

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ-ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ
«ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ» ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
Ν.Υ. ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ ΓΝ.ΝΙΚΑΙΑΣ «ΑΓΙΟΣ ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ»



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΑ Γ. ΦΛΕΣΙΟΠΟΥΛΟΥ

ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ MSc

«ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ»

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ»

Ιωάννα Γ. Φλεσιοπούλου

Νοσηλεύτρια MSC

Ακαδημαϊκό έτος 2020

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Υποβολή αιτήσεως στις 29/02/2016 με αρ. πρωτ. 1516018372 για ορισμό τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής σύμφωνα με το άρθρο 9 του Ν.3685/08 προκειμένου να εκπονηθεί διδακτορική διατριβή στην Ιατρική Σχολή.

Η Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής σχολής στη συνεδρίαση της στις 20/5/2016 συγκρότησε 3μελή Συμβουλευτική Επιτροπή ως κατωτέρω:

- 1. Επιβλέπων - ΒΑΛΣΑΜΗ ΣΕΡΕΝΑ (Επ. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)**
- 2. Μέλος - ΠΟΛΙΤΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ (Αν. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)**
- 3. Μέλος - ΤΣΑΝΤΕΣ ΑΡΓΥΡΙΟΣ (Αν. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)**

Η παραπάνω Επιτροπή με την 09/11/2016 δήλωσή της καθόρισε το θέμα της διδακτορικής διατριβής ως εξής:

«ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ»

Ημερομηνία κατάθεσης Α' Έκθεσης Προόδου: 3/5/2017 με αρ. πρωτ. 1617025338

Ημερομηνία κατάθεσης Β' Έκθεσης Προόδου: 18/4/2018 με αρ. πρωτ. 1718024632

Ημερομηνία κατάθεσης Γ' Έκθεσης Προόδου: 1//7/2019 με αρ. πρωτ. 1819036914

Η 7μελής Εξεταστική Επιτροπή ορίστηκε κατά τη συνεδρίαση της Συνέλευσης της Ιατρικής Σχολής, στις 25/6/2020 ως εξής:

- 1. Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος (Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)**
- 2. Πολίτου Μαριάννα (Αν. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)**
- 3. Τσαντές Αργύριος (Αν. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)**
- 4. Γιαλεράκη Αργυρή (Αν. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)**
- 5. Βαλσάμη Σερένα (Επ. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)**
- 6. Κοκόρη Στυλιανή (Επ. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.)**
- 7. Πιτταράς Θεόδωρος (Επ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)**

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής

Σφηκάκης Πέτρος

« Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα »
Οργανισμός του Πανεπιστημίου Αθηνών άρθρο 202, παρ. 2, Νόμος 5343/32

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: **ΦΛΕΣΙΟΠΟΥΛΟΥ**
ΟΝΟΜΑ: **ΙΩΑΝΝΑ**
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ: **ΓΕΩΡΓΙΟΣ**
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ: **ΑΝΤΩΝΙΑ**
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: **ΑΘΗΝΑ**
ΗΜ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ: **25/2/1967**

ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Πτυχιούχος Σχολής Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας Τ.Ε.Ι. Αθηνών του Τμήματος Νοσηλευτικής (1990).
- Χορήγηση άδειας εξασκήσεως επαγγέλματος (1990).
- Εξειδίκευση στον τομέα της Αιμοδοσίας και Ανοσοαιματολογίας στο Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας και Παρασκευής Παραγώγων Αίματος του Νοσοκομείου Π.Γ.Ν. Νίκαιας « Άγ. Παντελεήμων» (1990-1991).
- Κάτοχος Μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών Πρόγραμμα «Θρόμβωση-Αιμορραγία-Ιατρική των μεταγγίσεων» ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ-ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ (2015).

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗΣ

- Πιστοποίηση επιμόρφωσης (Ν. 3369/2005) εκπαιδευτικού προγράμματος «Εκπαίδευση Ενηλίκων στην απόκτηση δεξιοτήτων στις Νέες Τεχνολογίες»- ΗΡΩΝ. Το πρόγραμμα διάρκειας 50 ωρών πραγματοποιήθηκε από το Ινστιτούτο Διαρκούς Εκπαίδευσης Ενηλίκων της Γενικής Γραμματείας Εκπαίδευσης Ενηλίκων (Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων) από 08/12/2005- 25/02/2006.
- Πιστοποιητικό Εκπαίδευσης (No. Πιστοποιητικού TC 3487) με θέμα «Ανάλυση απαιτήσεων του προτύπου ISO 9001:2015, Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας του Κέντρου Αιμοδοσίας κατά ISO 9001:2015» από την Q-PLAN

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- Εκπαιδύτρια (θεωρητική και πρακτική διδασκαλία) στα επιδοτούμενα προγράμματα Ε.Ο.Κ-ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ Π.Γ.Ν.Π. (1992-1995)

