



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA

EL PASO DE HEMATÍES FETALES A LA
CIRCULACIÓN MATERNA DURANTE EL
PARTO. PROFILAXIS DE LA
ISOINMUNIZACIÓN RH.

AUTOR: José Domingo Álvarez Domínguez

DIRECTOR: José María Bedoya González

9 de Septiembre de 1973

R. 3.943



T.D.
A/4

EL PASO DE HEMATIES FETALES A LA CIRCULACION MATERNA
DURANTE EL PARTO. PROFILAXIS DE LA ISOIMPUINIZACION Rh.



DON JOSE LABEDUYA GONZALEZ, CATEDRATICO NUMERARIO,
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICO: que la Tesis Doctoral titulada "el paso de hematies
fetales a la circulacion materna durante el parto. Profi -
laxis de la isoimmunizacion Rh" presentada por el Licencia-
do en Medicina D. Jose Domingo Alvarez Gonzalez, se ha reali-
zado en este Departamento, bajo mi direccion.

Sevilla a 9 de Setiembre 1973

Con la ayuda del Prof.J.M.Bedoya
y la colaboracion del Dr.J.F.Bedoya (
y Mr.Abelí he realizado esta Tesis.
GRACIAS.

INDICE

INDICE

	<u>Nº pag</u>
Introduccion	1
Breve historia del conocimiento del paso o transplacentario de hematies fetales a la madre	4
Metodo	18
a) Extension de sangre	18
b) Elucion de la hemoglobina adulta	19
c) Tincion ,.....	20
d) Calculo del volumen de hematies fetales en sangre materna ..	22
Material	27
a) El paso de hematies fetales a la madre segun tipo de parto.	30
b) La cuantia del paso de hematies del feto a la madre	34
c) Grupo sanguineo de madre y niño con respecto al sistema ABO ..	38
d) El empleo de gamma-globulina anti-Rh	39

nº pag

e) Resultados de la profilaxis	40
Conclusiones	43
Bibliografía	46

INTRODUCTION

INTRODUCCION

Con el conocimiento moderno, a partir de I 94I (LEVINE y COLS), de que la llamada "Eritroblastosis fetal" era consecuencia del paso de anticuerpos desde una madre Rh - negativa, sensibilizada previamente por transfusión de sangre Rh positiva o por un embarazo anterior con feto Rh positivo, y que actuaban sobre los hematíes con antígeno Rh produciendo hemólisis, se planteó el problema de como se producía la sensibilización materna si los sistemas circulatorios de la madre y del huevo, eran, en la placenta, próximos vecinos, pero independientes..Forzosamente, sin embargo, habían de pasar en determinadas circunstancias, hematíes desde el feto a la madre en proporciones suficientes para estimular en ella la formación de anticuerpos.

Resultaba imposible evitar que, en determinadas circunstancias, pasaran hematíes fetales a la madre, imposible evitar que, si eran Rh positivos y la madre Rh negativos formara ésta los anticuerpos correspondientes. Y tampoco se podía evitar que estos anticuerpos actuaran sobre los hematíes de un huevo feto Rh positivo y que éste padeciera las consecuencias de lo que se llamó " isoimmunización ".

Pero, a partir de 1.964 (FREDA y GORMAN) se conoció la posibilidad de evitar que las madres Rh negativa, desarrollaran anticuerpos en un embarazo de feto Rh positivo, mediante la administración de suero rico en anticuerpos Rh que bloqueen a los antígenos que pasarán en el parto (globulina anti Rh).

Desde entonces cobra interés práctico conocer si han pasado no hematíes fetales a la madre (para utilizar ó no la globulina anti Rh) y la cuantía del paso de hematíes) para administrar la adecuada cantidad de anticuerpos; la globulina anti Rh es cara y no debe ser empleada, indiscriminadamente, en todas las madres Rh negativo de feto Rh positivo.

Con esta finalidad práctica hemos aprendido
do:

- a) la investigación del paso de hematíes fetales Rh positivos a madre Rh negativa.
- b) el resultado del empleo de la globulina anti Rh.

.....///.....

HISTORIA

A) BREVE HISTORIA DEL CONOCIMIENTO DEL PASO TRANS
PLACENTARIO DE HEMATIES FETALES A LA MADRE.

Iª) El crecimiento y permanencia del feto humano en el útero materno durante el embarazo es equivalente a un homotransplante y no ha sido aclarado todavía como el organismo materno tolera la presencia de otro organismo, el fruto, genéticamente distinto a él.

Se ha querido explicar el fenómeno por una falta de maduración de los antígenos fetales; pero la explicación no es satisfactoria porque han sido demostrados en fetos de 38 días, antígenos anti Rh maduros. (BERGSTRON, COLS).

También se ha emitido la idea de cierta inercia inmunológica por parte del organismo materno (BILLINGHAM, CURRIE, etc.) y ello casa bien con el hecho de que el sistema ofensivo es más débil que en las no gestantes.

Parece probable, más bién, que el feto mismo se proteja del rechazo mediante algún mecanismo protector (WERF) y que el trofoblasto sea una auténtica barrera, entre la madre y el feto; no sólo barrera anatómica, sino también inmunológica (BILLINGHAM; CURRIE; ZIMMERMANN).

La presencia en la madre de anticuerpos - frente a antígenos presentes en los hematíes fetales exige, sin embargo, que haya permeabilidad de la placenta para los elementos sanguíneos en determinadas circunstancias, lo que no parece posible según lo que se describe clásicamente con relación a la estructura de la placenta humana y de las vellosidades coriales.

2º) Siñ embargo, en 1.947, MAESLUND y COLS presentaron microfotografías de placentas de toxémicas al final del embarazo, en las que se demostraba la falta de epitelio en algunas vellosidades coriales y que los vasos fetales estaban en contacto directo con la sangre materna. En algunos puntos falta, incluso, la pared vascular de tal modo que hay una comunicación directa entre las circula-ciones sanguíneas de la madre y el feto.

KLINE, comprobó, entre 343 placentas normales, varias brechas en la barrera placentaria. Describe estos defectos como alteraciones degenerativas ó necróticas de la superficie de las vellosidades y acepta que han pasado hematíes fetales a la madre por el hallazgo de hematíes nucleados en los espacios intervellosos, así mismo acepta también el paso, en sentido inverso, de hematíes maternos al feto. Tales fallos en la barrera placentaria los halla a partir del tercer mes del embarazo y con mayor frecuencia a medida que se aproxima el término.

Este mismo hallazgo (brechas en la pared de las vellosidades y hematíes nucleados en el espacio intervelloso) fué confirmado por BICKEMBACK y COLS en placentas de eritroblastosis.

También JAVERT y REISS† investigaron cerca de dos mil placentas en busca de los llamados " Hematomas intervellosos " y los hallaron con tanta mayor frecuencia cuanto más avanzado era el embarazo; la mayor proporción de hallazgos positivos fue en placentas de toxemias y de eritroblastosis.

Análogas observaciones histológicas fueron realizadas por SCHILLER, por WENTWORT, por DEVI y COLS etc. de tal modo que hubo de ser aceptado el hecho de que, con frecuencia, la barrera placentaria se rompe y que, en consecuencia, hematíes fetales pasan al espacio intervelloso y a la circulación materna; tanto más cuanto más avanzado era el embarazo y especialmente en placenta de toxémicas y eritroblastosis.

El hecho de que los hematíes habían pasado a través de la barrera placentaria fue puesto de manifiesto, de manera indudable y por primera vez, en 1.946 por NAESLUND y COLS, mediante la demostración de eliptocitos y también con ayuda de hematíes marcados con fósforo radioactivos; inyectados a la madre antes del parto, los encontraron en el feto después del nacimiento. Este mismo hecho fue confirmado por MENGERT y COLS (1.955). Mediante técnicas de inmunofluorescencia, FISCHER y MULLER, encuentran hematíes maternos en la sangre de recién nacidos en 32 casos de 55 investigados.

Tampoco puede dudarse ya hoy de que hematíes fetales pueden pasar, en ocasiones, a los lagos maternos intervellosos y a la circulación materna. La demostración de este hecho se hace posible por varias propiedades que permiten distinguir los hematíes fetales de los maternos; y basados en ellos se han podido elaborar métodos de aglutinación diferencial y hemodiálisis diferenciales. Especialmente eficaz para esta finalidad, se han mostrado las técnicas que permiten distinguir los hematíes fetales de los maternos por las características de su hemoglobina.

En efecto, durante el desarrollo humano, desde el embrión hasta el individuo adulto, aparecen tipos distintos de hemoglobina. Así, al comienzo del desarrollo embrionario se forma hemoglobina alfa que sólo se encuentra en los primeros estadios. En el feto, la hemoglobina F es la que se forma; hemoglobina A se empieza a formar ya en el 3º mes (BARBINI), aunque es muy pequeña cantidad; a partir del 4º mes la proporción hemoglobina F / hemoglobina A se modifica progresivamente porque va aumentando la proporción de la Hgb A en tanto que la Hgb F se mantiene estabilizada (BRADY y NILSSON) hasta el final del embarazo.

En un recién nacido normal, por término medio, el 70 % de su hemoglobina es de tipo F y el resto de hemoglobina A (BEAVEN y COLS)BRODY; SCHNEIDER y LUDWI), aunque la proporción puede variar ampliamente. Después del nacimiento disminuye rápida y progresivamente la hemoglobina F y desaparece en el transcurso del primer año, aunque a veces se encuentre también más tarde.

3º) La detección de hematíes fetales en la sangre materna.-

Las hemoglobinas F (Fetal) y A (Adulta) - tienen distinta estructura molecular que conduce a distintas propiedades bioquímicas y, en consecuencia, a la posibilidad de distinguirlas y de distinguir también los hematíes fetales que tienen hemoglobina F, de los hematíes adultos (hemoglobina A).

Así, hace ya más de un siglo, que KORBBER señaló que la sangre de los adultos se desnaturaliza, por la acción de un alcalí, con mayor rapidez que la sangre del cordón umbilical. Algunos han aprovechado esta particularidad para descubrir la Hgb F.

Así mismo se han utilizado, para distinguir ambas hemoglobinas, el calor (BETKE y GREINACHER), electroforésis (BEAREN y COLS), las propiedades antigénicas de la hemoglobina F (CHERNOFF)

Para la demostración de células sanguíneas fetales en la sangre materna se necesita disponer de un método que permita descubrir los hematíes fetales aunque estén en pequeña proporción en la sangre de la madre. Esta exigencia se cumple en la técnica elaborada por KLEIHAUER y colaboradores y que, en la práctica actual, es la usada, con pequeñas variantes, en todas las investigaciones modernas sobre el problema.

El principio del método elaborado por KLEIHAUER consiste en que, en una extensión de sangre sobre un porta-objetos, fijada por alcohol, y bañada en una solución ácida Puffer, la hemoglobina A es eluida más rápidamente que la hemoglobina F. Lo que no se ha aclarado aún es el mecanismo por el que este hecho sucede; para KLEIHAUER se trata de un proceso en el que interviene la molécula de hemoglobina.

La técnica, elaborada por KLEIHAUER y COLS es como sigue :

I^o) Sangre, obtenida por punción venosa, se deposita en tubo heparimizado y se mantiene a 4^o C.

La extensión de esta sangre, sobre porta-objetos, debe hacerse antes de una hora (antes - hay que mezclar suavemente la sangre en el tubo heparinizado).

Aspirar, con pipeta, 0,1 cc. de sangre y mezclar con 0,2 cc. de Solución de CLNa al 9%.

Sobre porta-objetos bién limpio se hacen extensiones de unos 2 cms., de ancho y 5 ó 6 cm de largo y se dejan secar al aire.

Fijación en alcohol etílico de 80^o - 90^o durante 5 minutos a temperatura de 20^o - 22^o. La vado de agua corriente y secado al aire.

La elución de la hemoglobina A de los hematíes se hace con la solución Puffer de McYLVAYNE en la que se sumergen los porta-objetos durante 5 minutos. Lavado con agua corriente y secado al aire.

Coloración de la extensión de sangre con:

- a) Hematoxilina ácida de EHERLICH durante 3 minutos; Lavado y secado.
- b) Eritrosina MERCK al 1% 0,3 minutos; lavado y secado.

KLEIHAUER y la mayoría utilizan sangre extraída por punción venosa, pero también se ha hecho con sangre capilar.

Como fijadi se ha usado generalmente, alcohol etílico al 80%, pero también alcohol etílico absoluto, metanol, Isopropanol.

Como anticoagulante en los tubos, por lo común se ha empleado heparina sirve también el Citrato sódico, Oxalato, con los mismos resultados.

También ha sido modificado el medio de elución de la Hgb A.

