



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



8. Praktikum: Immunserologie 1. Präzipitation, Agglutination

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2024.

Definition der Serologie

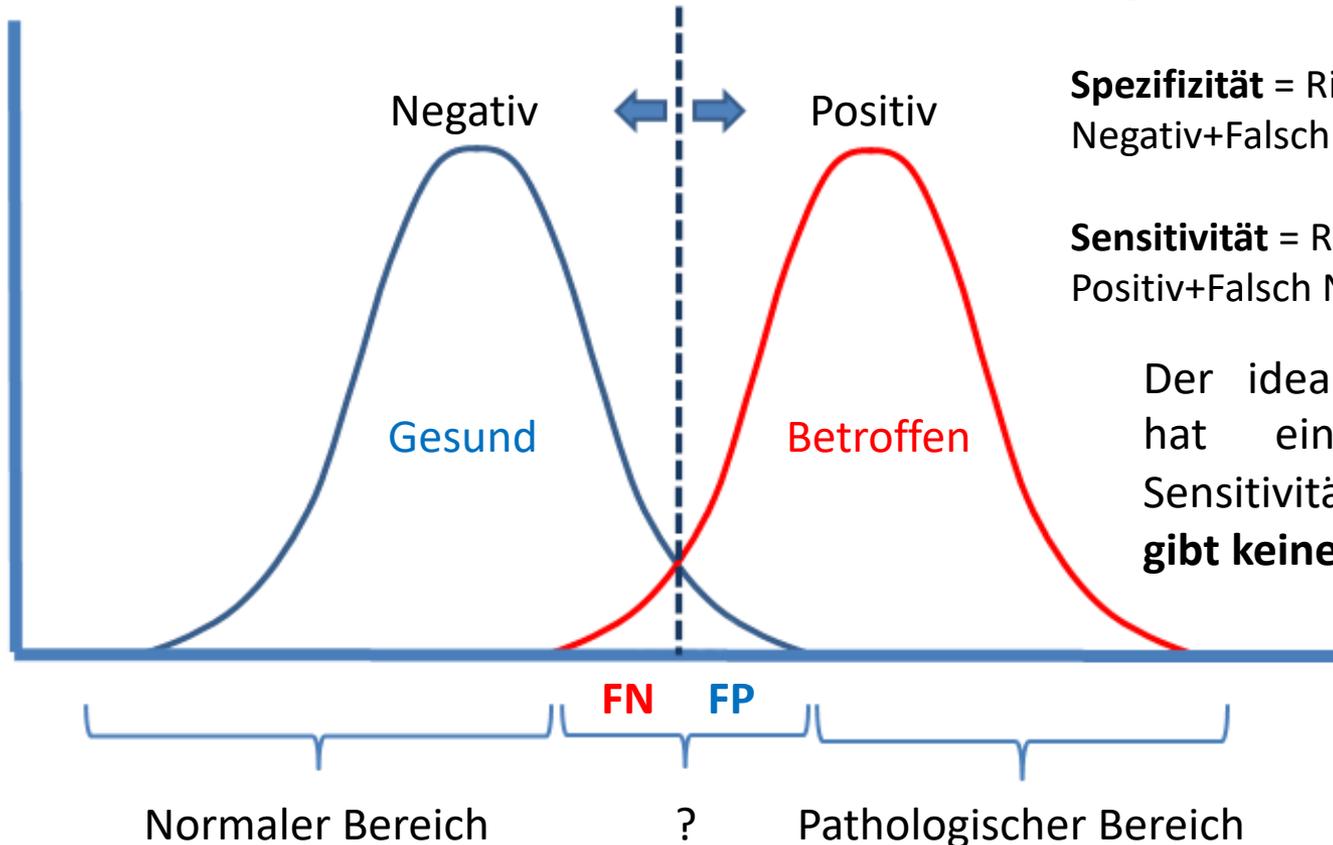
- Die wissenschaftliche Erforschung des **Blutserums** oder anderer Körperflüssigkeiten; In der Praxis handelt es sich um die Identifikation von **Antikörpern** im Serum.
- Erinnern Sie sich?
 - **Blutplasma**: Überstand des antikoagulierten Blutes
 - **Blutserum**: Überstand des koagulierten Blutes
- Basiert auch auf der **Antigen-Antikörper Reaktion**. (beide können detektiert werden)
- Welche Methoden umfasst die Serologie?
 - Methoden auf Basis der **Präzipitation**
 - Methoden auf Basis der **Agglutination**
 - **Immunassays** (ELISA, ELISPOT, Radioimmunassay, etc., siehe nächstes Praktikum)
 - **Immunblotting Technik** (Western blot, Dot blot, siehe nächstes Praktikum)
 - **(Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie)**
- Wichtigste Klinische Anwendungen:
 - Diagnostik von **infektiösen Krankheiten** (z.B. Detektieren von Antikörpern die gegen Pathogene produziert werden)
 - Diagnostik **autoimmuner Störungen** (Detektieren von **Autoantikörpern**)
 - Diagnostik der **Immundefizienzen** (Bestimmen des Immunglobulin-Spiegels)
 - Bestimmen der Blutgruppe

Spezifität, Sensitivität

FN = Falsch Negativ

FP = Falsch positiv

Schwellenwert



Begriffe:^[1.]

Spezifität = $\frac{\text{Richtig Negativ}}{\text{Richtig Negativ} + \text{Falsch Positiv}}$

Sensitivität = $\frac{\text{Richtig Positiv}}{\text{Richtig Positiv} + \text{Falsch Negativ}}$

Der ideale Diagnostische Test hat eine Spezifität und Sensitivität von 100% aber es **gibt keinen solchen Test.**

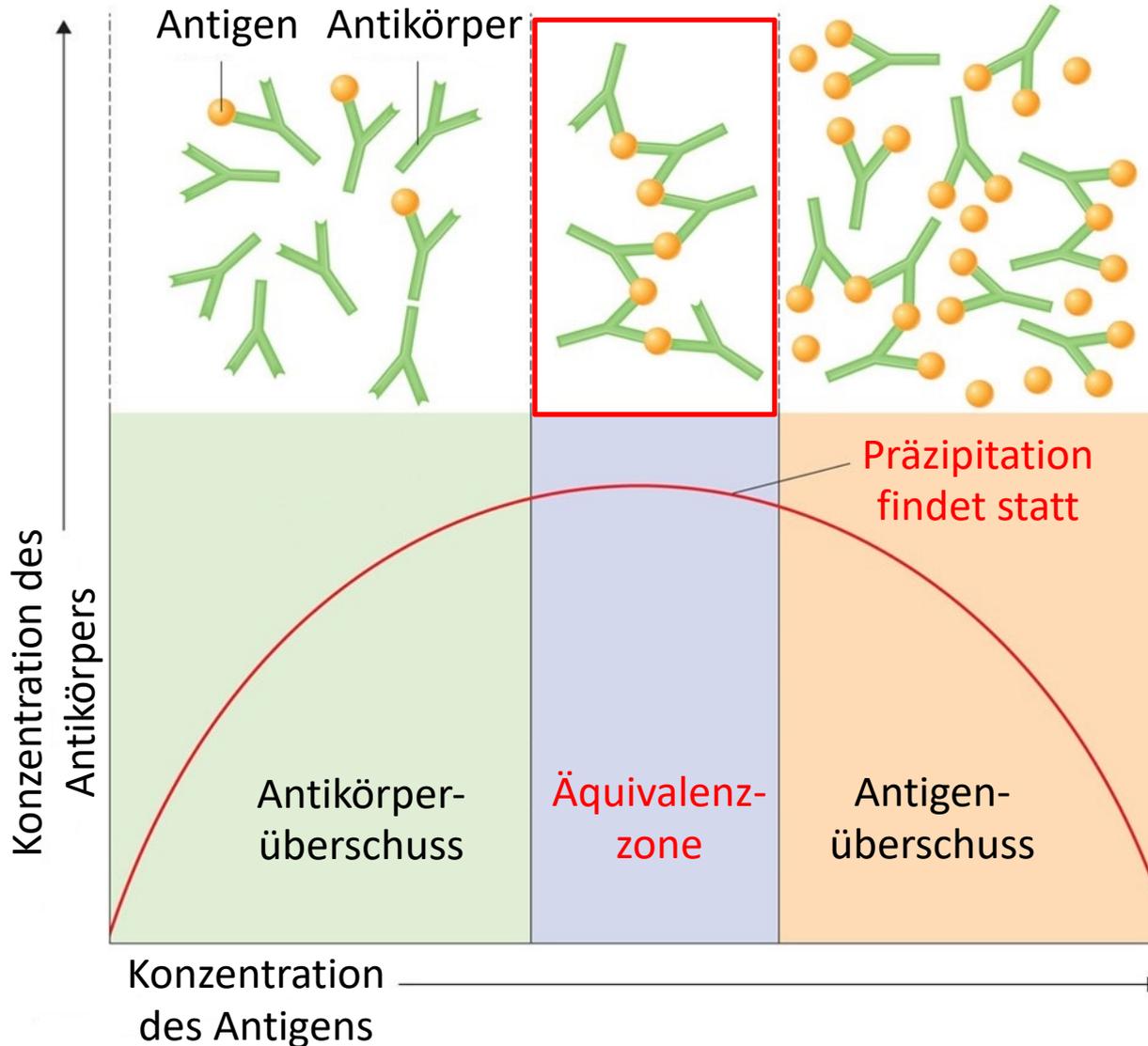
Falsch positives
Ergebnis



Falsch negatives
Ergebnis



Präzipitation



Wenn das Antigen und der erkennende Antikörper in der gleichen Lösung im richtigen Verhältnis (Äquivalenzzone) vorhanden sind bilden sich größere Immunkomplexe.



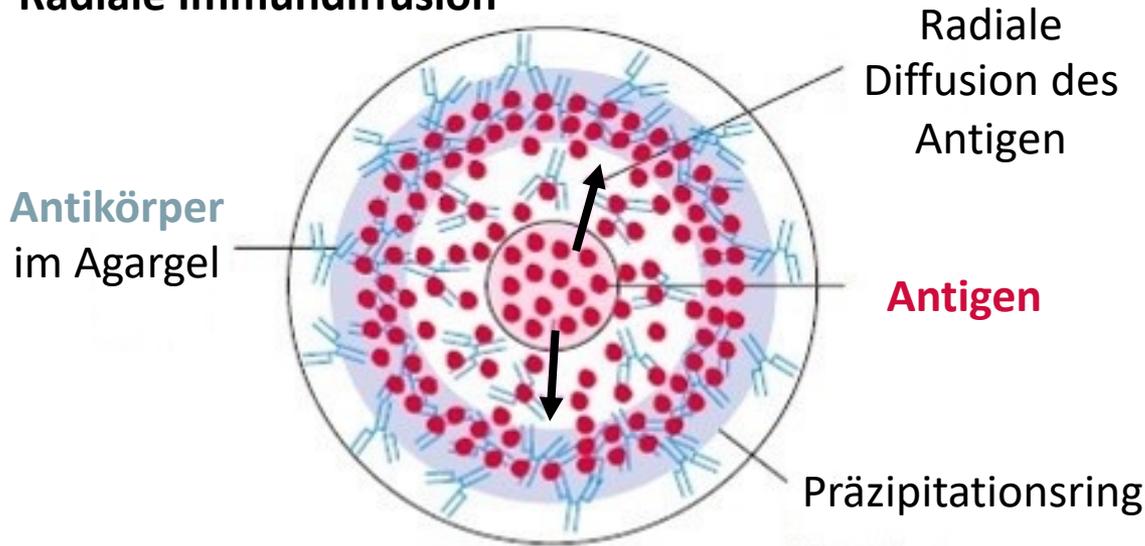
Die Löslichkeit dieser Komplexe sinkt und sie präzipitieren.