- Συμμετοχή στα Επιμορφωτικά προγράμματα Κ.Ε.Κ. για την εκπαίδευση Νοσηλευτών, Τεχνολόγων, Επισκεπτών Υγείας στις νέες τεχνολογίες στον τομέα της Αιμοδοσίας – ανάπτυξη εθελοντικής αιμοδοσίας (1998-1999).
- Εκπαιδεύτρια στο ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΥΓΕΙΑ-ΠΡΟΝΟΙΑ» 2000-2006 ΑΞΟΝΑΣ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ 4 «ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΙ ΠΟΡΟΙ» στην Ενέργεια Συνεχιζόμενης Επαγγελματικής Κατάρτισης, «Ε-326 Αρχές Ασφαλούς Μετάγγισης».

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ **ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ**

- Υπεύθυνη Διαχείρισης Ποιότητας στο τμήμα της Αιμοδοσίας του Π.Γ.Ν. Νίκαιας « Άγ. Παντελεήμων» από τον Ιούνιο του 2015 για το ISO 9001: 2008 που κατέχει η Αιμοδοσία και στη συνέχεια Υ.Δ.Π. στην αναβάθμιση του ΣΔΠ (Συστήματος Διαχείρισης Ποιότητας) στις απαιτήσεις του ISO 9001: 2015.
- Μέλος της επιτροπής μεταγγίσεων του νοσοκομείου Π.Γ.Ν. Νίκαιας « Άγ. Παντελεήμων» από τις 17/12/2019 αρ. πρωτ.:60421.

ΧΩΡΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Εργάζομαι ως νοσηλεύτρια στο Νοσοκομείο Π.Γ.Ν. Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων» στο τμήμα Αιμοδοσίας από το 1990.

ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΗ ΟΜΙΛΗΤΡΙΑ

Ομιλήτρια στο Δορυφορικό Συμπόσιο «Ένα ταξίδι στα 20 χρόνια αυτοματοποίησης» με θέμα «Από τη χειροκίνητη μέθοδο στον αυτοματισμό». 10^ο Σεμινάριο Μεταγγισιοθεραπείας 7-8 Απριλίου 2017.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΛΗΡΩΝ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΩΝ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ **ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ**

Frequency Distribution of RHD Alleles Among Greek Donors With Weak D Phenotypes Demonstrates a Distinct Pattern in Central European Countries

T Koutsouri, A Chaikali, A Giannopoulos, P Douramani, I Flesiapoulou, P Panos, A Tsantes, K Zoi, A Gialeraki, S Valsami, K Stamoulis, M Politou. Haematology Laboratory-Blood Bank, National and Kapodistrian University of Athens, Aretaieion Hospital, Athens, Greece National Blood Center, E.K.E.A, Athens, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, IIBEAA Hematology Laboratory- Blood Bank, National and Kapodistrian University of Athens, Attiko Hospital, Athens, Greece Hematology Laboratory- Blood Bank, General Hospital of Peiraia- Nikaia, Athens, Greece Hematology Laboratory- Blood Bank, General

Hospital of Irakleio Venizeleio-Pananeio, Crete, Greece. *Transfus Med.* 2019 Dec;29(6):468-470.

Red Blood Cell Alloantibody Titration - Does the Titration Method Matter?

Ioanna Flesiopoulou, Abraham Pouliakis, Marianna Politou, Antonia Dourouki, Christos Damaskos, Theodora Koutsouri, Maria Papakonstantinou, Vasileios Soulakis, Argyrios Tsantes, Serena Valsami. Blood Transfusion Service, General Hospital of Nikaia Peiraia Agios Panteleimon Athens, Greece 2nd Department of Pathology, National and Kapodistrian University of Athens, "Attikon" University Hospital, Athens, Greece Hematology Laboratory-Blood Bank, Aretaieion Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece Biology Department National and Kapodistrian Athens, Athens, Greece Second Department of Propedeutic Surgery, "Laiko" General Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece Laboratory of Haematology & Blood Bank Unit, "Attikon" University Hospital, National and Kapodistrian Athens, Athens, Greece. *Clin. Lab.* 2020 Jun;66(6):1051-1058, DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.191021.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Automated transfusion service using column agglutination technology fully automated system (auto- vue)

V. Fakitsa, M. Papakonstantinou, K. Maltezis, E. Katsadorou, S. Giannoulea, G. Lyrakos, Ch. Antoniou, **I. Flesiopoulou**, E. Haliou, H. Desilla, K. Sofroniadou. General Hospital of Nikaia Pireus, Blood Transfusion Center. XVth Regional congress of the ISBT. Europe Athens Greece 2005. Παρουσιάστηκε η εργασία στο *Vox Sanguinis* 2005 Vol 89, Supplement 1, P-386, pp.189 (Αναρτημένη Ανακοίνωση).