2º) El recuento de los hematíes fetales (Hgb F) se ha hecho de diversos modos:

a) Recuento de los hematíes fetales que pueden verse en un determinado tiempo (1 min. p. ej.) sin contar los hematíes maternos (KRISTOFFERSEN y COLS). Se comprende que el error puede ser importante, influyendo la rapidez variable con que cada uno trabaje, el espesor de la capa de sangre de la extensión, tamaño de los campos del microscopio.

Considerando, sin embargo, que el proceder es rápido y que permite conocer, con bastante aproximación, la intensidad del paso de hematíes fetales a la madre, no resulta desprovista de utilidad práctica esta técnica.

b) Recuento de los hematíes fetales que hay en una unidad de superficie, sin tener en cuenta los hematíes maternos. (FINN y COLS, WOODROW y FINN).

Estambién una técnica rápida cuyo error está en las diferencias de grosor de las extensiones.

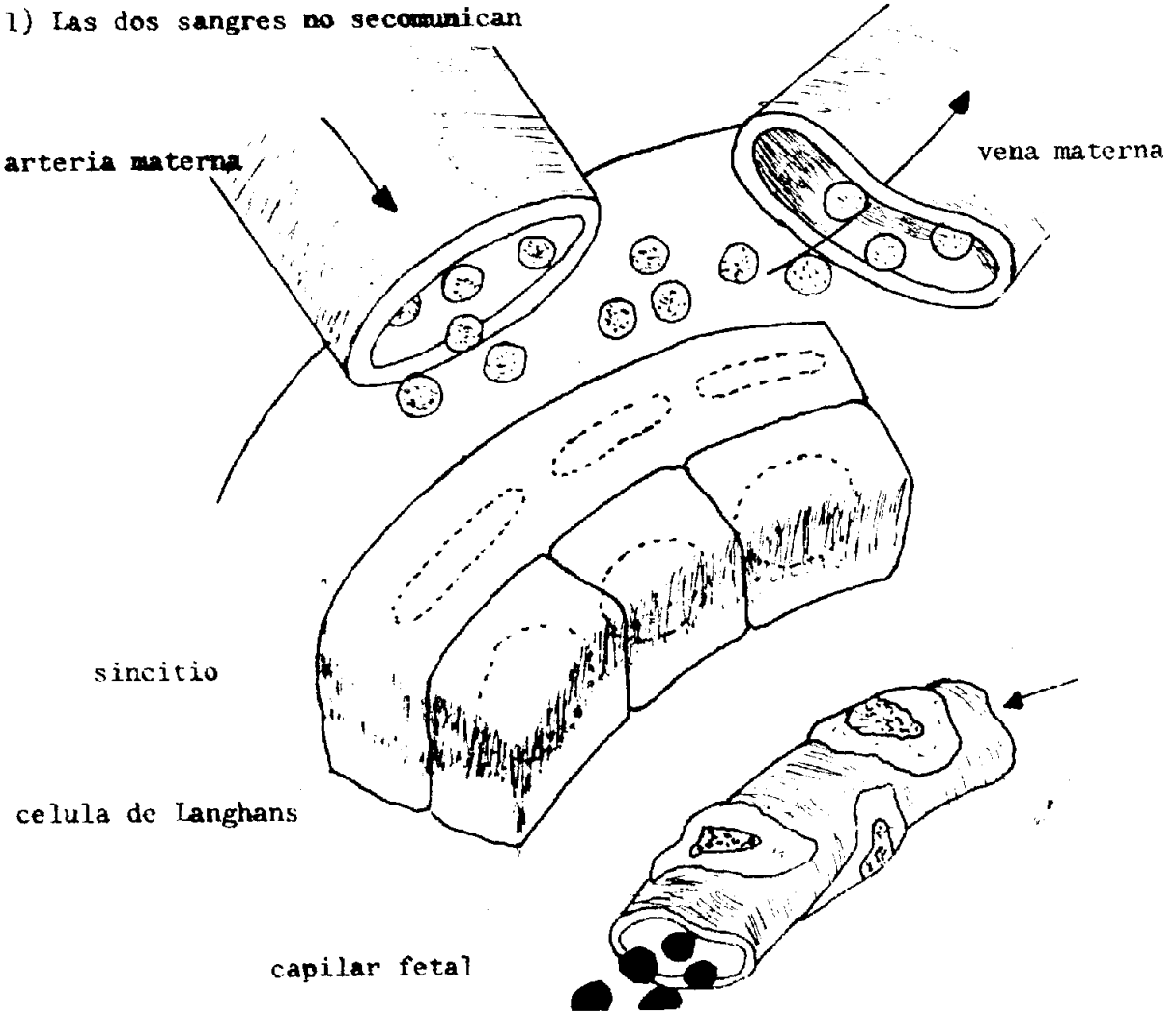
c) Recuento de los hematíes fetales en una cantidad determinada de sangre, (una gota p.ej.) haciendo una extensión con ella sobre el porta-objetos; no se cuentan los hematíes maternos (JO NES).

d) Recuento de los hematíes fetales al mismo tiempo que se cuentan células de referencia cuya concentración es conocida (RASSMUSSEN).

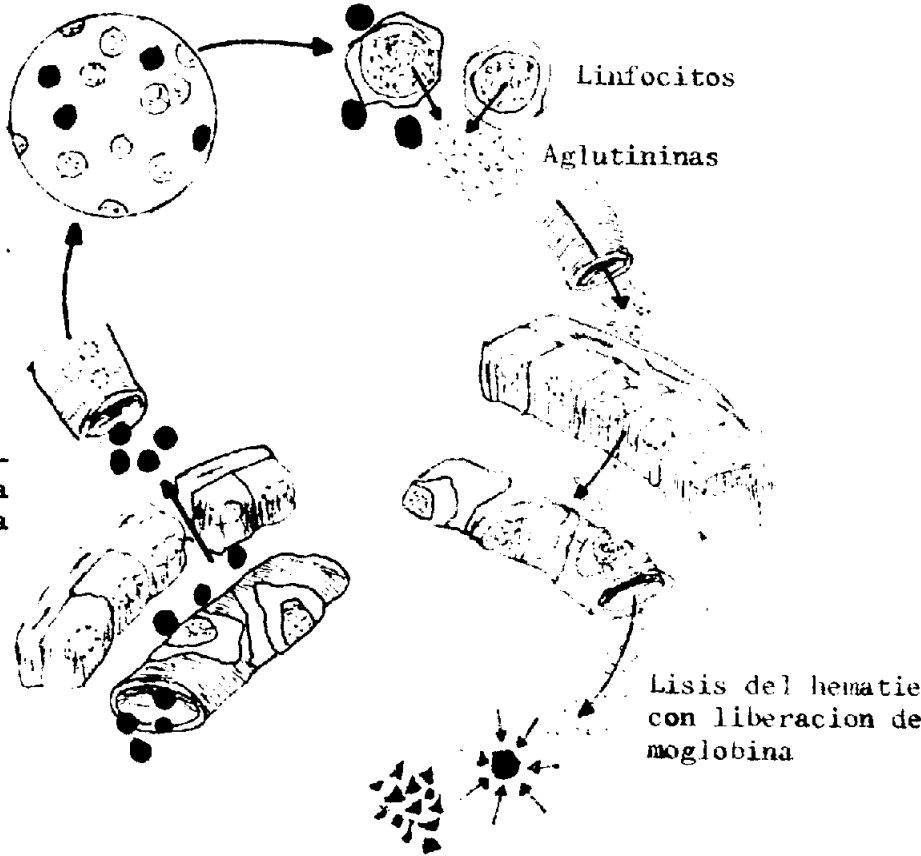
e) Contando los hematíes fetales y los maternos, estableciendo la proporción entre ellos - (GROBBELAER; SCHNEIDER y LUDWIG).

Muchos investigadores han comunicado estudios comparativos del número de hematíes fetales en la sangre materna, tanto en embarazos "normales" como en otros calificados de "anormales" (toxemia, diabétes, cardiopatía, hidramnios, etc.) y casi todos coinciden en que en los embarazos "anormales" es mayor la cantidad de hematíes fetales en los frotis de sangre materna, lo que significa que, en estos casos, la barrera placentaria no es tan perfecta. (GRAFICA-I-7)

1) Las dos sangres no se comunican



2) Paso de hematies fe-
tales a traves de la
placenta.Sensibiliza
cion



Así ZILLIACUS solamente halló hematíes fetales en 2 madres de 32 normales estudiadas mientras que, entre 59 embarazos "anormales" los ha-lló en 16 ocasiones.

La mayoría de las investigaciones al respecto han sido realizadas durante ó inmediata -mente después del parto porque durante éste es -cuando es más frecuente y marcado el paso de he-matíes fetales a la madre. Así COHEM demostró la presencia de hematíes fetales en sangre materna en la mitad de los casos que analizó después del parto. WOODROW y COLS, que estudian 200 mujeres antes y después del parto, hallaron hematíes fe-tales en 65 casos y en 40 de éstos no los había antes del parto.

KENAN y COLS^r, señalan que las lesiones en el canal del parto (desgarros cervicales ó de vagina) facilitan el paso de hematíes desde la placenta rota.

Diversos investigadores señalan que tras extracciones laboriosas con el forceps ó en pel-vianas, la proporción de pasos feto-maternos es mayor (PEAR y QUEMAN, KEENAN y PEARSE) y, en el mismo orden, WINHOEFER encuentra que hematíes fè

tales han pasado en el 1⁺ % después de partos es pontáneos y fáciles, mientras que los encontró - en el 40 % después de operaciones obstétricas . Y ZIPURSKY encuentra que la incidencia es más al ta después de cesáreas ó alumbramientos manuales en los que se abren muchos vasos maternos y se - desgarran y rompen vellosidades.

Hay, pues, evidencia, por numerosas inves tigaciones al respecto, de que el parto y el a- lumbramiento son factores que permiten, con mayor facilidad, el paso de eritrocitos fetales a la ma dr e (CLAYTON y COLS, FEAR, y KEENAN, quenan y PEARSE, SCHNEIDER y PREISLER, ZIPURSKY y COLS., etc)

Por lo que atañe a la prevención de la in munización Rh de la madre Rh negativa gestante, cuyo hijo es Rh positivo, isogrupo A B O, FREDA y COLS iniciaron el empleo de anticuerpos Rh en for ma de inmunoglobulinas G. al factor Rh, en pacien tes expuestas a la inmunización, con el fin de b bloquear los antígenos Rh que entran en el torren te circulatorio. Después de ensayos experimentales en voluntarios Rh negativo, que eran inyectados con sangre Rh positivo, pasaron a su empleo en - gestantes después del parto, llegando a la conclu

sión de que la isoinmunización Rh en gestantes p puede ser impedida de este modo. Llega a la conclusión de que la administración de anticuerpos Rh es más eficaz cuando se administra antes de - 72 horas después de la inyección experimental del antígeno y puesto que los anticuerpos aparecen - 3 - 6 meses después del parto, recomienda inyectar la gamma-globulina Anti-Rh antes de las 72 H.

LEVINE ha demostrado que cuando el niño Rh positivo es compatible, por el sistema A B O (iso grupo), con la madre Rh negativo, es cuando hay más frecuentemente isoinmunización después. Posteriormente, de modo experimental, STERN y COLS, llegaron a la misma conclusión, que parece válida.

. . . . ///

Nos ha parecido interesante conocer estas particularidades. Especialmente, puesto que la tác tica asistencial en nuestra clínica difiera un tato de la usual, conocer si ésta influía, de algún modo, en el paso de hematíes fetales a la madre - durante el parto.

. . . . ///

METODO

M E T O D O

Hemos usado la técnica de KLEIHAUER-BETKE ligeramente modificada por GROBBELACER y DUNNING; del Nuffield United of Médical Genetic, Department of Medicine, University of Liverpool.

Las muestras de sangre fueron tomadas, en estas pacientes en las 24 horas siguientes al parto, con variaciones dentro de ese tiempo.

a) Extensión de sangre.- Una gota de sangre materna se obtiene mediante una punción de un dedo. Se extiende sobre un porta-objetos previamente lavado con agua corriente. Conseguir una extensión fina, de una sola capa de hematíes es parte importante de la técnica.

Las extensiones se dejan secar al aire y se fijan en ethanol al 80 % durante cinco minutos. Se lavan con agua y se secan de nuevo pudiendo emplear una estufa a 60° durante 10 minutos.

b) Elución de la Hgb A.- Ya secan las extensiones, se colocan en una cápsula de Petri (ó un baño mayor, dependiendo del número de preparaciones) y se añade el tampón ácido a pH 3,3 durante 15 minutos, agitando la cápsula con los porta-objetos para que el lavado de las extensiones sea uniforme.

El tampón ácido se prepara a partir de dos soluciones A y B:

Solución A	Acido cítrico..... 4,2 grs
	Agua destilada.....100 cc
Solución B	Citrato sódico.....5,9 grs
	Agua destilada.....100 cc

Solución tampón a pH 3,3;

84 cc de solución A más 16 cc de solución B.