Methoden die auf Immunpräzipitation basieren:

- **Immundiffusion**
- **Immunelektrophoresis**

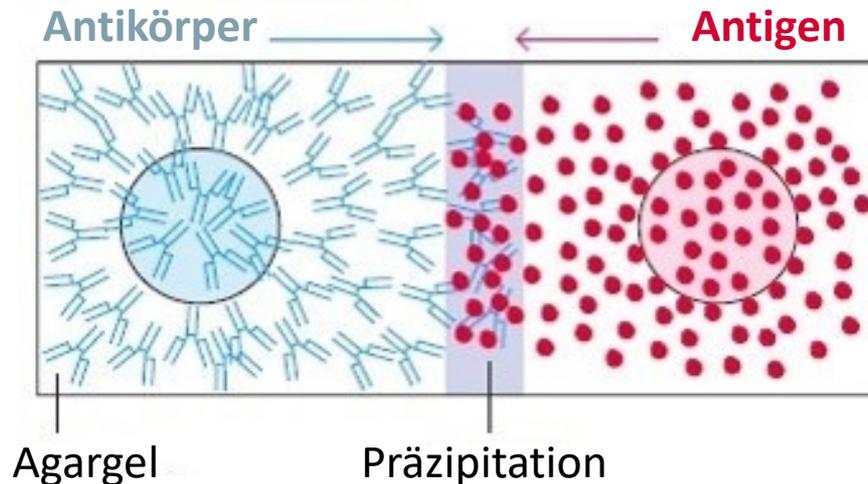
Immundiffusion I.

Radiale Immundiffusion



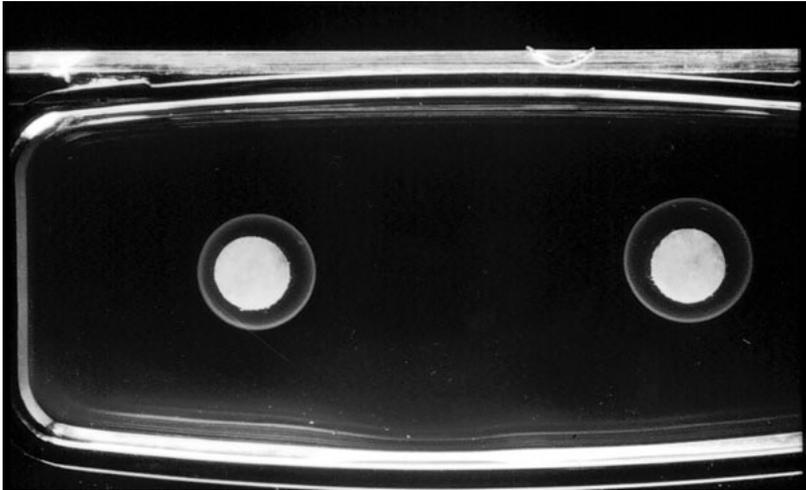
Einfache aber **veraltete** Techniken.

Doppelte Immundiffusion



Immundiffusion II.

Mancini^[2.] Radiale Immundiffusion:



Das Antigen ist gleichmäßig in das Agargel inkorporiert. Dann wird Serum in die vorgesehenen Stellen in das Gel plaziert. Die Antikörper im Serum diffundieren radial. Sobald die Antigen-Antikörper Konzentration die Äquivalenzzone erreicht bildet sich ein Präzipitationsring.

Semiquantitative Methode.

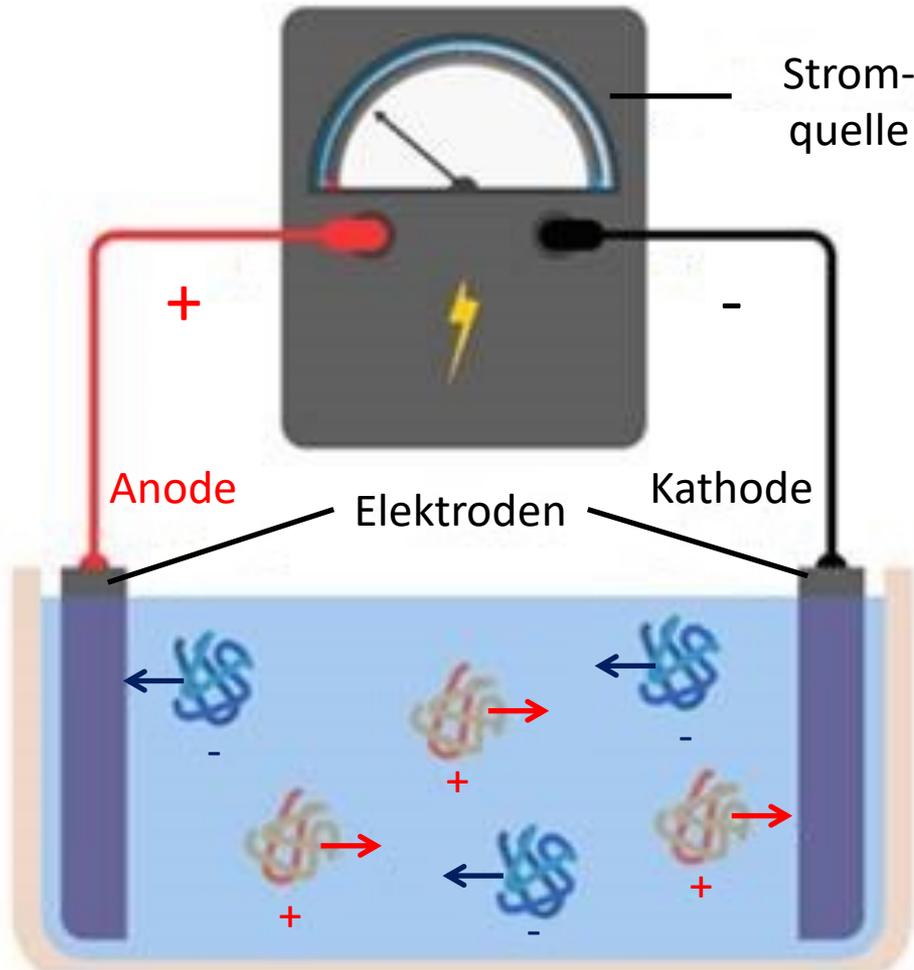
Ouchterlony^[3.] Doppelimmundiffusion:



Das Loch in der Mitte (C) enthält das Antigen während die umliegenden Löcher (1-6) die zu untersuchenden Sera enthalten. Während die Antigene und Antikörper aufeinander zu diffundieren werden sie Präzipitieren sobald sie die Äquivalenzzone erreichen.

Semiquantitative Methode.

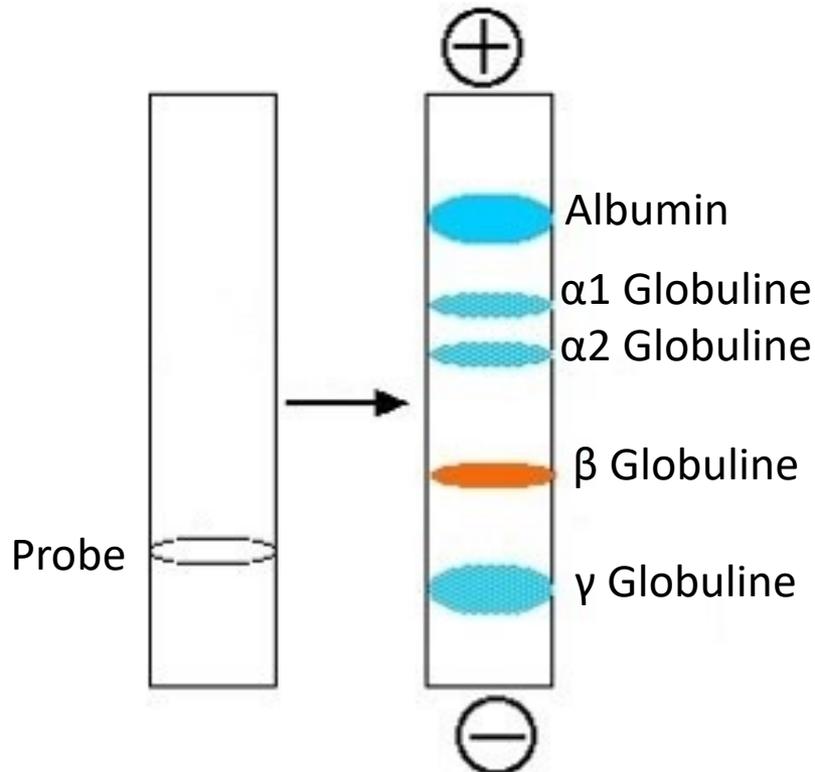
Protein Elektrophorese



- Moleküle mit elektrischen Ladungen (inklusive Proteine) werden zu der entgegengesetzten Ladung migrieren wenn sie in einem elektrischen Feld platziert werden.
- Das Migrationstempo ist abhängig von:
 - Dem Widerstand der Matrix (kann standardisiert werden)
 - Der angewandten Spannung (kann standardisiert werden)
 - Die **größe** und **Ladung** der Proteine (letzteres ist **vom pH abhängig**)
- Proteine die mit verschiedener Geschwindigkeit migrieren können physikalisch **separiert** werden.
- Die Matrix kann:
 - Fest (z.B. Papier, Nitrozellulose)
 - Halb-flüssig (z.B. Agarose- oder Polyacrylamidgel)
 - Flüssig
sein

Serumproteinelektrophorese

- Die Elektrophorese des Serums wird bei alkalischem pH ausgeführt. Der Großteil der Proteine migriert zur positive Elektrode bei diesen Bedingungen. Die Proteine können mit unspezifischem Färbemittel detektiert werden.



Arne Tiselius

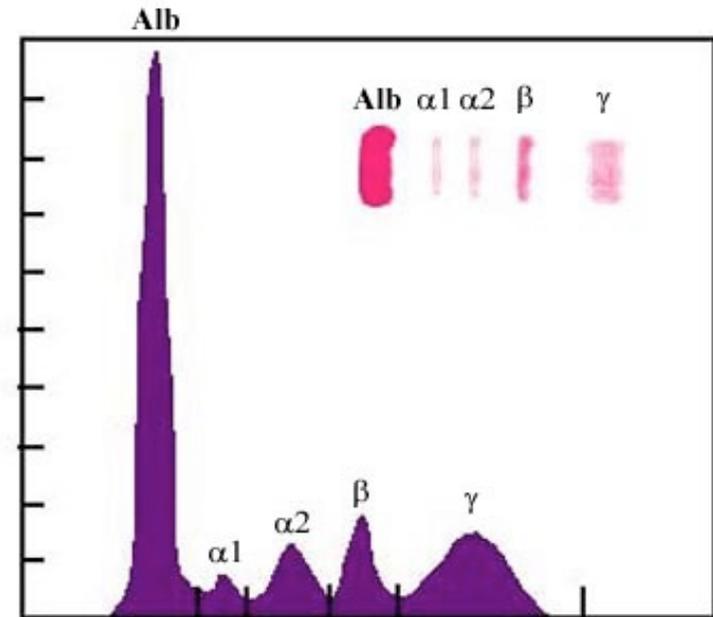
Erhielt 1948 den Nobelpreis für Chemie:

„für seine Forschung über die Elektrophorese und Adsorptionsanalyse, besonders für seine Entdeckungen bezüglich der komplexen Natur der Serumproteine.“^[5.]

