLEY, Medico Legal Blood Groups Determination, William Heinemann, Medical Books, Lim., London (1944).

8. - JAMES A. PHALEN M. D., Colonel U.S. Army, The Blood Plasma Program, Issued by the Office of Medical Information, Washington, July 75 (1944).
 9. - ARNAULT TZANCK et PAUL CHICHE, Reanimation et Transfusion sanguigne, G. Doin et C.ie, Editeurs, 6 Place de l'Odéon, Paris (VI) (1945).
 10. - Nouveautés Hematologique Americains, G. Doin et C.ie, Editeurs, 6 Place de l'Odéon, Paris (VI), Paris (1946).
 11. - J. VAN LOGHEM Jr. en G. J. KLOOSTERMAN, Het Khesusvraagstuk en Erythroblastosis foetalis, Scheltema & Holkema's Boekhandel en Nitgevers Maatschappij N. V., Amsterdam (1946).
 12. - TARSITANO F, Tecnica delle ricerche sull'individualità del sangue, Edizioni Scirentifiche Italiane, Napoli (1946).
 13. - Atti del III Congresso Nazionale della Trasfusione del Sangue, Milano 23-25 settembre 1946, edito a cura dell'A.V.I.S.
-