Se ajusta la solución con un calibrador de pH y una vez preparada se conserva bien en frigorífico a 7° durante un mes, aunque al final tiende a basificarse (pH 3,5 - 3,6).

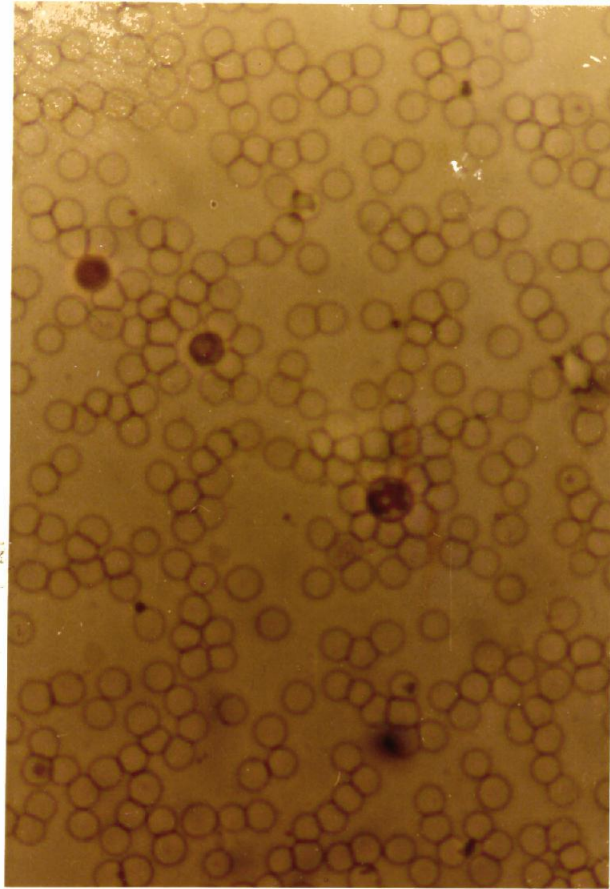
Después de los 15 minutos en el medio ácido se lavan con agua del grifo y se dejan secar, escurriendo simplemente el agua ó colocándolos entre dos papeles de filtro.

c) Tinción.- Al principio usábamos el colorante de Giemsa (MERCK), manteniendo la preparación durante 15 minutos en el colorante y lavando luego abundantemente. Pero los hematíes fetales no se coloreaban bien y se podían confundir con los monocitos. Hemos usado después la hematoxilina de HARRIS (la empleamos para el método de PAPANICOLAU) con mejor resultado. Se sumerge ahora en Eosina (solución al 1 % en agua destilada) y se deja durante 3 minutos. Se saca, se vuelve a lavar y se seca de nuevo. Las preparaciones quedan listas para ver al microscopio. El total de tiempo empleado desde la extracción hasta el final suele ser de 30 min. pero se pueden fijar y secar y eluir y teñir en periódicos diferentes, con intervalos hasta un día.

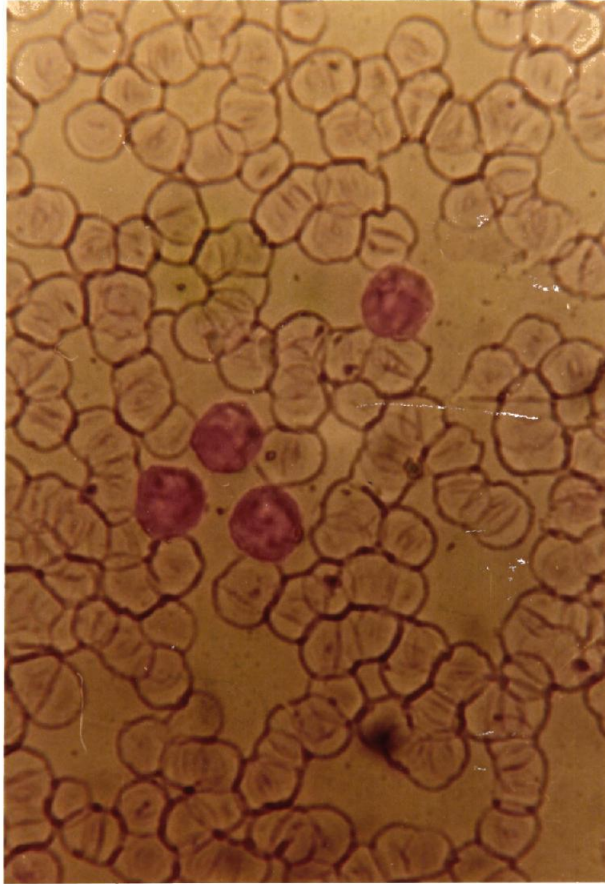
Con el lavado de los hematíes maternos en un tampón 3,3 se consigue eluir completamente la hemoglobina A, mientras los hematíes fetales permanecen inalterados debido a la mayor resistencia de la hemoglobina F al medio ácido.

Por eso los hematíes fetales, con la posterior tinción, se colorean de rosa intenso, con bordes nítidos y los hematíes maternos se quedan incoloros (fotos). Los linfocitos se distinguen por su mayor tamaño, la forma de sus núcleos y distinta coloración. Los monocitos son más pequeños y de intenso color violáceo. El mayor problema de diferenciación para algunos autores, (CLAYTON, I.966; CLARKE, I,968) han sido los reticulocitos; son del mismo tamaño que los hematíes maternos, su borde es más nítido y tienen una fina granulación que al principio nos hacía dudar, pero pronto nos acostumbramos a distinguirlos.

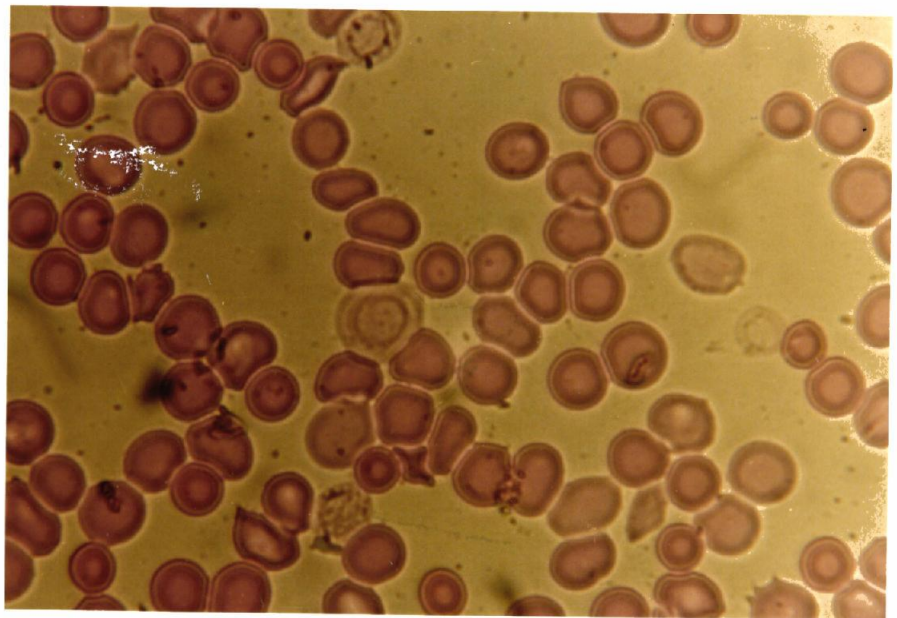
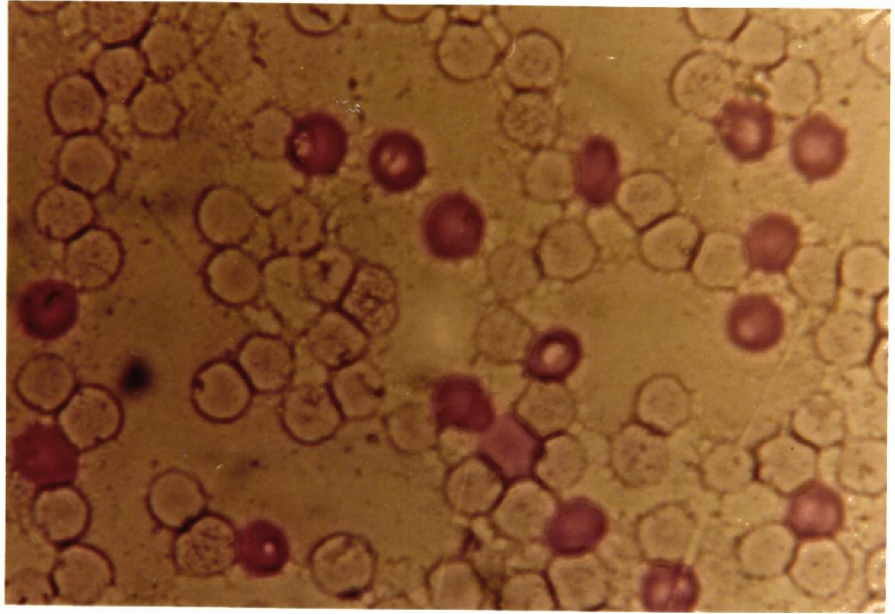
Para solventar el problema del aprendizaje hicimos varias preparaciones con hematíes fetales maternos y mezcla de ambos en diferentes proporciones.



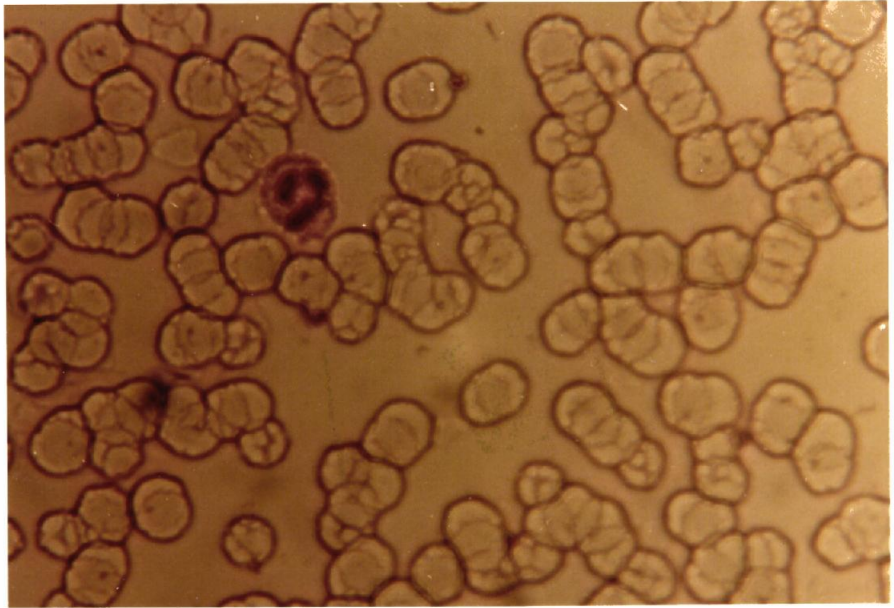
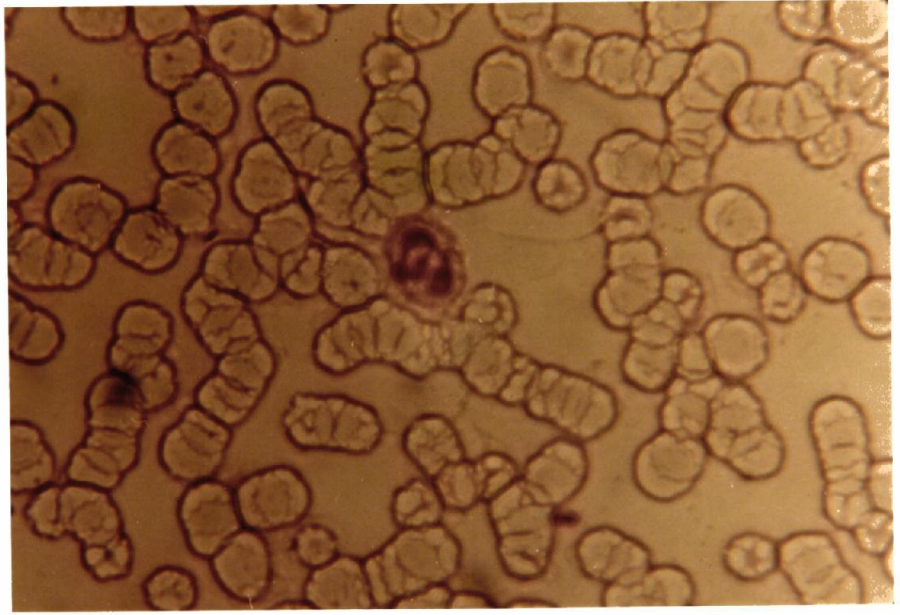
Hematies maternos, leucocitos y monocitos a
pequeño aumento



Reticulocitos en sangre materna



Hematies fetales en sangre materna a distintas concentraciones



Hematies maternos y leucocitos

d) Cálculo del volumen de hematíes fetales en sangre materna.-

El conteo lo hacemos con ocular IOx y objetivo 40x.