Analyse der Serumelektrophorese

Einige Beispiele für Proteine die in den Fraktionen gefunden werden können:^[6.]

- Die Größte Fraktion ist das **Albumin**. ↓
- $\alpha 1$ Globuline:
 - **$\alpha 1$ -Antitrypsin** ↑
 - **Serum Amyloid A** ↑
 - **Retinol-Bindendes Protein** ↓
 - **Transcortin** ↓
- $\alpha 2$ Globuline:
 - **Ceruloplasmin** ↑
 - **Angiotensinogen**
 - **Haptoglobin** ↑
- β Globuline:
 - **$\beta 2$ -Mikroglobulin** ↑
 - **Transferrin** ↓
 - **Plasminogen**
- γ Globuline:
 - **Immunglobuline**

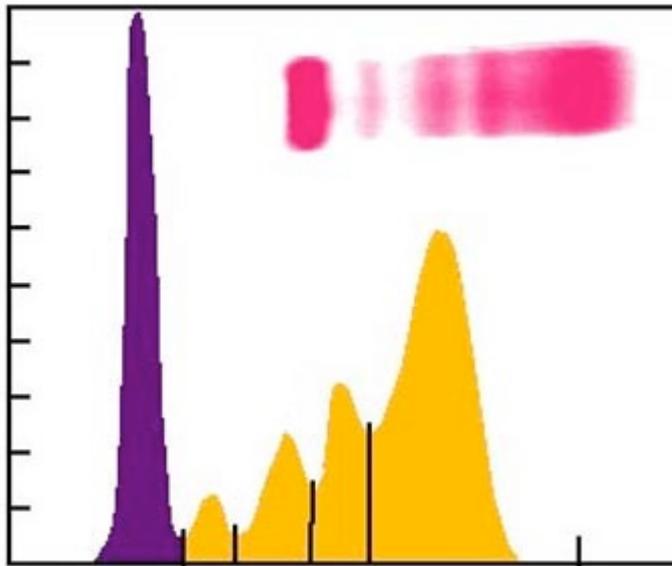


Das normale Muster der Serumelektrophorese als **Densitometrisches Diagramm**.

- Ihre Blutspiegel ändern sich während der **Akutphase Reaktion** aufgrund von inflammatorischen Zytokine (z.B. $TNF\alpha$, IL1, IL-6):
- **Anstieg** (auch positive **Akutphase Proteine** genannt, der wichtigste Vertreter ist **CRP** das zwischen den β und γ Fraktionen gefunden werden kann^[7.])
 - **Senkung**

Beispiele abnormaler elektrophoretischer Muster I.

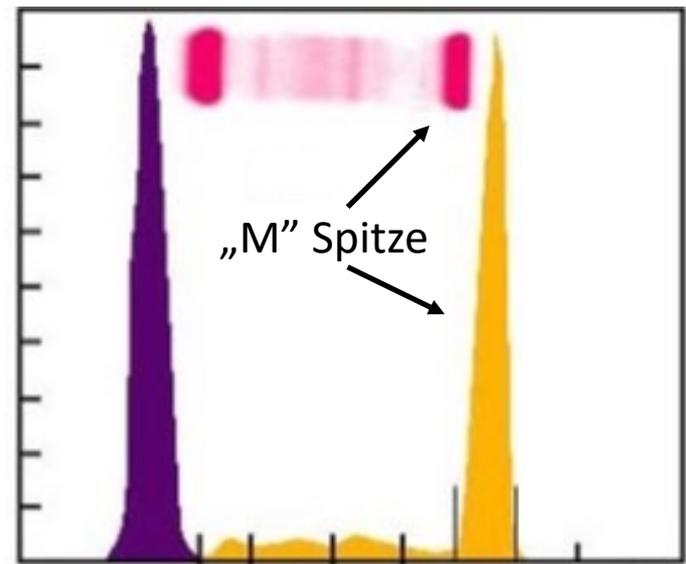
Polyklonale Gammopathie



Ein Immunglobulinüberschuss der von **verschiedenen B Zellklonen** in **entzündeten Zuständen** produziert wird:^[7.]

- Infektionen
- Autoimmune Störungen
- Krebs
- Leber Krankheiten (z.B. Hepatitis, Zirrhose)

Monoklonale Gammopathie

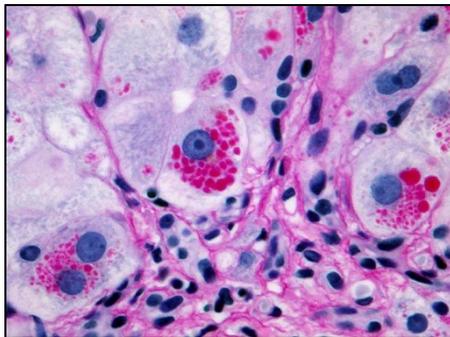
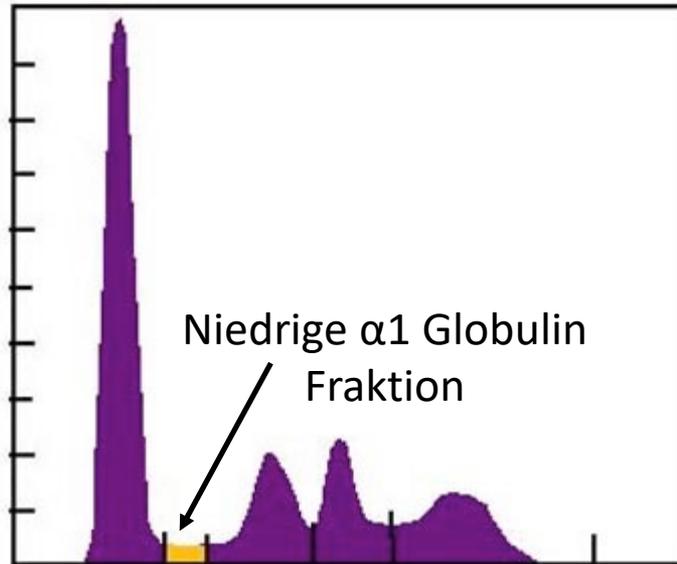


Ein Immunglobulinüberschuss der von **einem einzigen B Zellklon** produziert wird. Bei **Plasmazell Neoplasien** zu finden:^[7.]

- Multiples Myeloma
- Waldenström Makroglobulinämie
- MGUS (Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz)

Beispiele abnormaler elektrophoretischer Muster II.

α 1-Antitrypsin Defizienz^[8.]



Akkumuliertes A1AT kann in PAS-positive Granula in Hepatozyten gesehen werden.

α 1-antitrypsin (A1AT):

- **Produziert in der Leber.**
- **Neutralisiert Elastase** Enzyme die von Neutrophilen während Entzündungen produziert werden.

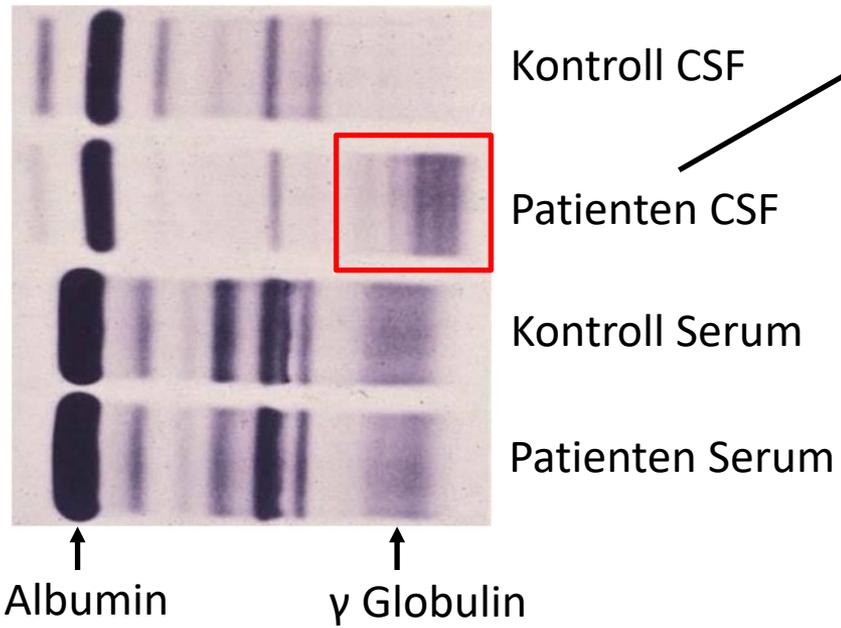
α 1-Antitrypsin Defizienz:

- **Eine genetische Krankheit.**
- Leber Zellen können kein α 1-antitrypsin sekretieren, das sich im Zytoplasma sammelt.
- Der **α 1-Antitrypsin** Spiegel im Blut sinkt stark was zu Komplikationen führen wird:

- **Leberschaden** (aufgrund A1AT Ablagerung)
- **Lungenschäden** (Inflammatorische Reaktionen verursachen Gewebsschäden ohne die inhibitorischen Effekte von A1AT)
- **Chronische Pankreatitis** (aufgrund A1AT-Mangel)

Elektrophorese anderer Körperflüssigkeiten

Zerebrospinalflüssigkeit (CSF)

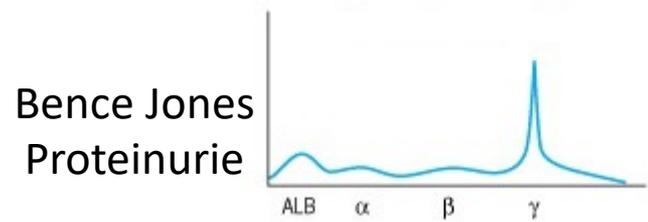
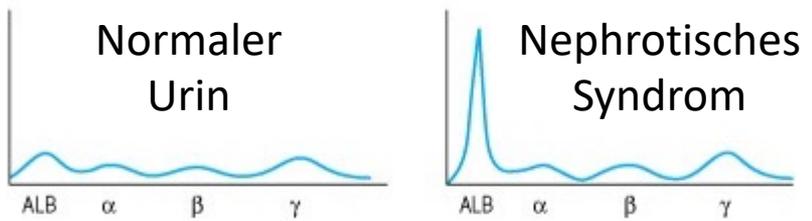


In der CSF des Patienten können individuelle Bänder in der gamma Globulin Fraktion gesehen werden. Die detektierten Muster unterscheiden sich von denen im Patientenserum.