Kell Blood Group System and rare blood donors

V. Fakitsa, P.Karida, S. Giannoulea, Ch. Antoniou, **I. Flesiopoulou**, E. Haliou, M. Papakonstantinou, H. Desilla, E. Katsadorou, G. Lyrakos, K. Sofroniadou. Blood Transfusion Center District General Hospital of Nikea, ATHENS, Greece. XVth Regional Congress of the ISBT, Europe Athens, Greece, July 2-6, 2005. *Vox Sang* Vol.89, Sup.I (Αναρτημένη Ανακοίνωση).

Blood Grouping Automation in a Blood Transfusion Center

V. Fakitsa, M. Papakonstantinou, A. Flangini, K. Maltezis, **I. Flesiopoulou**, G. Lyrakos, S. Giannoulea, H. Desylla, CH. Antoniou, P. Alexiou, T. Micha, E. Sotiropoulou, K. Sofroniadou,. International Society of Blood Transfusion (ISBT) XVIth Cape TOWN *Vox Sanguinis* 2006 Vol 91, Supplement 3, p.117-118 (Αναρτημένη Ανακοίνωση)

Anti-G - A Case Of An Underestimated Alloantibody In Pregnancy.

S. Valsami, M. Papakonstantinou, G. Papadopoulos, M. Dadakaridou, G. Kanavos, E. Desylla, **I. Flesiopoulou**, L. Foudoulaki-Paparizos. Blood Transfusion Service General Hospital of Nikea, Piraeus, *REA Obstetrics-Gynecology Hospital, Athens, Greece. AABB Annual Meeting. And CTTXPO, Denver, CO, October 12-15, 2013. *Transfusion* 2013, Volume 53, Supplement,p157A SP258 (Αναρτημένη Ανακοίνωση).

Genetic characterization of RhD in RhD negative blood donor samples tested positive with the NOVACLONE™ Anti-D IgM+IgG Monoclonal Blend in indirect assay on the Galileo NEO automated analyzer.

Koutsouri T., Zoulas D., Chaikali N., Maragkaki L., **Flesiopoulou I.**, Karapidaki I., Megalou A., Valsami S., Stamoulis K., Politou M.

Haematology Laboratory-Blood Bank, National and Kapodistrian University of Athens, Aretaieion Hospital Haematology Laboratory-Blood Bank, Evangelismos Hospital National Blood Center, E.K.E.A Haematology Laboratory-Blood Bank, General Hospital of Peiraia-Nikaia, Athens, Greece 29th Regional Congress of the ISBT, Basel, Switzerland, 22-26 June 2019. International Society of Blood Transfusion *Vox Sanguinis* (2019) 114 (Suppl. 1), 5–240. P-387 (Αναρτημένη Ανακοίνωση).

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ανίχνευση Αντισωμάτων του συστήματος ABO Νεογνών, με την πλήρη αυτοματοποιημένη μέθοδο (AUTO- VUE).

B. Φακίτσα, Χ. Βαβούλη, Ζ. Τσέφλικα, Κ. Σταμούλης, Σ. Γιαννουλέα, Γ. Λυράκος, Μ. Θεοδωράκη, Μ. Παπακωνσταντίνου, **I. Φλεσιοπούλου**, Κ. Σωφρονιάδου, Ι. Λαμπαδαρίδης. Κέντρο Αιμοδοσίας, Μονάδα Νεογνών Π.Γ.Ν.Νίκαιας. 3^ο Πειραϊκό Συνέδριο 13-16 Νοεμβρίου 2002 Αθήνα. *ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ*, Τόμος 25, τεύχος 1. Σελίδα 36 Νοέμβριος 2002.

2. Ανίχνευση αντισωμάτων του συστήματος ABO νεογνών στο σύγχρονο εργαστήριο ανοσοαιματολογίας.

B. Φακίτσα, Ζ. Τσέφλικα, Σ. Γιαννουλέα, Ε. Δεσύλλα, Γ. Λυράκος, Μ. Θεοδωράκη, Μ. Παπακωνσταντίνου, **I. Φλεσιοπούλου**, Μ. Ιωαννίδου, Κ. Σωφρονιάδου, Ι. Λαμπαδαρίδης. Κέντρο Αιμοδοσίας, Μονάδα Νεογνών Π.Γ.Ν. Νίκαιας 15^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό συνέδριο. 24–28 Νοεμβρίου 2004 Αθήνα. *Haema* 2004;7(suppl.1)pp.308.