Es el punto más debatido de la técnica. Autores como COBBELAGE y DUNNING tienen en cuenta - la densidad de la extensión, el tamaño de la gota, el "ángulo del extendedor", la rapidez del "extendedor", el diámetro del campo del objetivo (que varía según los distintos microscopios), el volu - men sanguíneo materno, el hematocrito materno y fetal y el "foetal red cell factor" es decir, la proporción inversa de células fetales que tienen las típicas características tintoriales de la hemoglobina F, con el método de coloración usado, hacen así una fórmula:

$$X = a . b/c . d/e . f$$

X = Volumen de hemorragia fetomaterna en cc.

a = Recuento de células fetales en 50 mm² de sangre extendida.

b = Volumen de sangre materna.en cc.

c= Número de células rojas adultas en 50 mm² de sangre extendidas.

d = Hematocrito materno.

e = Hematocrito fetal.

f = Factor de células rojas fetales (Foetal red cell factor).

Este último factor se calcula considerando el número de células rojas en $0,0784 \text{ mm}^2$ con gran aumento (10 x 40) y ayuda de un ocular micrométrico, multiplicando por $50/0,0784$. Se tiene así una población adulta de $500.000/50 \text{ mm}^2$ de hematíes promedio en los casos de su ensayo.

La utilidad de la fórmula ha sido comprobada inyectando 1 cc, de sangre fetal a la madre, con lo que se obtuvo una X de 0,43 cc a 1,95 cc - con una media de 0,94 cc, una desviación estandar de 0,35 y un coeficiente de variación de 37,3 %.

Sin embargo KLEIHAUER en 1.966 sugirió que el volumen de la hemorragia transplacentaria podía ser calculado haciendo un porcentaje de células rojas fetales a adultas expresadas en un porcentaje x 50.

Los resultados así obtenidos son casi idénticos a los calculados con la complicada fórmula de los autores anteriores. Los volúmenes oscilan de 0,43 cc a 1,68 cc con una media de 0,91 cc, una desviación estandar de 0,34 cc y un coeficiente de variación de 37,9 %.

Si se conviene pues, en utilizar el recuento de 50mm^2 de extensión sanguínea para las celu las fetales y si se acepta que el total de células adultas en 50mm^2 es de 500,000, el volúmen de he morragia transplacentaria se calculará dividiendo el número de células fetales por cien.

Esta fórmula tiene la ventaja de su senci llez, Debe de señalarse que los errores aparentes obtenidos con la fórmula de KLEIHAUER no son necesariamente, defecto de la misma, sino que pue den ser debidos al error del recuento de las célu las rojas fetales ó a la estimación de la colora ción de las células rojas adultas.

CLAYTON y COLS (I.963, I,966); DEVI y COLS (I.968); POCHEDLY y GERALD (I.969); JONES (I.969) y VALENSI (I.971), consideran que una célula fetal en 10.000 células maternas con óptica de 40x equivale a 0,5 cc., de sangre.

ARGUDO (I.969) realiza contaje durante 10 minutos, Si encuentra 5 hematíes fetales dice que representan 0,2 cc., de sangre fetal.

ANDREW y COLS, hacen el cálculo de hemorragia a partir del número de leucocitos / mm³.
MONTAGNE y COLS (I.963) aplican la fórmula siguiente:

$$\text{Vol. sangre fet} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de leucocitos/mm}^3 \text{ en la mujer}}{\text{n}^{\circ} \text{ de leucocitos/hem. fetal}}$$

ZIPURSKY (I.963) da como positivo un caso si encuentra un hematíe fetal.

FINN y COLS, en cambio, excluyen aquellos casos en los que sólo hay un hematíe fetal.

SCHNEIDER y LUDWING (I.963) hacen el recuento con un ocular especial que parece permitir una medición bastante exacta de la hemorragia feto placentaria.

Nosotros empleamos la fórmula original de KLEIHAUER, pero en vez de contar 50mm², lo hacemos sobre 50 campos en objetivo de 40x. La fórmula queda reducida a:

$$X = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ Hem. fetales}}{\text{n}^{\circ} \quad 8}$$

. . . . //

MATERIAL

M A T E R I A L

Hemos estudiado la sangre de 489 madres que dieron a luz en la Maternidad de la Macarena de la Facultad de Medicina de Sevilla entre los años - I.969 y I.971. No se hizo selección alguna de los casos, en lo que respecta al embarazo y parto; pero si se limita al estudio a las pacientes Rh negativo con hijo Rh positivo.

a) La paridad se detalla en la Tabla I

TABLA I

<u>Paridad</u>	<u>Número</u>
I para	179
II para	100
III para	84
IV para	36
V para	32
VI para	17
VII para	8
VIII para	12
IX para ó más	8
no consta	13
TOTAL	489

Corresponde a la paridad usual de la Clínica; hay mayor número de Iparas y IIparas. En las múltiparas no se había detectado isoimmunización al factor Rh.

b) Tipo de parto.-

En la Tabla (II) se detalla el tipo de parto y el porcentaje:

Tabla II

<u>Tipo de parto</u>	<u>nº</u>	<u>%</u>
Espontáneos	28	5,1
E. A. E.	164	34,1
E, V. A.	231	47,5
E.A. pelviana	26	5,3
E.A. aplicación de forceps..	6	1,2
Cesárea	34	6,8

La sigla E primera, la empleamos para designar la estimulación con 10 U. de occitocina en 500 cc de suero fisiológico. La sigla A quiere decir analgesia con pentotal (2 grs. en 500cc - de suero fisiológico) en goteo continuo.

La segunda sigla E se emplea cuando la expulsión fetal es espontánea; la V indica que se extrajo mediante ventosa. Esta tabla es, también, reflejo del criterio obstétrico de la Clínica. El mayor porcentaje corresponde a las E,V.A. con el 47,5 %.

c) Alumbramiento.- Tabla (III)

TABLA III

<u>Tipo de alumbramiento</u>	<u>nº</u>	<u>%</u>
expresión	443 ...	90
manual	44 ...	8,99
crede	2 ...	

Hay un 90 % de alumbramientos mediante expresión simple de la placenta. En el 8,99 % se hizo alumbramiento manual (por retención placentaria, por revisión de cavidad). En la Clínica se emplea sistemáticamente el goteo continuo de occitocina, a ritmo rápido, después del nacimiento del feto.

.... ///

RESULTADOS

R E S U L T A D O S

A) El paso de hematies fetales a la madre según el tipo de parto.-

Tabla IV

TIPO DE PARTO	POSITIVO		NEGATIVO		SIN recuento	TOTAL
	nº casos	%	nº casos	%		
P. espontáneo	6	21	20	71,4	2	28
E.A.E.	48	29,26	115	70,1	1	164
E.V.A.	83	35,93	148	64	-	231
Extr. forceps	5	83,33	1	16,6	-	6
Extr. pelviana	16	61,53	10	38,4	-	26
Cesárea	15	44,11	17	50	2	34
<u>Total</u>	173	35,37	311	63,5	5	489
Alumbr. manual	30	68,18	14	31,81	-	44

1º) Según puede observarse, por los resultados anteriores, es elevada la proporción de partos en los que pasan hematíes fetales a la circulación materna. Curiosamente en un porcentaje semejante al nuestro (35,37%) encuentran también CABALLERO y COLS (35,07%). En la literatura, que recoge CABALLERO, hay muchas variaciones al respecto, desde 11,7% (FINN y COLS) hasta 71,1% (KLEIHUER y COLS), siendo el promedio en la revisión - que hace CABALLERO y COLS, de 38,2% entre 19.371 casos recopilados de 44 publicaciones. Parece que puede aceptarse que aproximadamente en 1/3 de todos los partos, globalmente analizada, hay paso de hematíes, del feto a la madre, en mayor ó menor proporción.

2º) No hay datos, en la literatura, de si el paso de hematíes fetales es más frecuente ó no cuando se emplea estimulación de la dinámica del parto con perfusión de occitocina. En nuestro estudio fue ligeramente superior la proporción - (29,26%) que cuando el parto transcurrió de modo totalmente espontáneo (21%).

La diferencia, sin embargo, no es lo suficientemente significativa para atribuirle valor importante.

Ligeramente superior es también la proporción de casos con paso de hematíes cuando, a la estimulación de la dinámica, se asocia la extracción con ventosa.

3º Es, en cambio, muy importante la frecuencia del paso de hematíes cuando el feto es extraído mediante forceps. (83,33%) de positividades, ó extracción pelviana (61,53%). El corto número de casos analizados de este tipo quita mucho valor a estos casos de resultados que, sin embargo, muy elevados.

Es reconocido, en la literatura (BEER; DUDMEAN y COLS) que el paso de hematíes fetales a la madre es más frecuente en los partos "patológicos" que en el "parto normal"; pero el límite entre estos conceptos es tan difuso que no permite hacer distinción clara entre ellos.

Parece que tanto la extracción cefálica con forceps como la pelviana han ido acompañadas, en

las investigaciones relatadas en la literatura, de una mayor frecuencia de paso de hematíes fetales a la madre (FINN y COLS, ZIPURSKY y COLS, etc)

Estos hechos parecen indicar, a nuestro modo de ver, cierta proporción entre la frecuencia y amplitud de la efreción del canal del parto y la frecuencia del paso de hematíes fetales al la madre. Es decir, es menos frecuente en el parto espontáneo (estimulado ó no), un poco más frecuente cuando se hace extracción con la ventosa, bastante más cuando la extracción se hace por los pies ó con el forceps.

Todo esto hace pensar que los hematíes fetales no sólo pasan a la madre a través de la placenta sino preferentemente, durante el alumbramiento a través de vasos abiertos en heridas del canal del parto. Si no fuera así no habria razón alguna para que el paso fuera más frecuente en las extracciones pelvianas ó con el forceps, que para nada actuan sobre la placenta.

4º) Fue también importante la frecuencia del paso de hematíes fetales en las cesáreas (44, II%), como ha sido observado también por la mayoría de los que han estudiado este problema (ver CABALLERO).

Era de esperar que así sucediera por que las circunstancias son las más favorables (herida uterina con importante vasos abiertos, posible lesión directa placentaria en la incisión, alumbramiento manual etc.etc.).

5º) También, en concordancia con lo observado por todos, es muy frecuente el paso de hematíes fetales en el alumbramiento manual. Casi siempre van precedidos de intento de desprendimiento por maniobras externas (maneoabre de CREDE) que desgarran la placenta, dando salida a hematíes fetales, al tiempo que se abren los vasos placentarios maternos, etc.

B) La cuantía del paso de hematíes del feto a la madre.-

Hemos analizado, en el apartado anterior, - tan solo las positividades ó negatividades del pa so de hematíes fetales a la madre, considerando - como positivos a todos los casos en que se encue tre algún hematíe fetal en la sangre materna.

Interésa considerablemente, sin embargo, - comocer la cuantía de este paso, para lo cual he mos hecho el cálculo de la cantidad de sangre fe tal que pasó a la madre con la técnica expuesta.

El valor de este recuento reside:

a) Es aceptado que cuando la cantidad de sangre que ha pasado a la madre es inferior a 0,5 cc., esta cantidad es insuficiente para inmunizar a la madre, en caso de incompatibilidad Rh feto - materna (LEVINE, WIERNER, ZIPURSKY, etc.etc.).

b) Interesa conocer la frecuencia con que pasan a la madre cantidades de sangre fetal que puedan inducir una isoimmunización al factor Rh y saber que circunstancias obstétricas favorecen este paso.

c) Al emplear inmunoglobina anti-Rh, como profilaxis de la inmunización, la cantidad necesaria que debe inyectarse habrá de ser proporcional a la cantidad de sangre que pasó a la madre. Y cuando la cantidad de sangre fetal es inferior a 0,5 cc., no sería necesario emplear vacunación anti- D.

En la Tabla^V detallamos las cantidades de sangre fetal que pasan a la madre según el tipo de parto.

SIN contar

TABLA V

Casos estudiados

cantidad fetal transfundida en c.c.