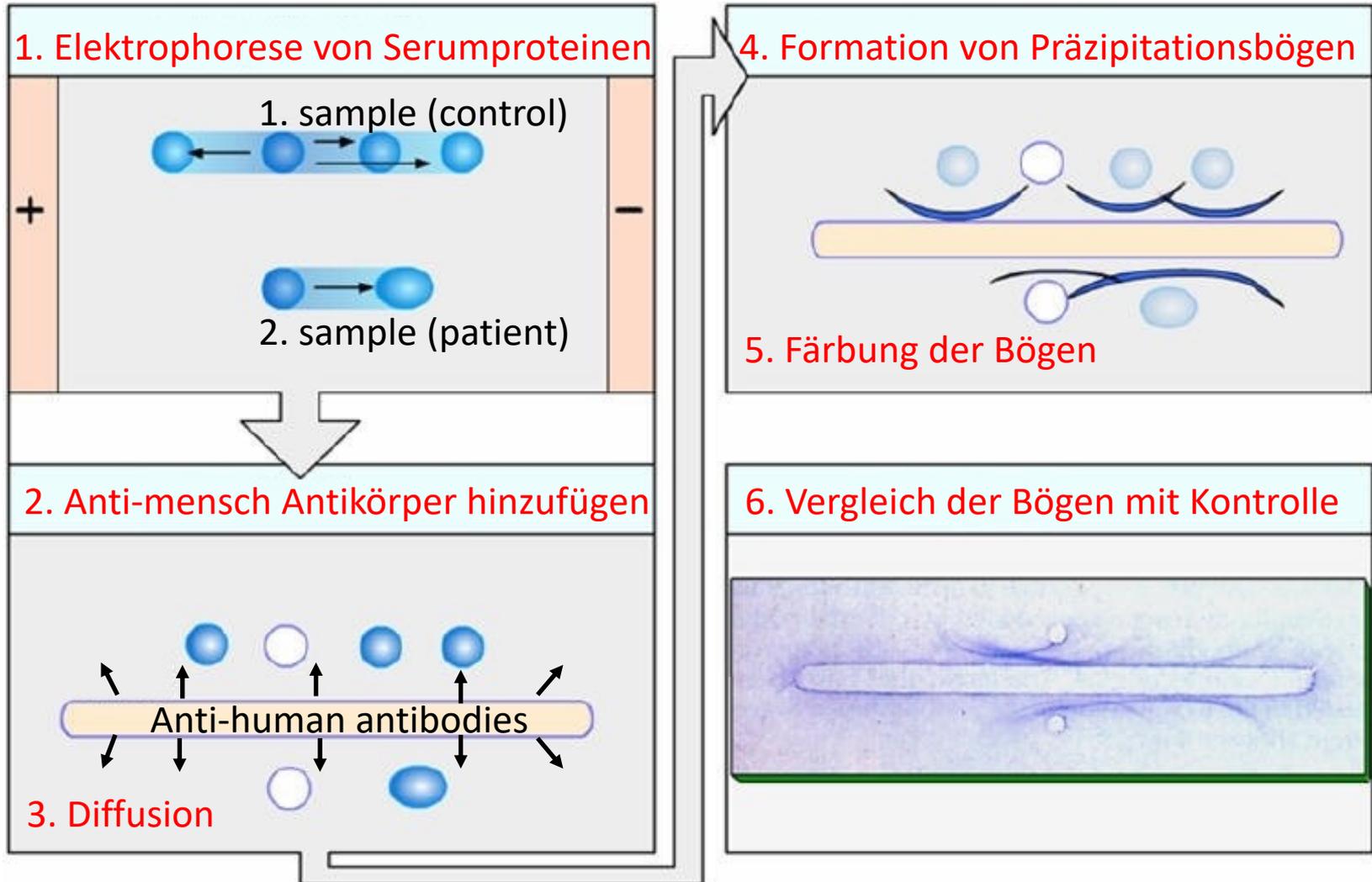
Immunglobuline werden local im ZNS des Patienten produziert. (**oligoklonale Gammapathie**, z.B. bei **Multiple Sklerose**^[9.])

Urin Elektrophorese:

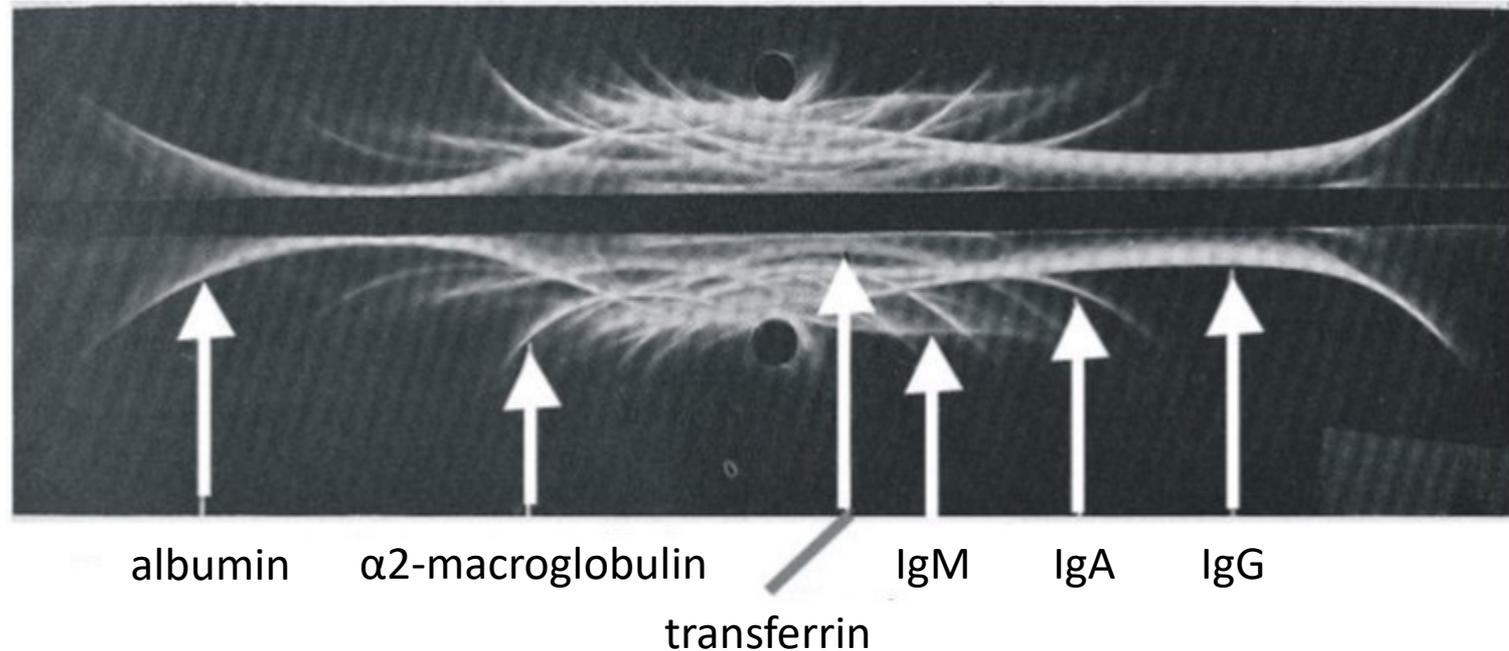
Wird parallel zur Serumelektrophorese durchgeführt wenn **Multiples Myelom** vermutet wird. Man versucht die Immunoglobulin Leichtkette (Bence Jones Protein^[10.]) im Urin zu finden.



Immunelektrophorese I.



Immunelektrophorese II.



Die Präzipitationsbögen der Probe werden immer mit einer normalen Kontrollprobe verglichen.^[11.]

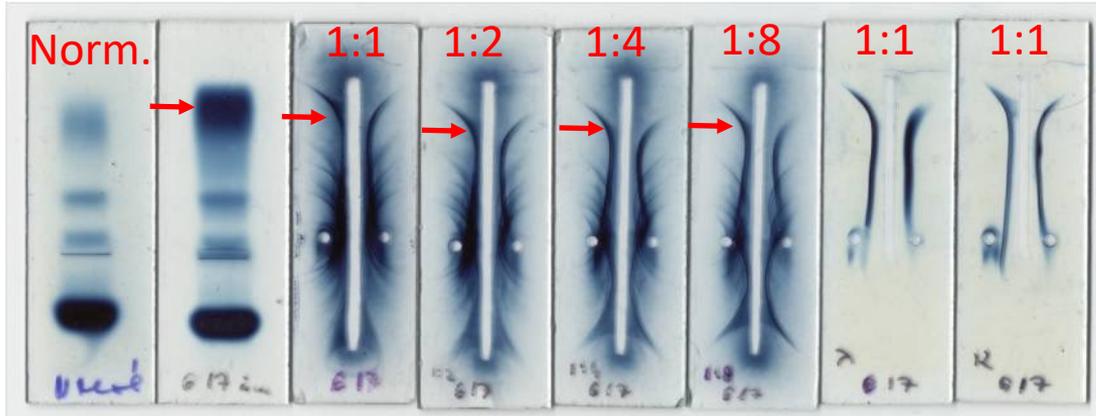
Wenn polyklonale Antikörper hinzugefügt werden ist die Zahl der Bögen von der art des anti-Mensch Serums abhängig (Pferd, Ziege, Hase, usw.)

Serumproteine können mit monoklonalen Antikörpern spezifisch identifiziert werden.

Es ist ein **semiquantitativer Test** wird aber im klinischen Alltag nur selten genutzt.

1. Polyklonale Hypergammaglobulinämie (Rheumatoide Arthritis)

Anti-λ Anti-κ



(Begründung:
Der 1. Patient hat eine polyklonale B Zelle Aktivierung aufgrund einer Autoimmunreaktion die zur polyklonalen Antikörper production geführt hat. Im 2. Fall produzieren Klone einer einzigen kanzerösen Plasmazelle monoklonale Immunglobuline des selben Isotyps.)