3. Πλήρης αυτοματοποίηση στο εργαστήριο ανοσοαιματολογίας με τη χρήση πλήρως αυτοματοποιημένης μεθοδολογίας – AutoVue, σε αμφίδρομη σύνδεση με το πληροφοριακό σύστημα Gi – Blood. Εξαετής εμπειρία 1998 –2004.

B. Φακίτσα, Ε. Δεσύλλα, Λ. Πήχα, Μ. Παπακωνσταντίνου, Κ. Σταμούλης, Σ. Γιαννουλέα, Χ. Αντωνίου, Π. Αλεξίου, **I. Φλεσιοπούλου**, Γ. Λυράκος, Ε. Χαλιού, Κ. Σωφρονιάδου. Κέντρο Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας. 3^ο Πανελλήνιο συνέδριο Λουτράκι 14 – 26/10/2004. No P13.

4. Πρόγραμμα σπανίων δοτών αίματος.

Β. Φακίτσα, Σ. Βαλσάμη, Μ. Παπακωνσταντίνου, Γ. Λυράκος, Ι. Αθανασόπουλος, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Μ. Πανίδου, Π. Καρυδά, Ε. Δεσύλλα, Σ. Γιαννουλέα, Σ. Στεφανάκου. Κέντρο Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν.Νίκαιας. 18th Congress of the Hellenic society of hematology 14 – 17 November 2007 Thessaloniki. *Haema* Vol.10, Sup 1, No 135 pp 141.

5. Διαχείριση αίματος και οξεία καρδιακή ανεπάρκεια. Περιγραφή περίπτωσης παιδιατρικού ασθενούς.

Β. Φακίτσα, Σ. Βαλσάμη, Ε. Μελισσάρη, Μ. Παπακωνσταντίνου, Γ. Λυράκος, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Μ. Πανίδου, Γ. Αθανασόπουλος, Σ. Στεφανάκου, Γ. Σαρρής. Κέντρο Αιμοδοσίας Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας Πειραιώς, Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο. 18th Congress of the Hellenic Society of hematology 14 – 17 November 2007 Thessaloniki. *Haema*, Vol 10, Supplement 1, Περίληψη Νο142 (Αναρτημένη ανακοίνωση).

6. ANTI-G στην κύηση – αλλοαντίσωμα με κλινικές επιπτώσεις που υποδιαγιγνώσκεται.

Σ. Βαλσάμη, Γ. Παπαδόπουλος, Μ. Παπακωνσταντίνου, Μ. Δαδακαρίδου, Γ. Καναβός, Ε. Δεσύλλα, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Λ. Φουντουλάκη-Παπαρίζου. Ν.Υ. Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας «Ο Άγιος Παντελεήμων», Μαιευτική –Γυναικολογική Κλινική Μαιευτήριο ΡΕΑ. 24^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 14-16 Νοεμβρίου 2013, αρ 180 Τελικό Πρόγραμμα, σελ 87, CD Περίληψεων σελ 161 (Αναρτημένη ανακοίνωση)

7. Συγκριτική μελέτη μεθόδων αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων τιτλοποίησης.

Ι. Φλεσιοπούλου, Σ. Βαλσάμη, Μ. Παπακωνσταντίνου, Κ. Σταμούλης, Μ. Πολίτου, Γ. Παπαδόπουλος, Β. Γιαννοπούλου, Μ. Ιωαννίδου, Λ. Φουντουλάκη-Παπαρίζου. Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο, Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας 26^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 12-14 Νοεμβρίου 2015. *Haema* 2015;6 (suppl 1), No 84. (Αναρτημένη ανακοίνωση)

8. Μοριακή ταυτοποίηση ασθενών ποικιλιών του D D weak/D partial.

Θ. Κουτσούρη, Σ. Βαλσάμη, Μ. Παπακωνσταντίνου, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Β. Γιαννοπούλου, Ε. Δεσύλλα, Χ. Αντωνίου, Ι. Τσολάκης, Σ. Κωτσαντή, Λ. Φουντουλάκη-Παπαρίζου, Μ. Πολίτου. Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο, Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας 26^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 12-14 Νοεμβρίου 2015. *Haema* 2015;6 (suppl 1), No 61 (Προφορική ανακοίνωση)

9. Μπορεί η μέθοδος γέλης να αντικαταστήσει την κλασική μέθοδο σωληναρίου στην τιτλοποίηση αντιερυθροκυτταρικών αλλοαντισωμάτων;

Σ. Βαλσάμη, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Κ. Σταμούλης, Μ. Πολίτου, Ι. Λογγινήδης, Π. Στασινοπούλου, Μ. Παπακωνσταντίνου. Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο, Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας. Καβάλα 13-15 Μαΐου 2016. Περίληψη EP 01, pp 60. (Αναρτημένη ανακοίνωση)

10. Ασυμβατότητα από περίσσεια αυτοαντισώματος με ειδικότητα αντι-e. Ο ρόλος της κορτιζόνης.