Tipo de parto	nº	0-0,4		0,5-0,9		1-1,9		2-2,9		3-3,9		4-4,9		5-5,9		6-7	
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
28 P. espontaneos	2	3	10,5	-	-	3	10,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
164 E.A.E.	-	14	8,5	17	10,5	13	7,9	3	0,1	1	0,6	-	-	-	-	-	-
231 E.V.A.	-	30	12,7	24	10,3	20	8,6	5	0,2	1	0,04	1	0,04	-	-	1	0,0
6 Forceps	-	-	-	2	33,3	2	33,3	-	-	1	16	-	-	-	-	-	-
26 Ex. pelvianas	-	2	7,6	2	7,6	5	19	4	15	-	-	1	3,8	1	3,8	1	3,
34 cesareas	2	5	14,7	3	8	6	17	1	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-
44 al. manuales	-	7	15,9	3	6	12	27,7	3	6	3	6	1		±		1	
489 casos	4	61	12,4	51	10,4	61	12,4	16	3,2	6	3,2	3	0,6	1	0,2	3	0,6

Analizando globalmente estos resultados se observa que de todos los casos positivos en el - (35,37%) una proporción del 12,47% la cantidad de sangre transfundida a la madre era escasa e insuficiente para inmunizarla. Pero aún quedan 22,9% de casos en que la cantidad de sangre que pasó - del feto a la madre era suficiente, teóricamente al menos, para inmunizarla.

La cantidad de sangre que pasó a la madre era un poco superior que en el parto espontáneo, en el parto E.A.E. y muy semejante a este en el parto E.V.A. . Y era, sobre todo, mucho mayor en las extracciones con forceps, extracciones pelvianas, cesáreas y alumbramientos manuales (ver tablas siguiente).

Cantidades superiores a 2 cc., pasaron, en proporción bastante alta, en aplicaciones de forceps y extracciones pelvianas; más que en cesáreas y en alumbramientos manuales. Y pasos de más de 5 cc., se detectaron en dos partos E.V.A., en 2 extracciones con forceps y en el alumbramiento manual debiendo tenerse en cuenta que hubo 231 par

TABLA VI

Parto espontaneo y c.c. de hematios fetales

<u>C.C.</u>	<u>np</u>
0,0	20
0,1-0,4	3
1 -1,9	3

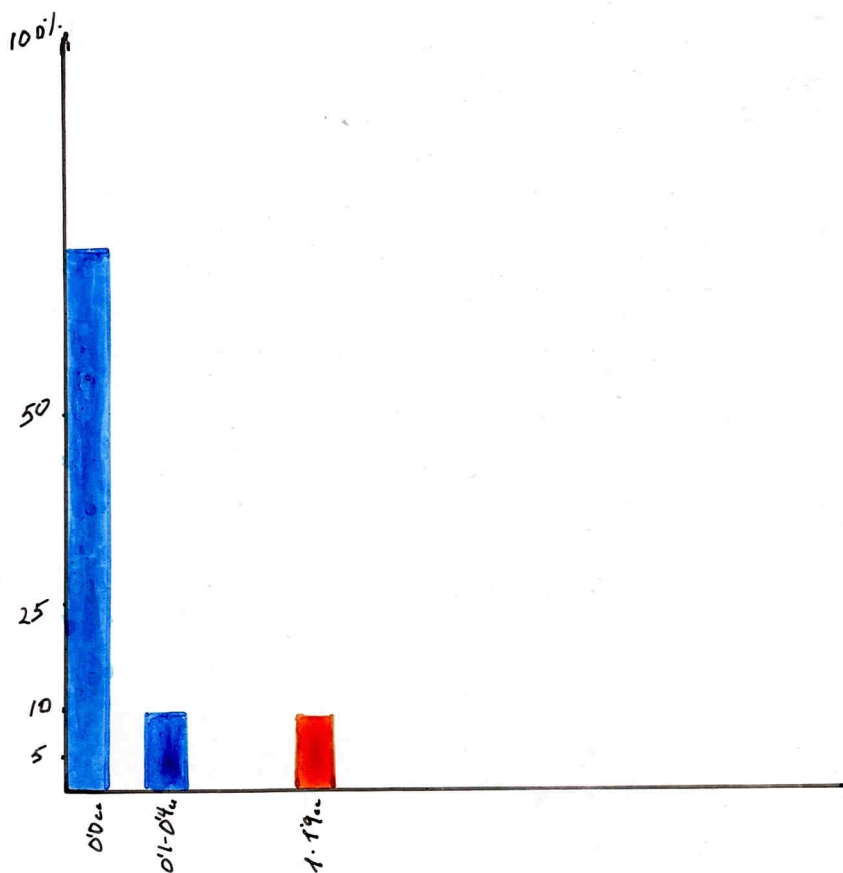


TABLA VII

Parto E.A.E. y c.c. de hematies fetales

<u>C.C.</u>	<u>nº</u>
0,0	115
0,1-0,4	14
0,5-0,9	17
1- 1,9	13
2 -2,9	3
3 -3,9	1

E.A.E.

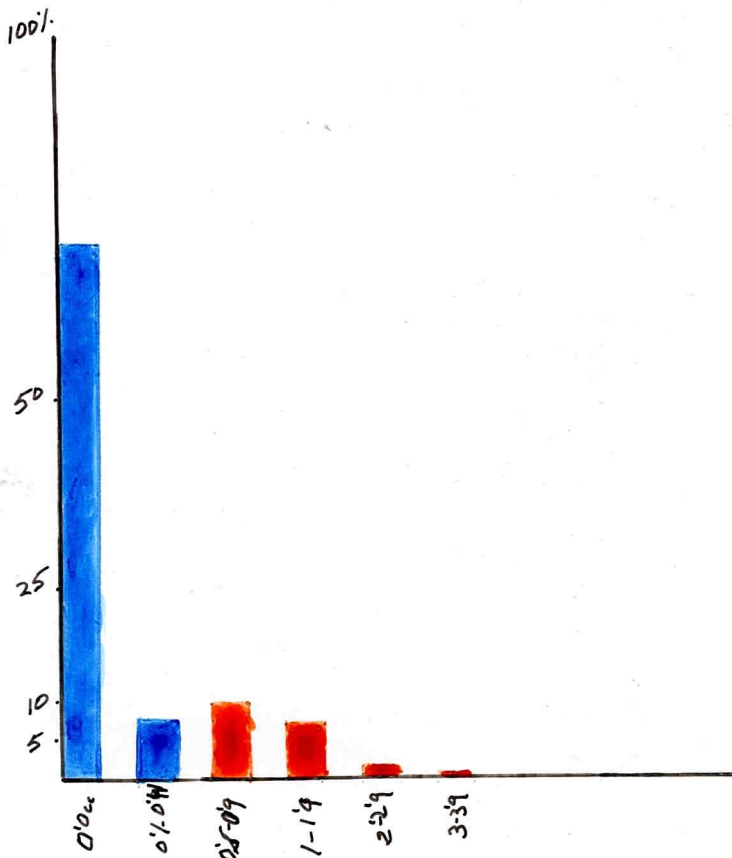


TABLA VIII

Parto E.V.A. y c.c. de hemabios fetales

C.C.	nº
0,0	148
0,1-0,4	30
0,5-0,9	24
1 -1,9	20
2 -2,9	5
3 -3,9	1
4 -4,9	1
5 -5,9	-
6	1
7	1