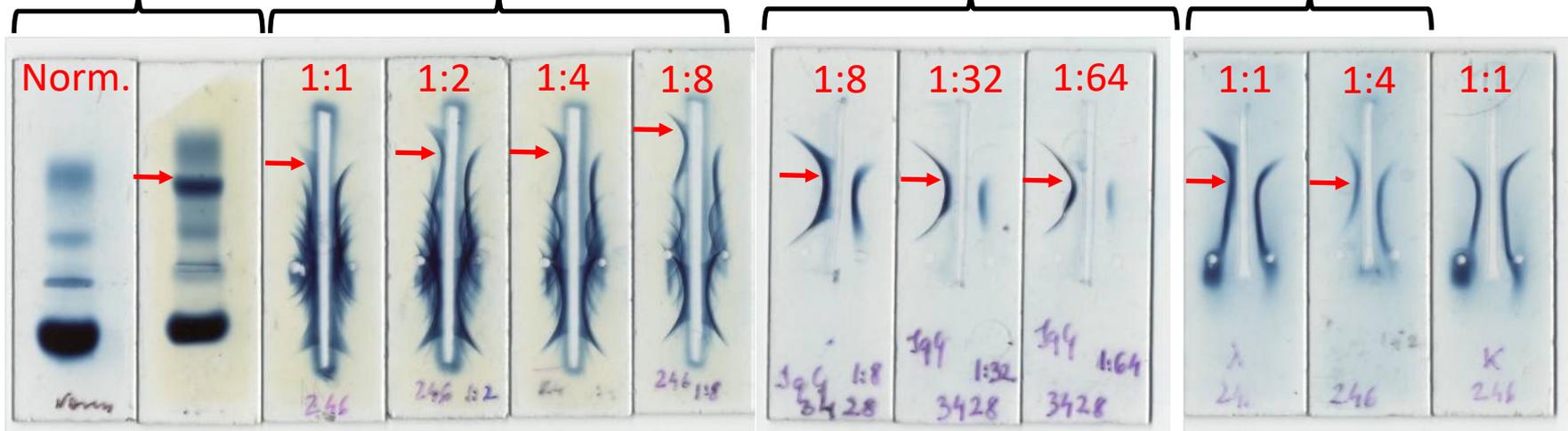
Serum ELFO

Polyklonale iELFO

Anti-IgG

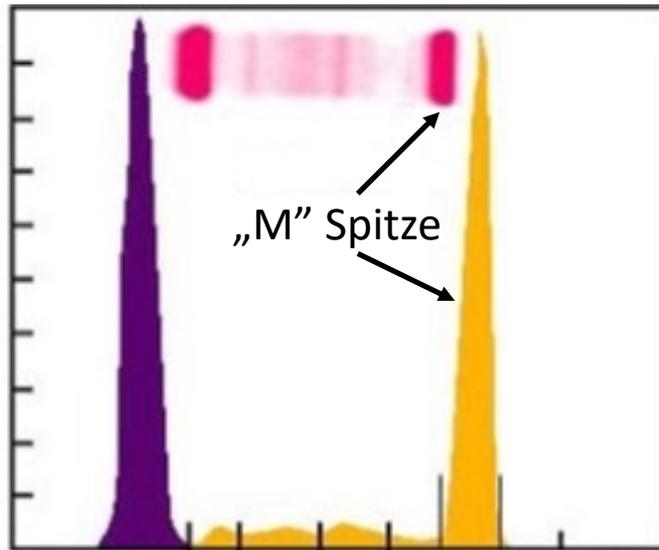
Anti-λ

Anti-κ



2. Monoklonale Gammopathie (multiples Myelom produziert IgG λ Immunglobulin)

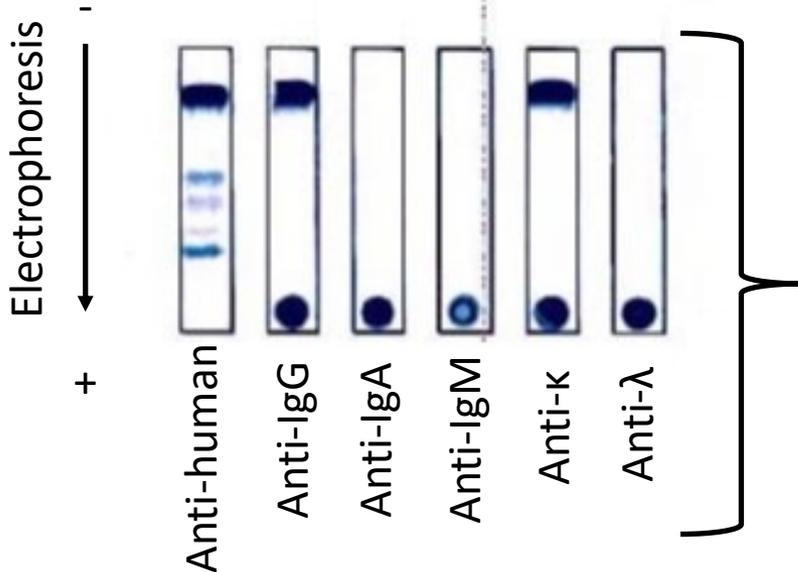
Immunfixation I.



1. Die Elektrophorese wird simultan durchgeführt indem das Serum parallel in mehrere Proben unterteilt wird.^[12.]
2. Bestimmte Proteine werden durch Nutzung verschiedener Antikörper in unterschiedlichen Gelen detektiert. (Die hinzugefügten Antikörper präzipitieren mit dem Antigen, was normalerweise mit Färbemittel detektiert wird. Die Antigene sind meistens selbst die humanen Immunglobuline.)

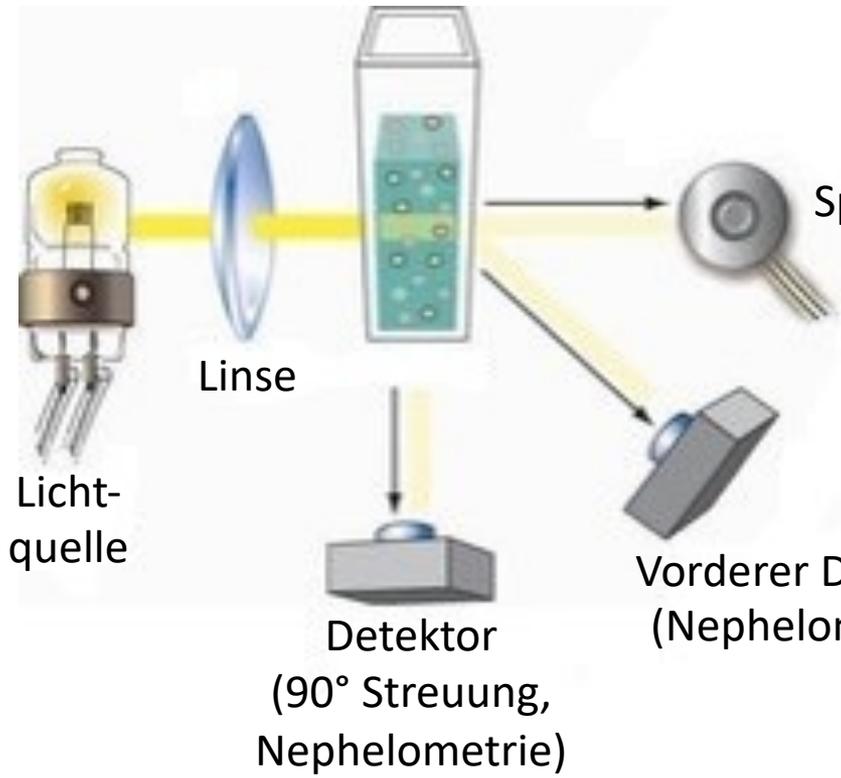
Anwendungen:

- Diagnostik von Plasmazellneoplasien durch Erkennung abnormaler monoklonaler Antikörper („**Paraproteins**“) im Serum die sie produzieren.^[13.]



Multiples Myelom produziert monoklonale Antikörper des IgG κ Isotyps.

Nephelometrie, Turbidimetrie



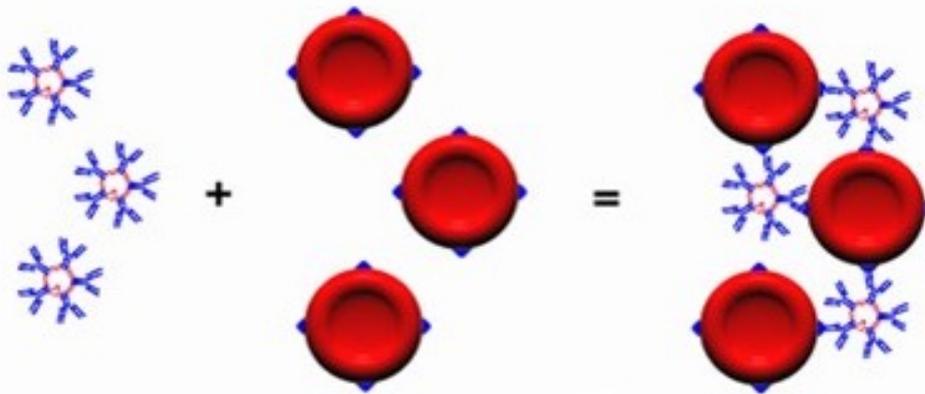
Makromoleküle (z.B. Immunkomplexe) in **Lösungen streuen Licht**. Die Streuung ist proportional zur Größe der Partikel

Der Analyt kann mit Nephelometrie durch **Lichtstreuung** identifiziert werden. Während Licht die Küvette durchtritt **sinkt die Intensität des Lichts** was durch Turbidimetrie detektiert wird.^[14.]

Anwendungen: Messen der Konzentration von Immunkomplexen, z.B. IgA, IgM, IgG Spiegel oder die Spiegel der Leichtketten (z.B.. Multiples Myelom), Komplementspiegel

Agglutination

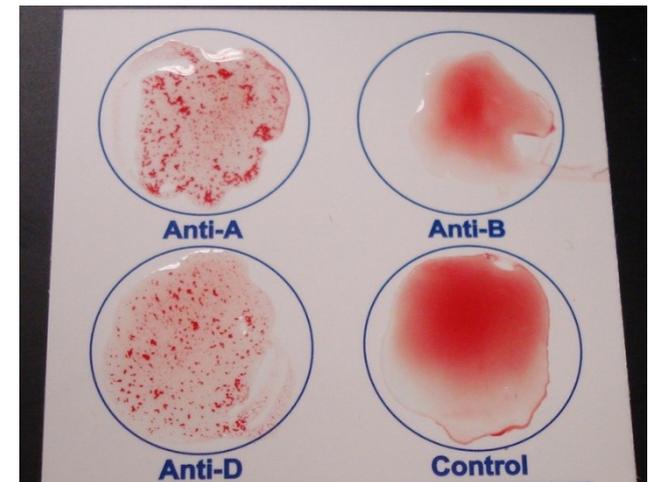
- Falls Antikörper größere Partikel verbinden und zu aggregation dieser Partikel führen = **Agglutination** (im Fall von Erythrozyten wird es **Hämagglutination** genannt)
- Agglutination ist eine der **physiologischen Funktionen** der Antikörper, Agglutination von Pathogenen verhindert die Ausbreitung von Infektionen. [15.]
- Kann **direkt** oder **indirekt** und **aktiv** oder **passiv** sein.
- Viele diagnostische Tests basieren auf Agglutinationsreaktionen wobei die klumpenden Partikel direkt sichtbar werden.