Μ. Παπακωνσταντίνου, Θ. Κουτσούρη, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Ε. Δεσύλλα, Κ. Ζερβάκης, Μ. Ιωαννίδου, Ι. Ασημακόπουλος, Π. Στασινοπούλου, Κ. Τουμανίδη, Ε. Κοντογιάννη, Λ. Χαλιού, Π. Σιουρούνης. Περιγραφή περίπτωσης. Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο, Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας. Καβάλα 13-15 Μαΐου 2016. Περίληψη EP 02, pp 61. (Αναρτημένη ανακοίνωση)

11. Ανοσοαιματολογική διερεύνηση περιπτώσεων με θετική άμεση coombs-ταυτοποίηση αυτοαντισώματος.

Μ. Παπακωνσταντίνου, Γ. Παπαδόπουλος, Θ. Κουτσούρη, Μ. Ιωαννίδου, Ε. Δεσύλλα, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Ε. Κουφόγιωργα, Δ. Βλαχοπάνου, Κ. Χασανάκου, Ν. Παναγιωτοπούλου, Π. Σιουρούνης. Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας, Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο, 28^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2-4 Νοεμβρίου 2017 Αθήνα. *Haema* 2017;8 (Suppl 1), περίληψη 148 pp 153. (Αναρτημένη ανακοίνωση)

12. Περίπτωση με μη αναμενόμενες θετικές Αντιδράσεις στη διασταύρωση συμπηκνωμένων Ερυθρών (ΣΕ).

Μ. Παπακωνσταντίνου, Σ. Τσαγκιά, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Μ. Ιωαννίδου, Δ. Βλαχοπάνου, Ε. Δεσύλλα, Ε. Κοντογιάννη, Φ. Καραουλάνη, Ε. Κουφόγιωργα, Α. Μιχαλάκου, Α. Βεργάκη, Σ. Βαλσάμη., Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Της Ελληνικής Εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας Ιωάννινα 19-22 Απριλίου 2018. Τελικό πρόγραμμα και βιβλίο περιλήψεων, EP03, σελ 61 (Αναρτημένη ανακοίνωση)

13. Μελέτη θετικότητας της άμεσης coombs σε Νεογνά με ABO και RhD ασυμβατότητα σε Διάρκεια ενός έτους.

Μ. Παπακωνσταντίνου, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Σ. Τσαγκιά, Δ. Βλαχοπάνου, Ρ. Σώκου, Χ. Αντωνίου, Ι. Τσολάκης, Ε. Κουφόγιωργα, Ε. Δεσύλλα, Φ. Καραουλάνη, Π. Στασινοπούλου, Σ. Βαλσάμη. Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας, Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο, 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Της Ελληνικής Εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας Ιωάννινα 19-22 Απριλίου 2018. Τελικό πρόγραμμα και βιβλίο περιλήψεων, EP04, σελ 61 (Αναρτημένη ανακοίνωση)

14. Μοριακή τυποποίηση RhD σε RhD αρνητικά δείγματα αιμοδοτών με θετική δοκιμασία Du με Novaclone anti-D IGM + IGG στον αυτόματο αναλυτή GALILEO NEO.

Θ. Κουτσούρη, Δ. Ζούλας, Ν. Χαϊκάλη, Λ. Μαραγκάκη, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Γ. Μαυράκη, Α. Μεγάλου, Σ. Βαλσάμη, Κ. Σταμούλης, Μ. Πολίτου. Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Αρεταίειο, Ν.Υ Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας, Ν.Υ. Αιμοδοσίας-Αιματολογικό Εργαστήριο Ευαγγελισμός, Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας Ε.Κ.Ε.Α. 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας 5-7 Απριλίου 2019. Τελικό πρόγραμμα και βιβλίο περιλήψεων EA05 σελ 65-66 (Προφορική ανακοίνωση)

15. Περίπτωση ευαισθητοποίησης εγκύου με αντι-Μ αντίσωμα.

Μ. Παπακωνσταντίνου, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Σ. Τσαγκιά, Θ. Καραουλάνη, Ε. Δεσύλλα Ε. Κουφόγιωργα, Α. Βεργάκη, Δ. Βλαχοπάνου, Χ. Γκότση, Β. Κρητικός, Π. Στασινοπούλου, Β. Σουλάκης. Ν.Υ. Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας. 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας 5-7 Απριλίου 2019. Τελικό πρόγραμμα και βιβλίο περιλήψεων ΕΑ23 σελ 78-79 (Προφορική ανακοίνωση)

16. Αναφορά περιπτώσεων με πρόβλημα στον προσδιορισμό της ομάδας αίματος ΑΒΟ στην ανάστροφη.