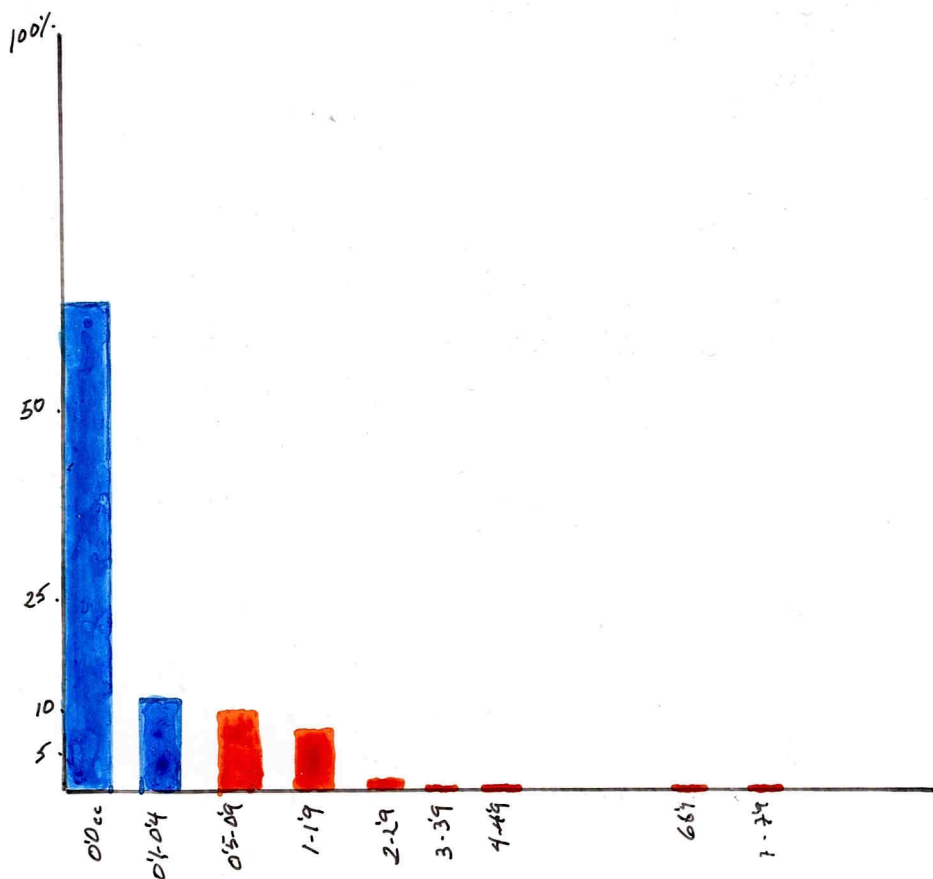


TABLA 18

Parto extr. con forceps y c.c. de hematies fetales

<u>C.C.</u>	<u>nº</u>
0,0	1
0,5-0,9	2
1 -1,9	2
3 -3,9	1

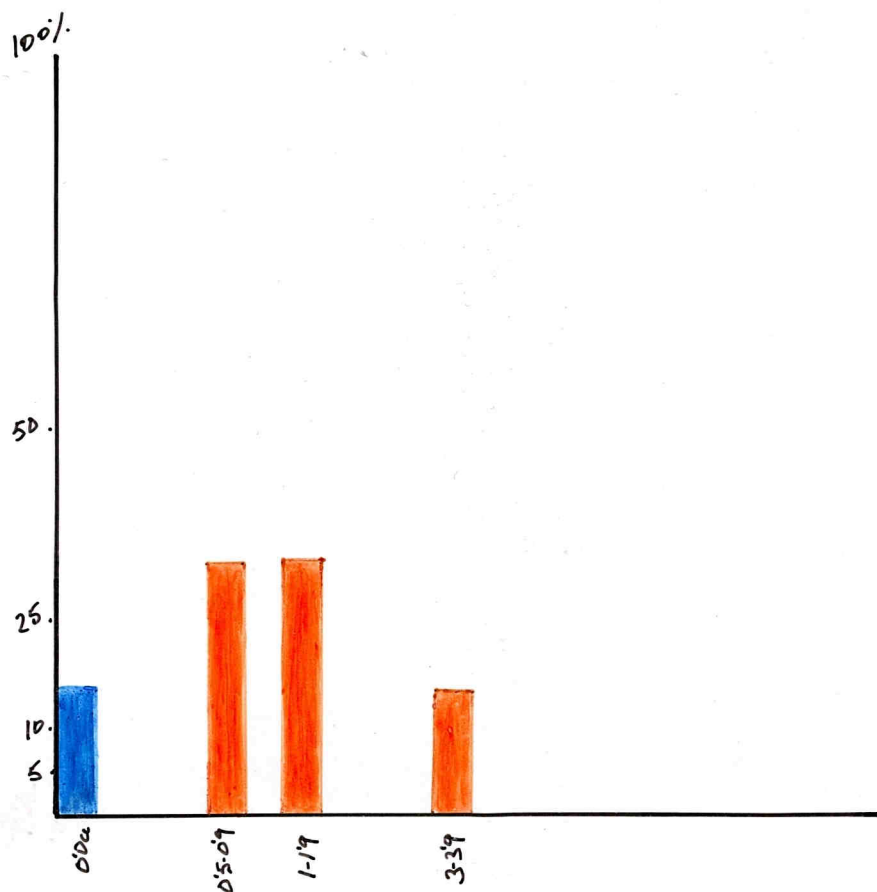


TABLA 8

Parto extr.pelviana y c.c. de hematies fetales

C.C.	nº
0,0	10
0,1-0,4	2
0,5-0,9	2
1 -1,9	5
2 -2,9	4
4 -4,9	1
5 -5,9	1
6 -6,9	1

P

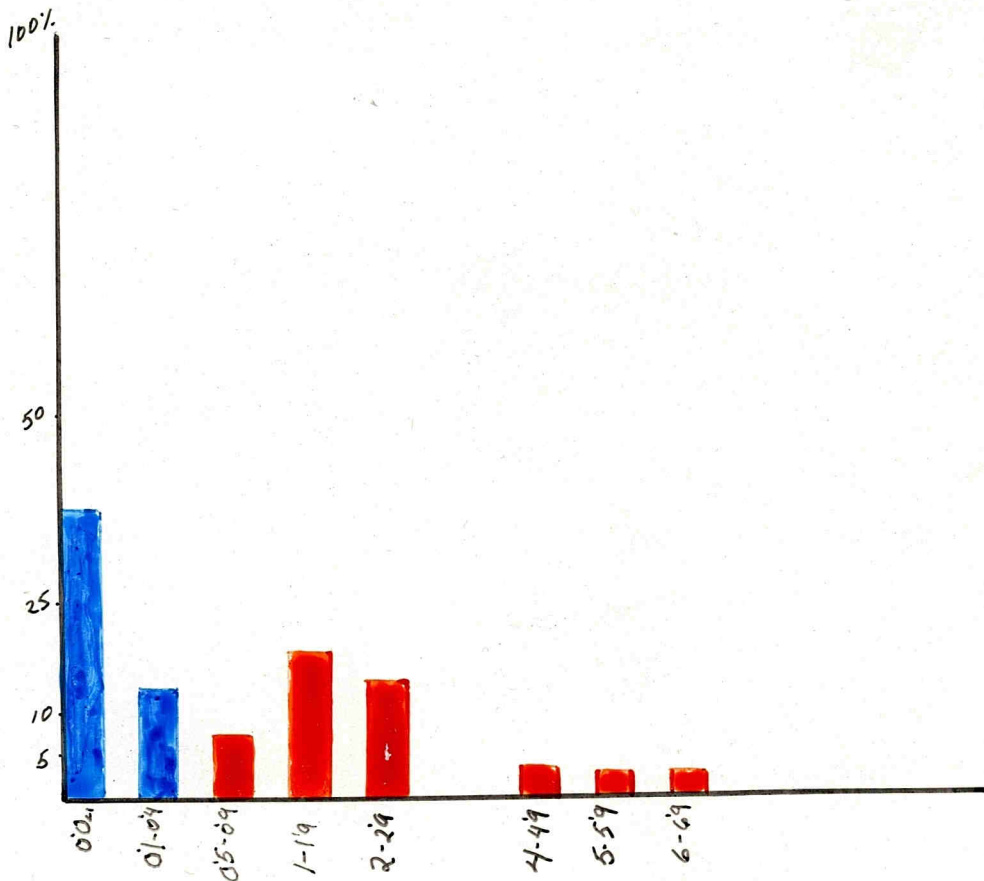


TABLA XI

Cesareas y c.c. de hematies fetales

C.C.	nº
0,0	17
0,1-0,4	5
0,5-0,9	3
1 -1,9	6
2 -2,9	1

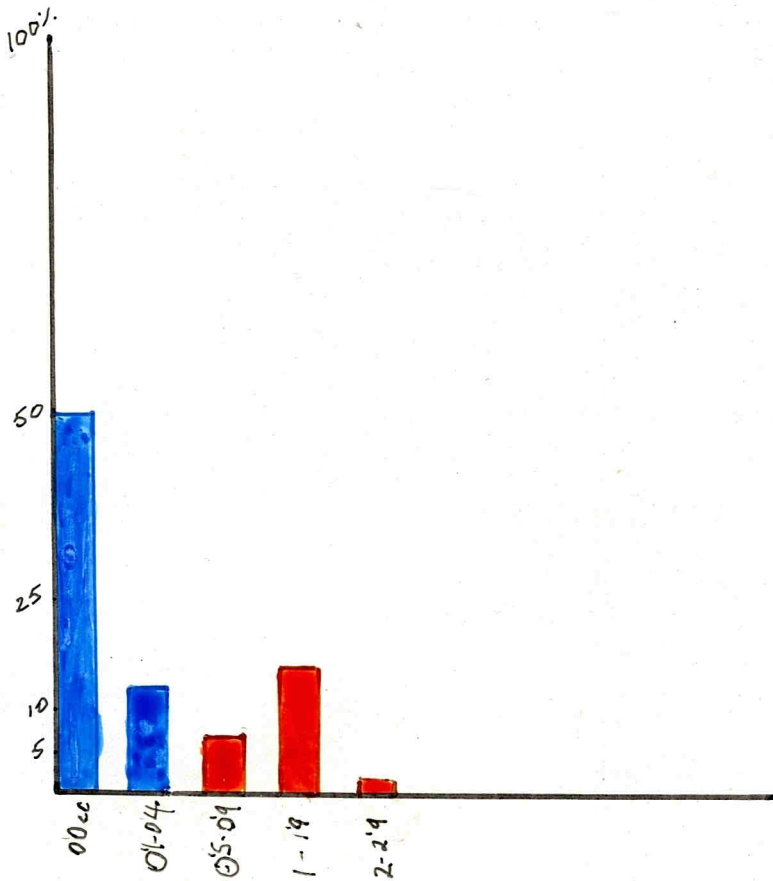
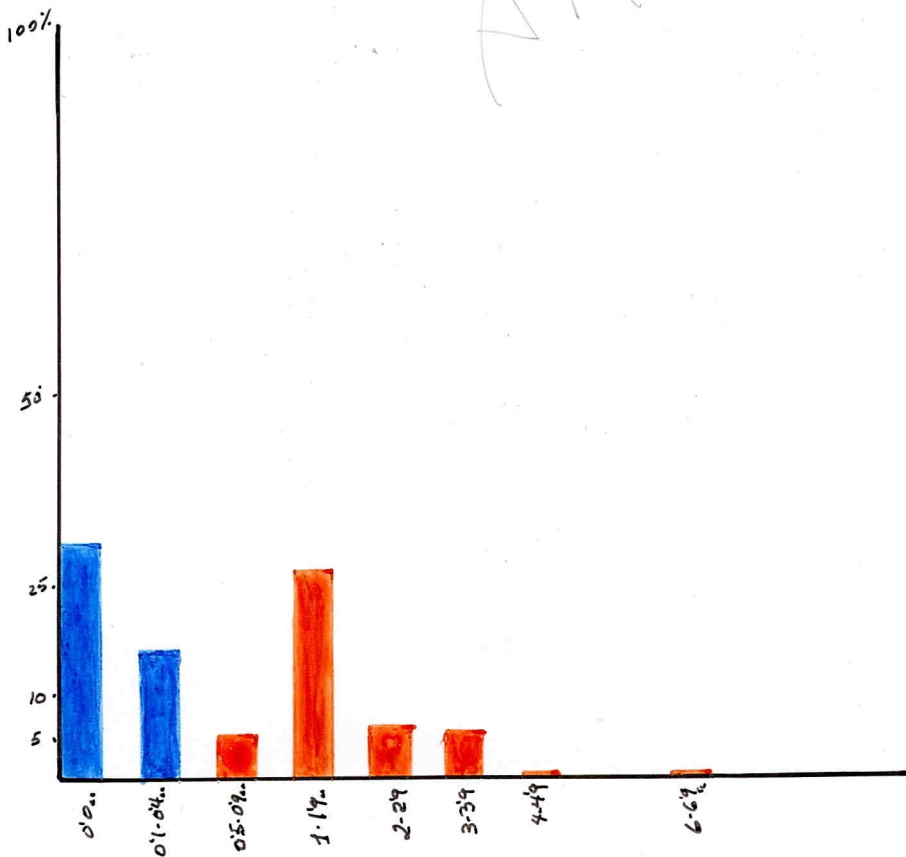


TABLA XII

Alumbramiento manual y c.c. de hematies fetales

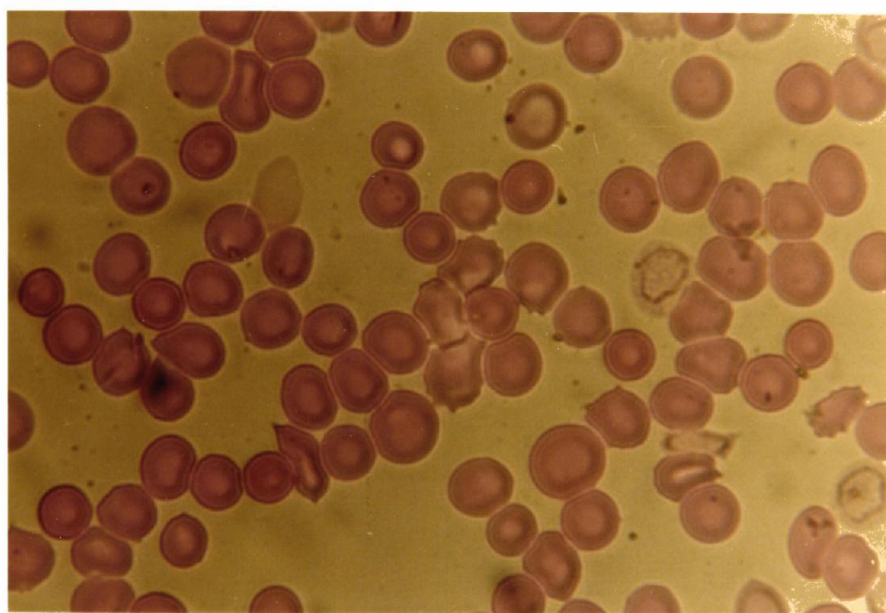
C.C.	nº
0,0	14
0,1-0,4	7
0,5-0,9	3
1 -1,9	12
2 -2,9	3
3 -3,9	3
4 -4,9	1
6	1



E.V.A. y solamente 6 extracciones con forceps. La extracción con forceps, fue , sin duda, en nuestros casos, la maniobra más peligrosa al respecto. El escaso número de casos quita alguna importancia, sin embargo, al hallazgo.

Además de estos casos estudiados, se detectó una hemorragia feto-materna de tal cuantía, que costó la vida al niño; no había incompatibilidad Rh y no figura, por eso, en este estudio.

.....///.....



EL GRUPO SANGUINEO DE MADRES Y NIÑOS CON RESPECTO AL SISTEMA ABO.-

En el estudio de nuestros casos se seleccionaron preferentemente aquellos en que la madre y el feto eran ABO compatibles, siendo receptora - la madre de los hematíes fetales. Excepto un pequeño grupo en que la investigación fue hecha por - otra causa. Se trataba, pues, de circunstancias - en que, teóricamente, podría darse la isoimmunización con más facilidades.

El grupo de las madres (siempre Rh -) y - el de los niños (siempre Rh ±) los detallamos en la Tabla: XIII

TABLA XIII

Grupo sanguíneo, sistema ABO

	<u>madres</u>	<u>hijos</u>
Grupo O	133	133
Grupo A	171	171
Grupo B	38	38
Grupo AB		
(recep. universal)	32	sin interés
Grupo O	sin interés	97
(dador universal)		

Grupos incompatibles = 97

EL EMPLEO DE GAMMA GLOBULINA ANTI-RH Y RESULTADOS

Hemos empleado inmunoglobulina anti-Rh en las madres antes de las 72 horas del parto en las siguientes circunstancias:

a) Madre Rh negativo, de hijo Rh positivo, no inmunizada por otros embarazos ó transfusiones.

b) Transfusiones fetomaternas en cantidad superior a 0,5%.

c) Madre y feto isogrupo ó de grupo compatible según el sistema ABO de tal modo que los hematíes fetales no fueran aglutinados por la madre.

En las demás ocasiones no se empleó la vacuna anti-D.

En total hubo necesidad, con este criterio restrictivo, de emplear la terapéutica profiláctica en 85 casos (16%). La cantidad administrada fue proporcionada a la cuantía del paso de hematíes.

cuando era superior a 0,5 cc., pero inferior a 2 cc., se empleó un vial (250 U.); cuando era superior a 2 cc., e inferior a 4 cc., se utilizó 2 viales; y en su caso hubo que emplear 3 porque habian pasado 5 cc., de sangre fetal.

RESULTADOS DE LA PROFILAXIS.-

No resulta fácil conocer si la conducta se guida por nosotros ha sido o no correcta. Las ra zones principales son: porque no todas las mujeres han vuelto a tener nuevos embarazos, de fetos Rh positivos además. Y no todas las que tienen nuevos embarazos han vuelto a dar a luz en las Clínicas revisadas por nosotros (Maternidad de la Facultad de Medicina, de la Seguridad Social y de la Diputación Provincial).

Tres años después del estudio, habían vuel to a dar a luz en las Clínicas mencionadas 121 pa cientes (23%). Es esto, sin embargo, una proporción bastante importante.