Anti-„A“ IgM

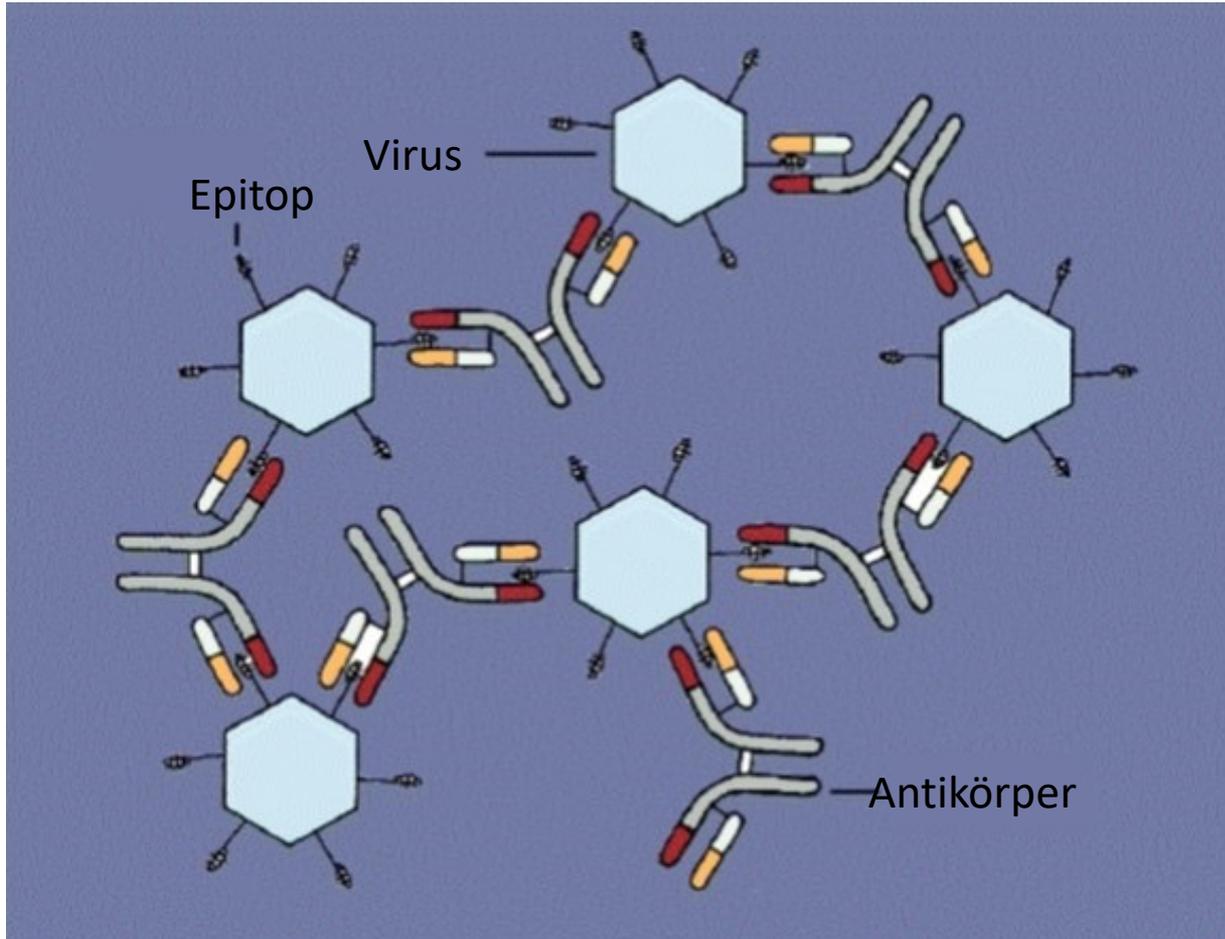
RBC mit „A“
Antigen

Hämagglutination



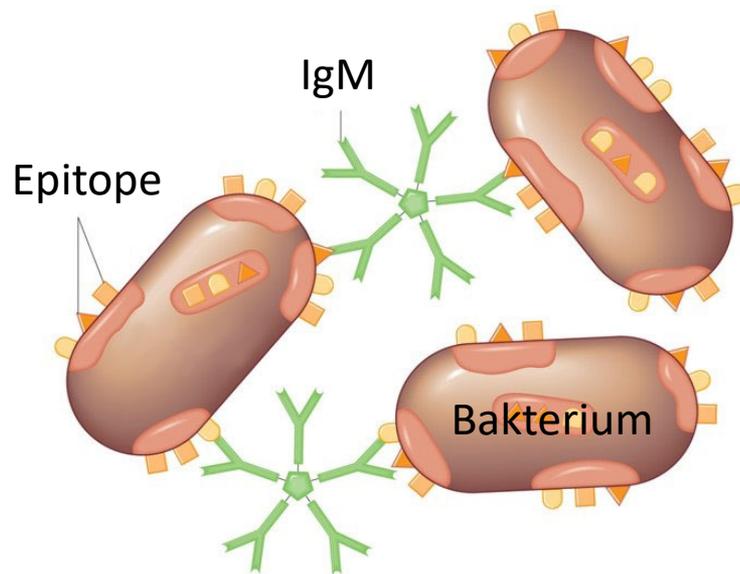
Blutgruppentest: A, Rh(D)
positiv

Physiologische Rolle der Agglutination



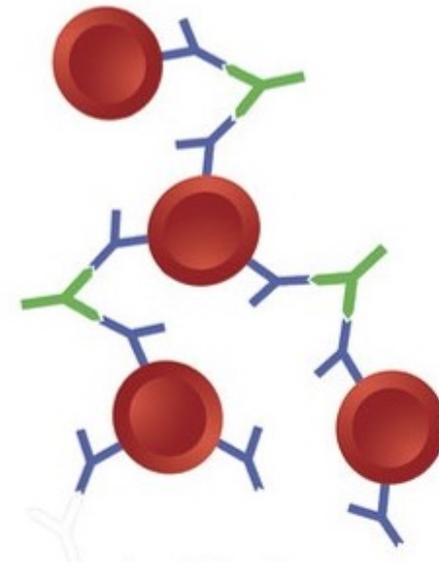
Direkt oder indirekt

Direkte Agglutination:



- Die Partikel werden durch primäre Antikörper miteinander verbunden.
- Antikörper des **IgM** isotyps können effektiv Partikel agglutinieren.

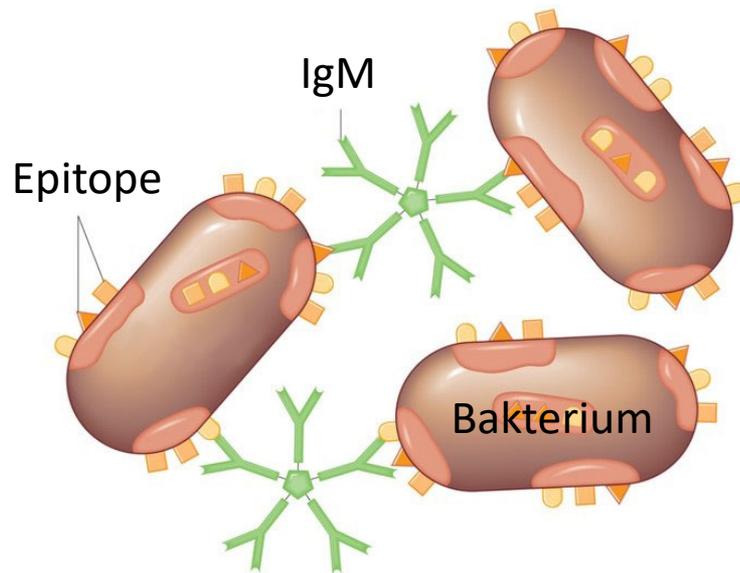
Indirekte Agglutination:



- Sekundäre Antikörper verbinden die Partikel.

Aktiv oder passiv

Aktive agglutination:



Passive agglutination:

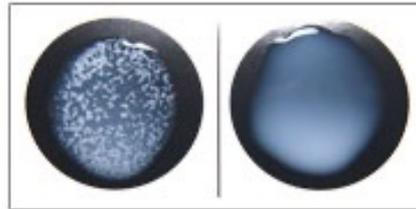


- Die/das Zelle/Partikel nimmt an der Reaktion mit **eigenen Oberflächenantigenen** teil.
- Beispiele:
 - Blutgruppenbestimmung
 - Bestimmung bakterieller Zelloberflächenantigene
- Das Antigen wird **künstlich** an Partikel **gebunden** die an der Reaktion teilnehmen. Beispiel:
 - Latexagglutination Reaktionen (siehe die nächsten Folien)

Die klinische Bedeutung der Agglutination

- Eine der physiologischen Funktionen der Antikörper zum Schutz vor Pathogenen.
- In vivo Hämagglutination kann bei bestimmten Krankheiten stattfinden. (z.B. **Autoimmune hämolytische Anämie, AIHA**)
- Diagnostische Tests:
 - **Latexagglutinations Tests:**
 - **Autoimmune Störungen** (Detektion von Autoantikörpern)
 - **Infektionen** (Detektion mikrobieller Antigene oder der Antikörper die diese erkennen)
 - Detektion anderer Proteine (z.B. CRP, hCG, D-Dimer)
 - **Tests die auf Hämagglutination basieren:**
 - **Bestimmung von Blutgruppen**
 - **Coombs Test (Antiglobulin Test)**
 - Hämagglutinations Assay
 - Hämagglutination-Inhibitions-Assay:
 - Identifikation viraler Hämagglutinine
 - Testantikörper die virale Hämagglutinine hemmen können.

Latexagglutinations Test



Positiv Negativ

Das/Der Antigen/Antikörper das am der Reaktion teilnimmt wird an die Oberfläche von **Latexkugeln** gebunden.

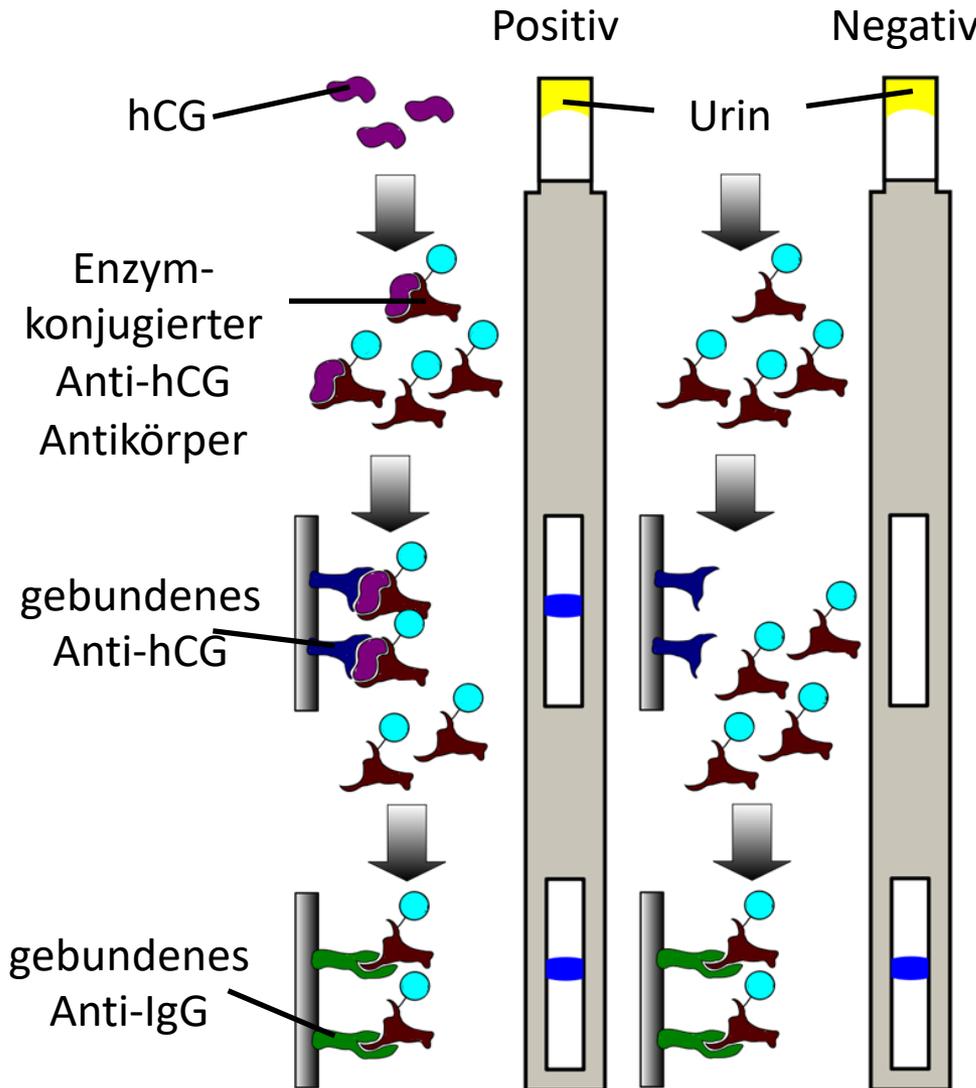


Falls der untersuchte Antikörper/Antigen in der Probe ist, kommt es zur Aggregation der Kugeln.