Μ. Παπακωνσταντίνου, Σ. Τσαγκιά, **Ι. Φλεσιοπούλου**, Α. Βεργάκη, Α. Κυριακάκη, Ε. Δεσύλλα, Χ. Αντωνίου, Ι. Τσολάκης, Β. Σουλάκης. Ν.Υ. Αιμοδοσίας Π.Γ.Ν. Νίκαιας 30^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 7-10 Νοεμβρίου 2019. *Haema* 2019;10 (suppl.1) περίληψη 135 σε 498-499 (Αναρτημένη ανακοίνωση)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ (ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ) ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. VII European Congress of the International Society of Blood Transfusion Paris, July 15 – 18, 2001
2. 7th Congress of the European Hematology. Association held in Florence, Italy, June 6 – 9, 2002
3. The annual meeting & TXPO of the American association of Blood banks.1 – 4 November 2003 San Diego (AABB USA)
4. 9th Congress of the European Hematology Association, 10 – 13 June 2004, Switzerland
5. XVIIth Regional Congress of the ISBT International Society of Blood Transfusion June 23 – 27 2007, Madrid, Spain.
6. 21o Regional Congress of the ISBT Lisbon, Portugal June 18-22/2011
7. The annual meeting and CTTXP Denver C.O October 12-15 2013

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ (ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ) ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS 8 – 10 Μαρτίου 1991
2. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS & σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων 6 – 9 Φεβρουαρίου 1992
3. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS & σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων 4 – 7 Φεβρουαρίου 1993
4. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS 5 – 7 Νοεμβρίου 1993
5. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS & σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων 10 – 13 Φεβρουαρίου 1994

6. 8^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 6 – 9 Νοεμβρίου 1997
7. 8th International Conference on Thalassemia and the Hemoglobinopathies held in Athens, Greece, on October 18 – 21, 2001
8. 12^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 22 – 25 Νοεμβρίου 2001
9. 3^ο Πειραικό Ιατρικό Συνέδριο, 13 – 16 Νοεμβρίου 2002
10. 15^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 24 – 28 Νοεμβρίου 2004, Αθήνα
11. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο μεταγγισιοθεραπείας 19 – 21 Μαΐου 2006, Χανιά
12. 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Θεσσαλονίκη 17 Νοεμβρίου 2007
13. 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Αθήνα 22 Νοεμβρίου 2008.
14. 20^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Ηράκλειο, 7 Νοεμβρίου, 2009
15. 23^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS 25-27/11/2011
16. 26^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 12-14 Νοεμβρίου 2015
17. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας. Καβάλα 13-15 Μαΐου 2016
18. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας. Καβάλα 13-15 Μαΐου 2016
19. 28^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2-4 Νοεμβρίου 2017 Αθήνα
20. 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρεία Μεταγγισιοθεραπείας Ιωάννινα 19-22 Απριλίου 2018.
21. 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας 5-7 Απριλίου 2019

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η τιτλοποίηση των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων είναι μια ημι-ποσοτική μέθοδος για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης αντισωμάτων και θεωρείται χρήσιμο μέσο εκτίμησης της αλλοανοσοποίησης της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για το χρονικό προσδιορισμό της αξιολόγησης της εμβρυϊκής αναιμίας με μη ορολογικά μέσα. Επίσης η τιτλοποίηση των ABO ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων είναι μια μέθοδος που έχει καθιερωθεί και γίνεται σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης ABO ασύμβατων συμπαγών οργάνων και αιμοποιητικών κυττάρων.

Παραδοσιακά, η τιτλοποίηση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την κλασική μέθοδο σωληναρίου (Conventional Tube Test- CTT). Η μέθοδος που βασίζεται στη συγκόλληση με χρήση καρτών γέλης (micro column agglutination based method - GMA) έχει αποδειχθεί αξιόπιστη για πολλές δοκιμασίες στην ανοσοαιματολογία.

Διεξήχθη μελέτη τιτλοποίησης αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων με σκοπό τη σύγκριση της κλασικής μεθόδου σωληναρίου (CTT) με τη δοκιμασία συγκόλλησης με κάρτες γέλης δύο διαφορετικών εμπορικών διαθέσιμων συστημάτων ID-DiaMed-GmbH, Cressier, Switzerland (GMA1) και επίσης με κάρτες γέλης DG Gel Coombs Diagnostic Grifols, Passeig Fluvial, Spain (GMA2) σε έγκυες γυναίκες και ασθενείς.

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου Αρεταίειο και του Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Νίκαιας, Πειραιά.

Με την ολοκλήρωση της διατριβής μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στη διεκπεραίωσή της.