De estas 121 embarazadas de nuevo, habían recibido la inmunoglobulina con seguridad 25; a 4 más se les indicó la necesidad de su empleo y que

daron conformes en hacerlo en su domicilio; en to tal, probablemente, 29 casos habían recibido la dosis profiláctica (En 2 se emplearon 2 viales).

Entre éstas había 5 que estaban sensibili zadas, cuyos datos detallamos:

a) 2 pacientes estaban ya sensibilizadas antes del estudio. No recibieron profilaxis por este motivo. En el embarazo estudiado no había pa sado hematíes. En el nuevo embarazo se murieron los niños.

b) I paciente (IIIpara) no recibió profila xis porque no se detectaron hematíes fetales. En el nuevo embarazo, el test de COOMBS era positivo al 1/32 al final del embarazo. Sin embargo, el ni ño (Rh positivo) no tuvo siquiera ictericia y la bilirrubina fue siempre baja.

c) I paciente (Ipara) tampoco recibió dosis anti-Rh porque no se detectaron hematíes fetales. En el 2º embarazo el test de COOMBS fue positivo a 1/128. A pesar de ello el niño nació sano y no necesitó tratamiento alguno.

d) I paciente (IVpara) , a la que se inyac
tó I vial de anti-D porque habían pasado I,I ml.
de sangre fetal. En el 5º embarazo el título de
aglutininas fue muy elevado (I/5I2) . A pesar de
ello el niño nació sano , no tuvo ictericia y vi
vió sintratamiento especial.

De éstas 5 pacientes , por lo tanto, dos
estaban ya sensibilizadas. En las restantes las
pruebas de laboratorio indicaban que habían sensi
bilización al factor Rh, pero sus nuevos hijos ,
por supuesto también Rh positivo, no tenían indi
cios consecuentes a la isoinmunización ; es posi
ble que se tratara de errores de laboratorio por-
que la Clínica después no confirmó esta circuns~~t~~
tancia.

..... ///

CONCLUSIONS

C O N C L U S I O N E S

1º) Durante el parto, en cifras generales, pasan pequeñas cantidades de sangre desde el feto a la madre, en cuantía suficiente para inducir una isoimmunización, en más del 20% de los partos.

2º) La frecuencia y la cuantía del paso de hematíes fetales es considerablemente mayor en los partos en que se hizo extracción pelviana ó con forceps. Ello hace pensar que el paso a través de heridas del canal del parto es un factor importante porque las circunstancias placentarias son análogas en estos partos y en los partos espontáneos.

3º) En las cesáreas es también importante la frecuencia y la cuantía de las microtransfusiones feto-maternas. Esto resulta muy comprensible -

porque en la incisión uterina se abren vasos importantes a través de los cuáles pueden pasar hematíes fetales; más aún si la incisión se hace sobre la placenta.

4a) También el alumbramiento manual es un factor favorecedor del paso feto-materno de los hematíes.

5a) Mediante la investigación de los hematíes fetales en la sangre materna después del parto, puede conocerse si ha pasado sangre fetal a la madre. De este modo, cuando hay riesgo de que la madre se inmunice frente al factor Rh y, en consecuencia, se pueden seleccionar los casos tributarios de profilaxis con globulina anti-Rh. El elevado precio de ésta y la dificultad de su obtención hace que la selección de los casos sea importante desde el punto de vista económico y asistencial.

6a) Mediante el recuento de los hematíes fetales se puede conocer la cantidad de sangre fetal que pasó a la madre. Cuando el feto es Rh posi

tivo y la madre Rh negativo, este recuento permite no emplear la profiláxis de la isoimmunización si el paso de sangre ha sido mínimo ó emplear una cantidad mayor de globulina anti-Rh cuando la cantidad de sangre pasada a la madre fue mayor.

7º) Habiendo empleado la globulina anti-Rh con estos criterios restrictivos, en un número de pacientes que dieron después, de nuevo, a luz, no se observó que sus hijos estuvieran afectados. Ello significa que la investigación del paso de hematíes y su recuento permite ahorrar la gran cantidad de globulina anti-Rh que se necesitaría si se utilizará, de modo indiscriminado, cada vez que una madre Rh negativo diera a luz un feto Rh positivo.

....///....

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ARGUDO, A. - Conducta ante la isoimmunización materno-fetal. Rev. Esp. Obst. Gine., 168 : 526, 1969.

BABINI, B. - Studio sul passaggio di emazie fetali nel circolo materno evanti e durante el parto col metodo della denaturazione acida su sticcio. Clin. Peditr., 42 : 1047, 1966.

BEAVEN, G. H., ELLIS, M. J. e WHITE, J. C. - Studies on human foetal haemoglobin. II-Foetal haemoglobin levels in healthy children and adults and certain haematologic disorders. Brit. J. Haemat., 6 : 201, 1960.

BEER, A. E. - Fetal erythrocytes in maternal circulation of 155 Rh-negative woman. Obstet. Gynec., 34 : 143, 1969.

BENGSTON, H., NILSSON, L. A., NILSSON, L. e RYTTINGER, L. - Demonstration of Rh antigen in a 38-days old fetus. Amer. J. Obstet. Gynec., 99 : 130, 1967.

BETKE, K. e KLEIHAUER, E. - Fetaler und bleibender Blutfarbstoff in Erythrozyten und Erythroblasten von menschlichen Feten und Neugeborenen. Blut., 4 : 241, 1958.

BETKE, K. e GRUNACHER, I. - Hitzedenaturierung und hitzeokoagulation vei-feltoben und blikenden Hamaglobin des lue Feten und Neugeboneuen. Blut., 4 : 241, 1958.

BETKE, K. - Transplacental Passage of Erythrocytes. Bibl. Haemat., 29, Part I : 257 - 264, 1968.

BICKENBACH, W. e KIVEL, F. - Mikrosopeschec Untersuchanger an Erythroblautase Planeenten. Arch. Gynec., pag. 177-559, 1950.

BILLINGHAM, R. E. - Transplantation immunity and the maternal-foetal relation. New Eng. J. Med., 270 : 667 e 720, 1964.

BOWMAN, J. M. e CHOWN, B. - Prevention of Rh Immunization after massive Rh-positive transfusion. The Canad. Med. Ass. J., 99 : 385, 1968.

BRODY, S. e NILSSON, B. - Foetal and adult haemoglobin mass in relation to foetal development. J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp., 67 : 827, 1960.

BRODY, S. - Further studies on the rehability of a new method for determination of the duration of pregnancy. J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp., 67 : 819, 1960.

BROWN, E. S. - Foetal erythrocytes in the maternal circulation. Brit. Med. J., 1 : 1000, 1963.

CABALLERO, A. - Profilaxis de la Enfermedad Hemolftica Perinatal. Acta Med. Tenerife., 30 : 4, 1969.

CABALLERO, A. e AGUSTIN, P. - Enfermedad Hemolftica Perinatal. Arch. Fac. Med., 17 : 173, 1970.

CABALLERO, A., ORTIZ, M. e AGUSTIN, P. - Transfusión Feto-Materna durante la gestación o el parto. Toko Ginec. Pract., 30 : 290, 1971.

CABALLERO, A., CARAZO, A., ORTIZ, M. e AGUSTIN, P. -
Transfusión Feto-Materna durante la gestación o el parto.
Hosp. General., 12 :4 - 351, 1972.

CASSADY, G., CAILLITEAU, J., DUDLEY, L. e MILSTEAD, R. -
The hazard of fetal-maternal transfusion after transabdominal
amniocentesis. Amer. J. Obstet. Gynec., 99 : 284, 1967.

CHERNOFF, A. I. - Immunologic studies of hemoglobin
quantitative precipiten test using anti-fetal haemoglobin
sera. Blood., 6 : 413, 1953.

CHISTENSEN, J. - Serological conditions and occurrence
in normal adults and normal pregnant and post partum woman
with particular reference to foeto-maternal haemorrhage.
Danish Med. Bull. 15 : 160 - 192, 1968.

CHOWN, B. - Anemia from bleeding of the foetus into
the mother's circulation. Lancet, 1 : 1213, 1954.

CLARKE, C. A., DONOHUE, W. T. A., McCONNELL, R. B.,
WOODROW, J. C., FINN, R., KREVANS, J. R., KULKE, W.,
LEHANE, D. e SHEPPARD, P. M. - Further experimental studies
on the prevention of Rh haemolytic disease. Brit. Med.
J., 1 : 979, 1963.

CLARKE, C. A. - Prevention of Rh-hemolytic disease.
Results of the clinical trial. A combined study from centers
in England and Baltimore. Brit. Med. J., 1 : 907, 1966.

CLARKE, C. A. - Prevention of Rh-haemolytic disease.
Brit. Med. J., 4 : 7 e 484, 1967.

CLARKE, C. A. - Prophylaxis of Rhesus iso-immunization.
Brit. Med. Bull., 24 : 3, 1968.

CLAYTON, E. M. Jr., ROBERTSON, J. C. e FELDHAUS, W. D. - Antepartum and postpartum detection of fetal erythrocytes in maternal circulation. *Obstet. Gynec.*, 20 : 608, 1962.

CLAYTON, E. M. Jr., FELDHAUS, W. D. e PHYTHON, J. M. - The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult red cells. *Amer. J. Path.*, 40 : 487, 1963.

CLAYTON, E. M. Jr., FELDHAUS, W. D., PHYTHON, J. M. e WHITACRE, F. E. - Transplacental passage of fetal erythrocytes during pregnancy. *Obstet. Gynec.*, 28 : 194, 1966.

COHEN, F., ZUELZER, W. W., GUSTAFSON, D. C. e EVANS, M. M. - Mechanism of iso-immunization. I-The transplacental passage of fetal erythrocytes in hemoespecific pregnancies. *Blood*, 23 : 621, 1964.

COHEN, F., ZUELZER, W. W. e EVANS, M. M. - The transplacental passage of maternal erythrocytes into the fetus. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 93 : 566, 1965.

CURIE, G. A. - Immunologic of pregnancy. The foeto-maternal barrier. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 61 : 1206, 1968.

DEVI, B., JENNISON, R. F., e LANGLEY, F. A. - Significance of placental pathology in transplacental hemorrhage. *J. Clin. Path.*, 21: 322 e 331, 1968.

DONAVAN, J. C. e CURTIS, J. L. - Transplacental passage of maternal erythrocytes. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 95 : 834, 1966.

DOOLITTLE e MORITZ, C. R. - Prevention of erythroblastosis by an obstetric technic. *Obstet. Gynec.*, 27 : 529, 1966.

DURKING, C. M. e FINN, R. - Foetal hemorrhage into the maternal circulation. *Lancet*, 2 : 100, 1961.

FEAR, R. E. e QUEENAN, J. T. - Foetus affecting the transplacental passage of fetal erythrocytes. *Obstet. Gynec. Austr.*, 29 : 444, 1967.

FINN, R., CLARKE, C. A., DONOHUE, W. T. A., McCONNELL, R. B. e SHEPPARD, P. M. - Transplacental passage of red cells in man. *Nature*, 190 : 922, 1961.

FINN, R., CLARKE, C. A., DONOHUE, T. A., McCONNELL, R. B., SHEPPARD, P. M., LEHANE, D. e KULKE, W. - Experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. *Brit. Med. J.*, 1 : 1486, 1961.

FINN, R., HARPER, T., STALLINGS, S. A. e KREVANS, J. R. - Transplacental hemorrhage. *Transfusion*, 3 : 114, 1963.

FINN, R. - Rh haemolytic disease. Recent advance in Rh isoimmunization prevention. *Brit. Med. J.*, 2 : 219, 1970.

FISCHER, K. e MULLER, V. - Zum Nachweis mütterlecker Erythrocyten in Neugeborenen-Blut. *Uscher. Kinderheilk.*, 115 : 147, 1967.

FRASER, I. D. e RAPER, A. B. - Observation of compatible and incompatible foetal red cells in the maternal circulation. *Brit. Med.*, 2 : 303, 1962.

FREDA, V., GORMAN, J. G. e POLLACK, W. - Successful prevention of experimental Rh sensitization in man with an anti-Rh gamma 2-globulin anti-body preparation. A preliminary report. *Transfusion*, 4 : 26, 1964.

FREDA, V. J., GORMAN, J. G. e POLLACK, W. - Prevention of rhesus haemolytic disease. *Lancet*, 2 : 690, 1965.

FREDA, V. J., ROBERTSON, J. G. e GORMAN, J. G. - Ante-partum management and prevention of Rh isoimmunization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 127 : 909, 1965.

FREDA, V. J., GORMAN, J. G. e POLLACK, W. - Rh factor. Prevention of isoimmunization and clinical trial on mothers. Science, 151: 828, 1966.

FREDA, V. J., GORMAN, J. G., POLLACK, W., ROBERTSON, J. G., JENNINGS, E. R. e SULLIVAN, J. F. - Prevention of Rh isoimmunization. J.A.M.A., 199 : 390, 1967.