Anwendungen:

- **Diagnostik autoimmuner Störungen**, z.B.:
 - Rheumatoide Arthritis (Rheuma Faktor, RF^[16.]) , SLE (verschiedene autoantibodies)
- **Diagnostik infektiöser Krankheiten**, z.B.:
 - Erkennung von Antikörpern gegen mikrobielle Antigene (z.B. Anti-Streptolysin O Antikörper, ASO/AST^[17.])
 - Detektion bakterieller Antigene
- Detektion anderer Proteine, z.B.:
 - **C-reaktives Protein** (CRP, akut Phase Protein^[18.]), D-Dimer^[19.] (indiziert Blutkoagel Bildung), **humanes chorion Gonadotropin** (hCG, bei Schwangerschaft)

Heim Schwangerschaftstest



Nach der Befruchtung taucht hCG das von Trophoblasten produziert wird im Urin der Mutter auf.

hCG kann durch mehrere immunologische Methoden (wie ELISA oder Agglutination) detektiert werden aber der Heimtest basiert auf **Chromatographie**.^[20.]

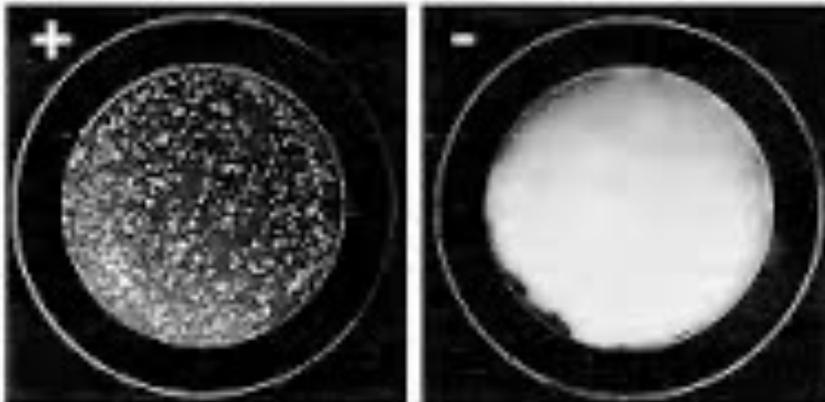


Streifen bilden sich nur wenn der enzyme-konjugierte Antikörper gebunden wird. Ist hCG nicht im Urin dann wird nur anti-IgG die markierten Antikörper binden und nur ein Band (die Kontrolle) wird erscheinen.

Agglutinations Praktikum

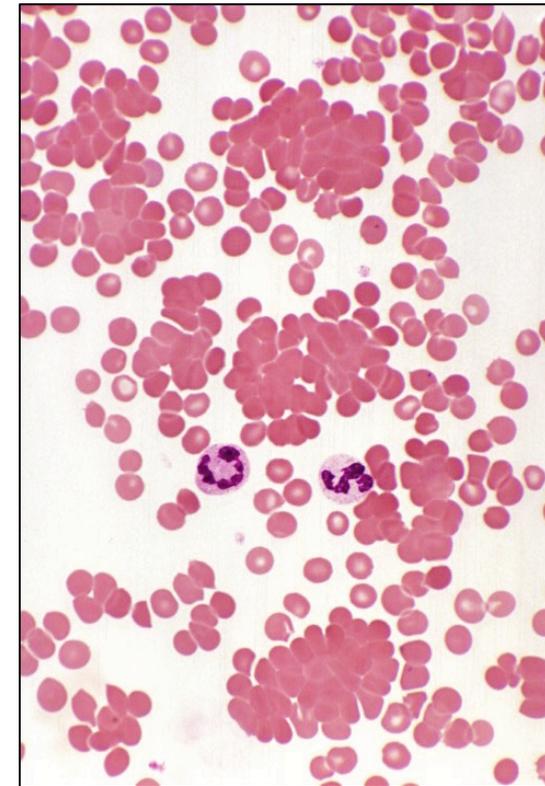
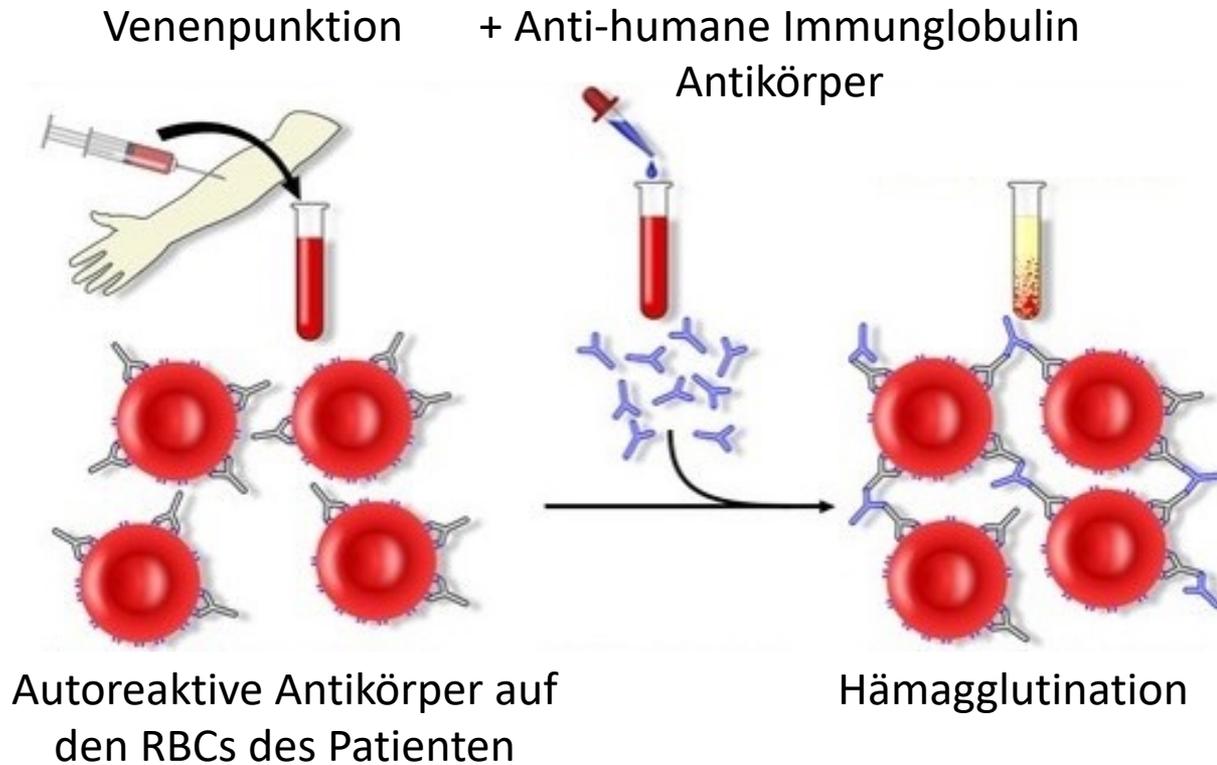
Schritte des Praktikums:

1. Sie können verschiedene Agglutinationskits auf den Tischen finden.
2. Es wurden keine Proben vorbereitet, also werden Sie nur die positiven und negativen Kontrollen testen.
3. Drücken sie das Gefäß mit den Kugeln um je einen Tropfen in die 2 Reaktionskreise zu geben. Fügen sie einen Tropfen der positiven Kontrolle in den einen und einen Tropfen der negative Kontrolle in den anderen Kreis hinzu. (wie in der Gebrauchsanweisung)
4. Vermischen sie die Kugeln und die Kontrollen indem Sie die Oberfläche der Karten mit Stäbchen reiben.
5. In der positive Kontrolle sollte es zu einer sichtbaren Verklumpung kommen.



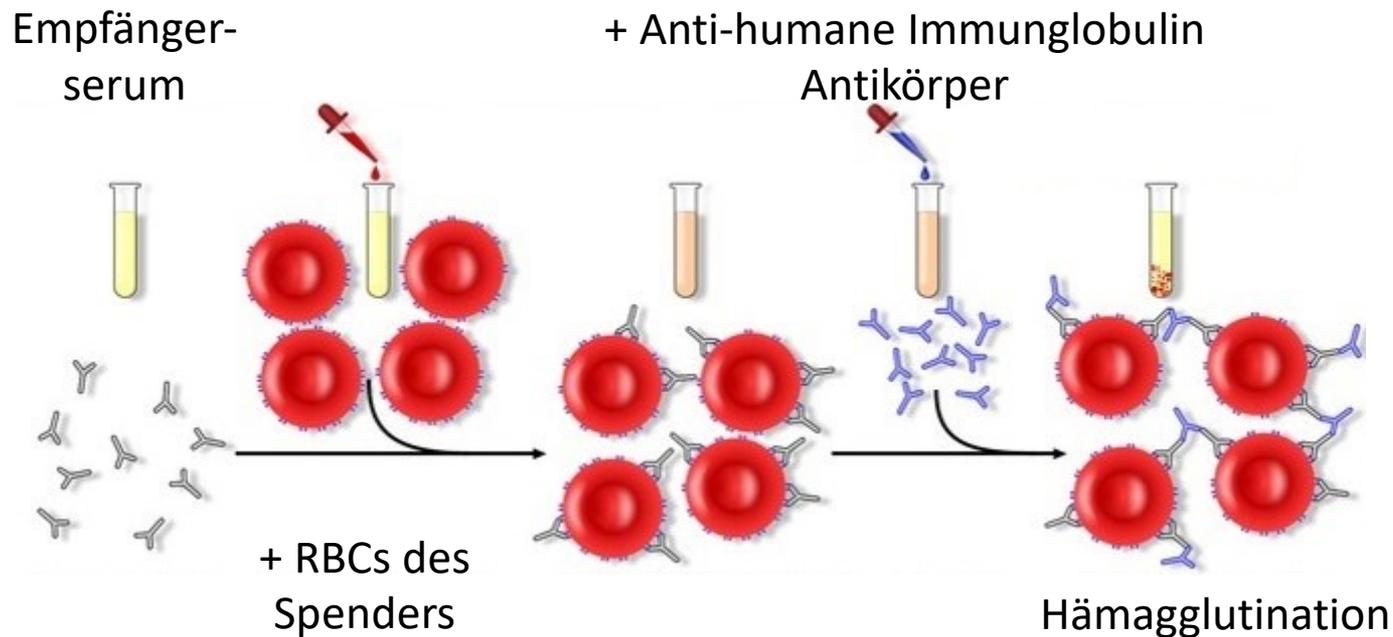
Handschuhe tragen!

Direkter Coombs Test (Direkter Antiglobulin Test^[21.])