Κατά κύριο λόγο οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα Επικ. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α. κα Σερένα Βαλσάμη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διατριβή μου στο συγκεκριμένο επιστημονικό αντικείμενο. Την ευχαριστώ επίσης για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ τον κο Πουλιάκη Αβραάμ Στατιστικολόγο για το χρόνο που διέθεσε και φρόντισε με μεγάλη ακρίβεια τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Επίσης θα ήθελα να τιμήσω την αείμνηστη Λεοντίνη Φουντουλάκη τέως Διευθύντρια του Π.Γ.Ν. Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων». Η προτροπή της να ασχοληθώ με τη συγκεκριμένη μελέτη ήταν καθοριστική για την εκπόνηση της διατριβής.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου, το σύζυγό μου και τα παιδιά μου για τη βοήθεια και τη συμπαράστασή τους και ιδιαίτερα την κόρη μου Αντωνία Δουρούκη για τη βοήθειά της στη σύνταξη και διόρθωση αυτού του συγγράμματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ABOi =	ABO incompatible
ADCC =	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AHTRs =	Acute haemolytic transfusion reactions
BCSH=	British Committee for Standards in Haematology
CLT =	Chemiluminescence test
CTT =	Conventional tube test
DAT =	Direct Antiglobulin test
DHTRs =	Delayed haemolytic transfusion reactions
DTT =	Dithiothreitol
EAAM =	Επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση από μετάγγιση
FDA=	Food and Drug Administration
FMH =	Fetomaternal hemorrhage
GMA =	Gel microcolumn agglutination
HDFN =	Haemolytic disease of the fetus and newborn
HLA =	Human Leukocyte Antigen
HSCT =	Hematopoietic stem cell transplantation
HTLA =	High titer- low avidity
HTRs =	Haemolytic transfusion reactions
IAT =	Indirect Antiglobulin Test
KΜΣ =	Κλασική μέθοδος σωληναρίου
LISS =	Low Ionic Strength Solution
MCA-PSV =	Middle cerebral arteria-peak systolic velocity
MMA =	Monocyte monolayer assay
PBS =	Phosphate buffered saline
PCR=	Polymerase Chain Reaction
RBC =	Red blood cells
Rh DIG =	Rh immune globulin
SDPs =	Single donor platelets
SNPs=	Single Nucleotide Polymorphisms
VS =	Versus
ΔΕΣ =	Δικτυοενδοθηλιακό σύστημα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα παράγονται μετά από ευαισθητοποίηση έναντι των αντίστοιχων ερυθροκυτταρικών αντιγόνων συνήθως μέσω μετάγγισης ή κύησης. Η τιτλοποίηση των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων είναι μια ημι- ποσοτική μέθοδος για την αξιολόγηση της συγκέντρωσής τους και θεωρείται χρήσιμο μέσο εκτίμησης της αλλοανοσοποίησης της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Παραδοσιακά, η τιτλοποίηση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την κλασική μέθοδο σωληναρίου (Conventional Tube Test- CTT). Η μέθοδος που βασίζεται στη συγκόλληση με χρήση καρτών γέλης (micro column agglutination based method - GMA) έχει αποδειχθεί αξιόπιστη για πολλές δοκιμασίες στην ανοσοαιματολογία. Η μελέτη μας συνέκρινε τις μεθόδους CTT και GMA από δύο διαφορετικούς κατασκευαστές για τιτλοποίηση ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων.

Αξιολογήθηκαν δείγματα ορού με κλινικά σημαντικά ερυθροκυτταρικά αλλοαντισώματα. Κάθε δείγμα τιτλοποιήθηκε συγχρόνως με κλασική μέθοδο CTT, κάρτες γέλης ID-DiaMed-GmbH, Cressier, Switzerland (GMA1) και επίσης με κάρτες γέλης DG Gel Coombs Diagnostic Grifols, Passeig Fluvial, Spain (GMA2).

Πραγματοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν 137 (εκατόν τριάντα επτά) τιτλοποιήσεις που αφορούσαν 50 αντισώματα αντι-D, 25 αντί-Kell, 10 anti-E, 9 anti-Jka, 8 anti-c, 5 αντι-Cw, 5 αντι-Fya, 7 αντι-M, 6 αντι-Kpa, 3 anti-Lua, 1 αντι-e, 3 αντι-G και 2 αντι-Cha. Τα δείγματα που ελέγχθηκαν με CTT σε σύγκριση με GMA1 και GMA2 εμφάνισαν στις περισσότερες περιπτώσεις ίσους ή υψηλότερους τίτλους με τη μέθοδο γέλης και των δύο κατασκευαστών. Στην σύγκριση τόσο CTT με GMA1 όσο και CTT με GMA2 υπήρξε καλή συμφωνία των αποτελεσμάτων ($W = 0.91$, $p < 0.0001$ και $W = 0.92$, $p < 0.0001$ αντίστοιχα). Για όλες τις ειδικότητες αντισωμάτων η μέση απόλυτη διαφορά κυμάνθηκε από 1 έως 3 τίτλους για αμφότερες τις μεθόδους γέλης (GMA1 και GMA2) έναντι της κλασικής μεθόδου CTT. Τα αποτελέσματα της τιτλοποίησης GMA1 σε σύγκριση με της GMA2 συμφωνούσαν σχεδόν απόλυτα ($W = 0.95$, $p < 0.0001$).