FREDA, V. J. - Prevention of isoimmunization to the Rh factor in obstetrics. Year Book Obstet. Gynec., pag. 275, 1966 - 1967.

FRESE, V. E. e TITEL, J. H. - Demonstration of fetal erythrocytes in maternal circulation. Obstet. Gynec., 22 : 527, 1963.

FRESE, V. E. - Massive fetal hemorrhage into the maternal circulation. Obstet. Gynec., 26 : 848, 1965.

GARCIA, G., CHICO, O. e PIÑERO, I. - Transfusión feto-materna. Toko-Gine Practia., 30 : 300, 1971.

GHOSH, B. e ARGRWAL, K. N. - Clinical application of acid elution technique to estimate the degree of trans-placental foeto-maternal transfusion in pregnancy. Ind. J. Med. Research., 41 : 859, 1968.

GORDON, H. e BHOYROO, S. K. - A study of foetal erythrocytes in the maternal circulation during the ante-natal period. J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm., 73 : 571, 1966.

GORDON, H. - Massive transplacental hemorrhage with neonatal death. J.A.M.A. 8, 1968.

GRIMES, H. G. e WRIGHT, F. S. - Fetomaternal transfusion. Amer. J. Obstet. Gynec., 82 : 1971, 1961.

GROBBELAAR, B. G. - Transplacental hemorrhage in Rh-hoemolytic disease. Brit. M. J., 2 : 300, 1968.

GROBBELAAR, B. G. e DUNNING, E. K. - A method of calculating the volume of transplacental foetomaternal hemorrhage. Brit. J. Haem., 17 : 231, 1969.

GUNSON, H. H. - Neonatal anemia due to fetal hemorrhage into the maternal circulation. Pediatrics, 20 : 3, 1967.

HOSOI, T. - Serological identification of fetal blood in the maternal circulation. Yokohama Med. Bull., 9 : 61, 1958.

JAVERT, C. T. e REISS, C. - The origin and significance of macroscopic intervillous coagulation haematomas of the human placenta. Surg. Gyn. Obst., 94 : 257, 1952.

JENSEN, K. G. e SORENSEN, B. - The risk of fetomaternal bleeding in connection with amniocentesis. Abst. Xth. Cong. Int. Soc. Haemat., 1 : 25, 1964.

JONES, P. - Assessment of size of small volume foetomaternal bleeds. A new method of quantification of the Kleihauer technique. Med. J., 2 : 85, 1969.

KEENAN, H. e PEARSE, W. H. - Transplacental transmission of fetal erythrocytes. Amer. J. Obstet. Gynec., 86 : 1096, 1963.

KLEIHAUER, E., BRA, N. H. e BETKE, K. - Demonstration von fetalem haemoglobin in den erythrozyten eines blutauss-triches. Klin. Wschr., 35 : 637, 1957.

KLEIHAUER, E. e BETKE, K. - Praktische anwendung des nachweises von Hb F-haltigen zellen in fixierten blutauss-trichen. Internist., 6 : 292, 1960.

KLEIHAUER, E. e BRANDT, G. - Survival time of fetal erythrocytes in maternal circulation. *Klin. Wschr.*, 42 : 458, 1964.

KLEIHAUER, E. - Fetale homoglobin und fetale erithrozyten. *Arch. Klind. Beiheft.*, 53, 1966.

KLEIHAUER, E. - Der nachweis von Kihdliche erythrozyten un kreslanf der Untter. *Bibl. Haemt. Fasc.* 27 : 382, 1967.

KLINE, B. S. - Microscopic observations of the placental barrier in transplacental erythrocytotoxic anemia (erthroblastosis fetalis) and in normal pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 56 : 226, 1948.

KNOX, E. G., MURRAY, S. e WALKER, W. - The mechanism of rhus isoimmunization. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, 68 : 11, 1961.

KRISTOFFERSEN, K., GERT, K. e FELSØ, M. - Foetal erythrocytes and foetal haemoglobin in the blood of pregnant and non-pregnant subjects. *Danish Med. Bull.*, 9 : 203, 1962.

KRISTOFFERSEN, K. - Foetal haemoglobin in maternal blood during pregnancy and delivery. *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, 42, supl. 6 : 74, 1964.

LEE, R. E. e VAZQUEZ, J. J. - Immunocytochemical evidence for transplacental passage of erythrocytes. *Lab. Invest.*, 11 : 580, 1962.

LEVIAL, P. - The influence of the ABO system on Rh haemolytic disease. *Hum. Biol.* 30 : 14, 1958.

LEPAGE, F., RAVINA, J. H. e COMBOURIEN, P. - Citado por Caballero.

LEVINE, P., KATZIN, E. M. e BURNHAM, L. - Isoimmunization in pregnancy its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis. J.A.M.A., 116 : 825, 1941.

LEWI, S., CLARKE, T. K., GUERITAT, P., WLATER, P. e MAYER, M. - Les erythrocytes poetaux dans la circulation maternelles. Bull, Gynec. Obstet., 13 : 535, 1961.

LEWI, S., e SOULIER, J. P. - Citado por Caballero.

McLAREY, D. C. e FISCH, S. A. - Fetal erythrocytes in the maternal circulation. Amer. J. Obstet. Gynec., 95 : 824, 1966.

MEDINA, A. R. - Conducta del obstetra para prevenir la inmunidad al factor Rh. Gine. Obs. Mexico., 25 : 149 - 257, 1969.

MENGERT, W. F., RIGHTS, C. S. e COLS. - Placental transmission of erythrocytes. Amer. J. Obstet. Gynec., 69 : 678, 1955.

MICHAEL, A. F. e MAUER, A. M. - Materno-fetal transfusion as a cause of plethora in the neo-natal period. Pediatrics., 28 : 458, 1961.

MONTAGUE, A. C. W. e KREVANS, J. R. - Transplacental hemorrhage in cesarean section. Amer. J. Obstet. Gynec., 95 : 1115, 1966.

NOTA da, L. A. - Inmuno-patologia da gravidez incompatibilidad Rh. Porto 1969.

NAESLUND, J. e HEDENSTEDT, S. - Investigations of the permeability of the placental with help of elliptocytes. Acta. Med. Scand., 126, suppl. 170, 1946.

NAESLUND, J. e NYLIN, G. - Investigation on the permeability of the placental with aid of red blood corpuscles tagged with radioactive phosphorus. Acta Med. Scand, suppl. 170, 1946.

NAESLUND, J. e AREN, P. - Studies in changes in the placental with reference to possible injuries to villi and the foetal vessels. Acta Obst. Gynec. Scand., 27 : 115, 1947.

PAINE - Differentiation of foetal and maternal erythrocytes in formal feed tissues. J. Clin. Path., 21 : 783, 1968.

PEDDLE, L. J. - Increase of antibody titer following amniocentesis. Amer. J. Obstet. Gynec., 100 : 567, 1968.

PILKINTON, R., KNOX, E. G., RUSSELL, J. K. e WALKER, U. - Foetal-maternal transfusion and rhesus sensitization. J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm., 73 : 909, 1966.

POCHEDLY, C. e ENTE, G. - Fetal bleeding a dual menace. Post Graduate Med., 157 : 162, 1969.

POLLACK, M. e MONTAGUE, A. C. W. - Citado por Caballero.

POLLACK, W., GORMAN, J. G. e FREDA, V. J. - Prevention of Rh hemolytic disease. Progr. Hematl., 6 : 121, 1969.

QUEENAN, J. T., LANDESMAN, R., NAKAMOTO, M. e WILSON - Post-partum immunization. Obstet. Gynec., 20 : 774, 1962.

QUEENAN, J. T. e NAKAMOTO, M. - Post-partum immunization the hypothetical hazard of manual removal of placental. Obstet. Gynec., 23 : 992, 1964.

RASMUSSEN, J. - The quantitative estimation of foetal erythrocytes in maternal blood. Acta Obstet. Gynec. Scand., 49 : 161, 1970.

RAVINA, J. H., POULAIN, M. e LEPAGE - Citado por Caballero.

ROBINSON, J. M., JAKOBOWIEZ, R., WILLIAMS, L., MOORE, F. e SILBERMANN, E. - Passage of foetal cells into the maternal circulation in Rh negative women. Bibl. Haemat., 29, part 1 : 294, 1966.

ROSTA, K., KOSNAI, I., MUHLRAD, J. e KERTESZ, A. - Foetal-maternal hemorrhage in primiparae with or without previous abortions. Act. Paediatr. Academ. Scient. Hungaricae., Vol. 10 (1) : 79 - 82, 1969.

RUCKENAGEL, D. L. e CHERNOFF, A. L. - Immunologic studie of hemoglobine. III-Foetal hemoglobin changes in the circulation of pregnant women. Blood, 10 : 1092, 1955.

SCHILLER, J. G. - Shock in the newborn caused by transplacental hemorrhage from the fetus to mother. Pediatric., 20 : 7, 1957.

SCHNEIDER, J. e LUDWY, G. A. - Eine neue zahlmethode zur quactitative. Erfassung klinischer fetaler, in den mütterlichen: Kreislaufgeschwemmter Erythrozyten. Klin. Wschr., 41 : 563, 1963.

SCHNEIDER, J. e PREISLER, O. - Prevention of Rh sensitization from fetomaternal microtransfusion. Obstet. Gynec., 28 : 615, 1966.

SEIGNEURIN, R., PEREZ, R. e MAGNING, R. - Citado por Caballero.

SMITH, K., DUHRING, J. L., GREENE, J. e COLS. - Transfer of maternal erythrocytes into the fetal circulation. *Obstet. Gynec.*, 18 : 673, 1961.

SULLIVAN, J. E., PECKMAN, N. H. e JENNINGS, E. R. - Rh isoimmunization. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 98 : 877, 1967.

STERN, K., GOODMAN, H. S. e BERGER, M. - Experimental studies on Rh immunization. *J. Immunol.*, 87 : 189, 1961.

TAYLOR, W. C. e KULLMAN, G. - The detection of foetal erythrocytes in blood smears. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, 68 : 261, 1961.

TURCHETTI, G., PALAGI, R. e LATTANZY - Anemia in the newborn due to transplacental fetal hemorrhage. *Obstet. Gynec.*, 26 : 698, 1965.

VALENSI, H. e MONASTERIO, R. - Estudio del paso de Hf en 3.264 mujeres Rh (-) en el pos-partum. *Toko-Gine. Pract.*, 30 : 755, 1971.

VOS, G. H. - An antenatal evaluation of increase Rh-antibody stimulation. *South African Med. J.*, 43 : 130, 1969.

WENTWORTH, P. - A placental lesion to account for foetal hemorrhage into maternal circulation. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm.*, 71 : 379, 1964.

WERF, A. J. - Avascular erythrocytotoxic iso-antibodies induced by early human trophoblast. *Lancet*, 1 : 595, 1971.

WINHOEFER, H., SCHNEIDER, J. e LEIDENBERGER, F. - Citado por Quænan.

WOODROW, J. C., CLARKE, C. A., DONCHOE, W. T. A.,
FINN, R. e COLS. - Prevention of Rh haemolytic disease.
A third report.

WOODROW, J. C. e FINN, R. - Transplacental hemorrhage.
Brit. J. Haemat., 1 : 295, 1966.

WOO WANG, M. Y., McCUTCHEON, E e DESFORGES, J. F. -
Fetomaternal hemorrhage from diagnostic transabdominal
amniocentesis. Amer. J. Obstet. Gynec., 97 : 1123, 1967.

ZILLIACUS, H. - Agglutinated incompatible fetal ery-
throcytes in the maternal circulation. Amer. J. Obstet.
Gynec., 86 : 1093, 1963.

ZILLIACUS, H. - Foetal erythrocytes in the maternal
circulation. Acta. Obstet. Gynec. Scand., 44 : 219, 1965.

ZILLIACUS, H. - The detection of foetal blood in
hemorrhage of late pregnancy. Gynec., 157 : 2, 1964.

ZIMMERMANN, W. - Die bedeutung der nidation beim
sagetier fur die immunologiestie zaleranz zweschenuntlend
fet. Naturw. Rdsch., 19 : 18, 1966.

ZYPURSKY, A. - Foetal erythrocytes in the maternal
circulation. Lancet., 1, 1959.

ZYPURSKY, A., POLLACK, J., CHOWN, B. e ISRAEL, L. G. -
The transplacental passage of foetal red blood-cells and
the pathogenesis of Rh immunization during pregnancy.
Lancet., 2 : 493, 1963.

ZYPURSKY, A. e ISRAEL, L. G. - The pathogenesis and
prevention of Rh immunization. Canad. Med. Ass. J., 97 :
1245, 1967.

ZYPURSKY, A., POLLACK, J., CHOWN, B. e ISRAEL, L. G. -
Citado por Caballero.