- Anwendungen: Diagnostik der **Immun-medierten Hämolyse**,^[22.] z.B.:
- AIHA (Autoimmune Hämolytische Anämie, Anämia= RBC Zahl ↓)
 - Erythroblastosis Foetalis (Hämolytische Krankheit des Neugeborenen, HDN)
- In vivo Hämagglutination in einem Patient mit AIHA.

Indirekter Coombs Test (Indirekter Antiglobulin Test)

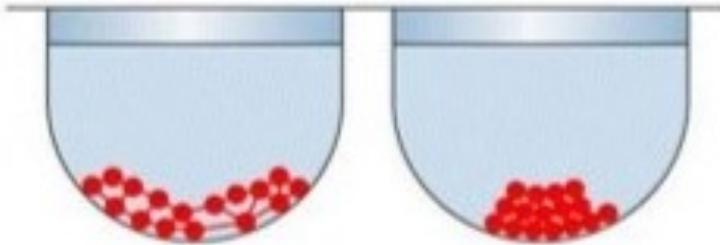
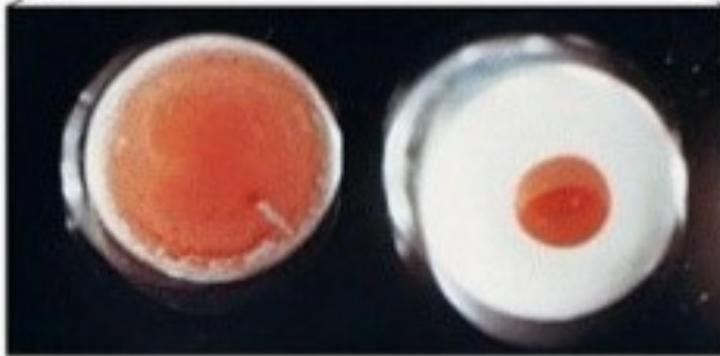


Anwendungen:

- Antikörper-screening vor einer **Bluttransfusion**.^[23.] (um Antikörper zu detektieren die mehrere seltene Blutgruppen außerhalb des ABO oder Rh Systems erkennen)
- Um **schwängere Frauen** auf anti-Rh(D) Antikörper zu **screenen**, die die Plazenta überqueren können und zu Erythroblastose führen. ^[24.]

Hämagglutinations assay

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Kontrolle

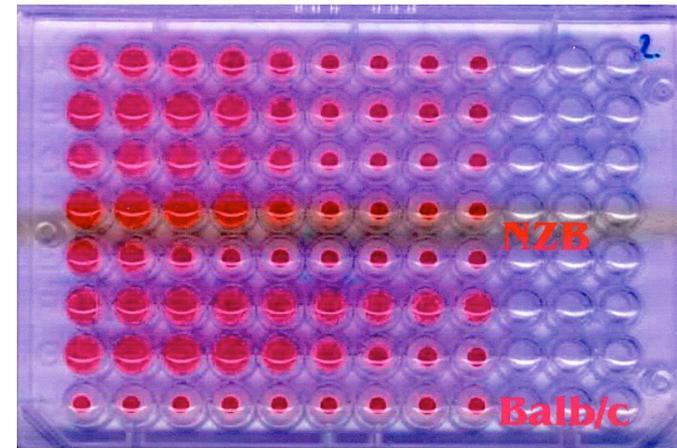


Hämagglutination

Negativ

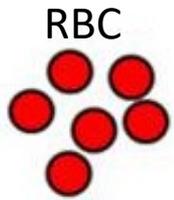
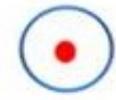
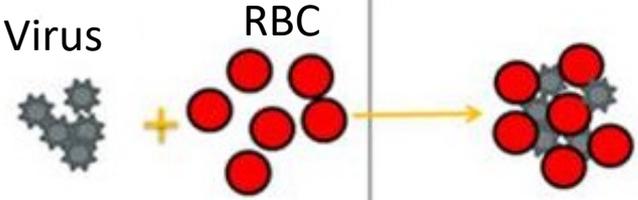
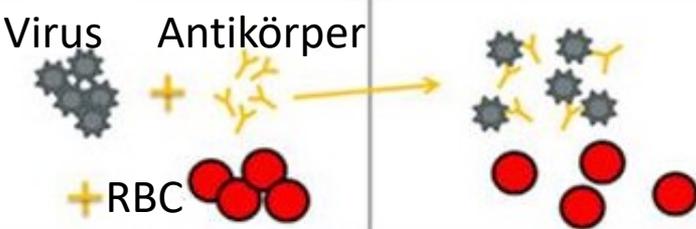
Gleiche Mengen von RBCs werden in jeden Schacht gegeben. 2-Fache verdünnungen der Probe werden dann erstellt und in die Schächte gegeben. ↓

Im Fall einer **positiven Reaktion** aggregieren die RBCs und können folglich nicht am Boden des Brunnens ruhen. (HA Titer: die kleinste Konzentration der Probe die noch Agglutination verursacht)



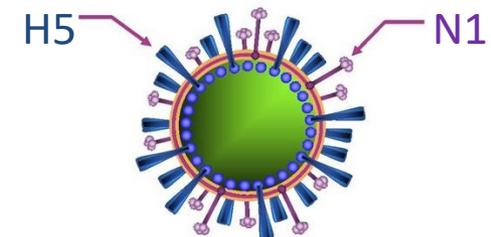
- NZB: Neu Seeland Black Mausspezies^[25.] (Maus Model der AIHA)
- BALB/c: Albino Gattung der Hausmaus (Kontrolle)

Hämagglutinations Inhibitions Assay

Komponenten	Reaktion	Ergebnis
RBC		Keine Reaktion 
Virus + RBC		Hämagglutination 
Virus + Antikörper + RBC		Keine Reaktion 

Einige Viren verfügen über Proteine die in vitro Hämagglutination verursachen können („Hämagglutinine“) z.B.:

- **Influenza Hämagglutinin**
- Masern Hämagglutinin
- Mumps Hämagglutinin



- Diese Methode kann genutzt werden um **Viren** auf basis ihrer **viralen Hämagglutinantigene zu klassifizieren.**^[26.] z.B.: H5N1 = Influenza Virus mit Typ 5 Hämagglutinin (und Typ 1 Neuraminidase).
- Kann auch genutzt werden um die Spiegel der Anti-Hämagglutinin Antikörper in Personen die Impfungen gegen solche Viren bekommen haben zu bestimmen.^[26.]

Quellen 1.

1. Akobeng AK¹: **Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values.** *Acta Paediatr.* 2007 Mar;96(3):338-41.
2. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF: **Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.** *Immunochemistry.* 1965 Sep;2(3):235-54.
3. Ouchterlony O: **In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria.** *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1948;25(1-2):186-91.
4. Tiselius A¹: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochem J.* 1937 Sep;31(9):1464-77.
5. Nobelprize.org: **The Nobel Prize in Chemistry 1948**
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/)
6. Jain S¹, Gautam V, Naseem S: **Acute-phase proteins: As diagnostic tool.** *J Pharm Bioallied Sci.* 2011 Jan;3(1):118-27. doi: 10.4103/0975-7406.76489.
7. O'Connell TX¹, Horita TJ, Kasravi B: **Understanding and interpreting serum protein electrophoresis.** *Am Fam Physician.* 2005 Jan 1;71(1):105-12.
8. Stoller JK¹, Aboussouan LS: **Alpha1-antitrypsin deficiency.** *Lancet.* 2005 Jun 25-Jul 1;365(9478):2225-36.
9. Link H¹, Huang YM: **Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness.** *J Neuroimmunol.* 2006 Nov;180(1-2):17-28. Epub 2006 Sep 1.
10. Marshall T¹, Williams KM: **Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria.** *Electrophoresis.* 1999 Jun;20(7):1307-24.

Quellen 2.

11. Csako G¹: **Immunoelectrophoresis: a method with many faces.** *Methods Mol Biol.* 2012;869:339-59. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_28.
12. Csako G¹: **Immunofixation electrophoresis for identification of proteins and specific antibodies.** *Methods Mol Biol.* 2012;869:147-71. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_13.
13. Rajkumar SV¹, Kyle RA¹: **Protein electrophoresis and immunofixation for the diagnosis of monoclonal gammopathies.** *JAMA.* 2014 Nov 26;312(20):2160-1. doi: 10.1001/jama.2014.8237.
14. Mali B¹, Armbruster D, Serediak E, Ottenbreit T: **Comparison of immunoturbidimetric and immunonephelometric assays for specific proteins.** *Clin Biochem.* 2009 Oct;42(15):1568-71. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.016. Epub 2009 Jun 26.
15. Cooper NR, Nemerow GR: **The role of antibody and complement in the control of viral infections.** *J Invest Dermatol.* 1984 Jul;83(1 Suppl):121s-127s.
16. Anuradha V¹, Chopra A: **In the era of nephelometry, latex agglutination is still good enough to detect rheumatoid factor.** *J Rheumatol.* 2005 Dec;32(12):2343-4.
17. Kodama T¹, Ichiyama S, Morishita Y, Fukatsu T, Shimokata K, Nakashima N: **Determination of anti-streptolysin O antibody titer by a new passive agglutination method using sensitized toraysphere particles.** *J Clin Microbiol.* 1997 Apr;35(4):839-42.
18. Komoriya T¹, Terashima Y, Ogawa M, Moriyama M, Kohno H: **Development of a high-sensitivity latex reagent for the detection of C-reactive protein.** *J Immunol Methods.* 2011 Oct 28;373(1-2):63-6. doi: 10.1016/j.jim.2011.08.001. Epub 2011 Aug 26.
19. Froehling DA¹, Elkin PL, Swensen SJ, Heit JA, Pankratz VS, Ryu JH: **Sensitivity and specificity of the semiquantitative latex agglutination D-dimer assay for the diagnosis of acute pulmonary embolism as defined by computed tomographic angiography.** *Mayo Clin Proc.* 2004 Feb;79(2):164-8.
20. Braunstein GD¹: **The long gestation of the modern home pregnancy test.** *Clin Chem.* 2014 Jan;60(1):18-21. doi: 10.1373/clinchem.2013.202655. Epub 2013 Sep 11.

Quellen 3.

21. Zantek ND¹, Koepsell SA, Tharp DR Jr, Cohn CS: **The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis.** *Am J Hematol.* 2012 Jul;87(7):707-9. doi: 10.1002/ajh.23218. Epub 2012 May 6.
22. Barcellini W¹: **Immune Hemolysis: Diagnosis and Treatment Recommendations.** *Semin Hematol.* 2015 Oct;52(4):304-12. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.05.001. Epub 2015 May 19.
23. British Committee for Standards in Haematology¹, Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, Jones J, Rowley M, Williams M, Win N: **Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology.** *Transfus Med.* 2013 Feb;23(1):3-35. doi: 10.1111/j.1365-3148.2012.01199.x. Epub 2012 Dec 6.
24. Abbey R¹, Dunsmoor-Su R: **Cost-benefit analysis of indirect antiglobulin screening in Rh(D)-negative women at 28 weeks of gestation.** *Obstet Gynecol.* 2014 May;123(5):938-45. doi: 10.1097/AOG.0000000000000224.
25. Yoshida S¹, Castles JJ, Gershwin ME: **The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice.** *Semin Arthritis Rheum.* 1990 Feb;19(4):224-42.
26. Pedersen JC¹: **Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus.** *Methods Mol Biol.* 2014;1161:11-25. doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_2.