Συμπερασματικά παρόλο που η μέθοδος γέλης GMA και από τους δύο διαφορετικούς κατασκευαστές βρέθηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την κλασική μέθοδο CTT στην τιτλοποίηση αλλοαντισωμάτων, οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές και η συμφωνία μεταξύ όλων των μεθόδων ήταν πολύ καλή, υποδεικνύοντας ενδεχομένως την σύγχρονη

μέθοδο γέλης GMA (με αποδεδειγμένη υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, επαναληψιμότητα και δυνατότητα αυτοματοποίησης) ως κατάλληλη εναλλακτική που θα μπορούσε να αντικαταστήσει την κλασική μέθοδο σωληναρίου CTT σε τιτλοποιήσεις αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων.

ABSTRACT

Red blood cell (RBC) alloantibody titration is a quasi-quantitative method to assess antibody concentration and is considered a useful means of estimating maternal alloimmunization during pregnancy. Traditionally titration is performed using conventional tube test (CTT). Gel microcolumn agglutination based method (GMA) has been proven reliable for many immunohematology tests. Our study compared CTT with GMA of two different commercial available GMA systems for RBC alloantibody titration.

Serum samples with significant RBC-alloantibodies, were evaluated in our study. Each sample was titrated concurrently with CTT, with ID-DiaMed-GmbH, Cressier, Switzerland (GMA1) and with DG Gel Coombs Diagnostic Grifols, Passeig Fluvial, Spain (GMA2).

One hundred thirty seven titrations tests concerning 50 anti-D, 25 anti-Kell, 10 anti-E, 9 anti-Jka, 8 anti-c, 5 anti-Cw, 5 anti-Fya, 7 anti-M, 6 anti-Kpa, 3 anti-Lua, 1 anti-e, 3 anti-G, and 2 anti-Cha were performed and evaluated. Samples tested by CTT versus GMA1 and GMA2 generated mostly equal or higher titers by GMAs. The results of both comparisons were in good agreement ($W=0.91$, $p<0.0001$, and $W=0.92$, $p<0.0001$ respectively). For all antibodies specificities the mean absolute difference in titers ranged from 1-3 for both GMA1 and GMA2 versus CTT. Samples tested by GMA1 vs GMA2 were in almost perfect agreement ($W=0.95$, $p<0.0001$).

Conclusion: Although both GMAs were found slightly more sensitive than CTT for alloantibody titration, the differences were not significant and the agreement between all methods was very good, possibly indicating GMA as a suitable alternative to CTT in RBC antibody titration.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	13

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	23
1. ΣΥΣΤΗΜΑ ABO.....	24
2. ΣΥΣΤΗΜΑ RHESUS.....	30
3. ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	40
I. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ KELL.....	40
II. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ DUFFY.....	42
III. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ KIDD.....	45
IV. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ MNS.....	47
V. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LUTHERAN.....	49
VI. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CHIDO.....	50
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ - ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	54
1. ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ ΚΑΙ γ – ΣΦΑΙΡΙΝΕΣ.....	55
2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ.....	56
3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΛΛΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	56
3.α. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ.....	59
3.β. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ.....	60
3.γ. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	61
3.δ. ΕΠΙΒΡΑΔΥΝΟΜΕΝΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ.....	61
4. ΔΟΜΗ & ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	62
ΠΡΟΜΕΤΑΓΓΙΣΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ.....	64
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	65
ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	69
Α. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ.....	69
Β. ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ.....	69
ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΟΥ.....	77
1. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΥΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ HDFN.....	78
2. HDFN – ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ABO/RHESUS.....	80
ΑΝΟΣΟΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ.....	87
1. ΕΞΕΤΑΣΗ RhD ΕΓΚΥΟΥ.....	88
2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΤΕΡΑ.....	89
3. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ.....	90
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ.....	92
1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ.....	92

2. ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ.....	94
3. ΚΡΙΣΙΜΟΙ ΤΙΤΛΟΙ.....	98
I. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ Rhesus.....	98
II. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ RHDIG ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	100
III. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΛΛΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ.....	101
4. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΛΑΙΟΥ & ΝΕΟΥ ΘΕΤΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ.....	105
5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	106
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΟ ΝΕΟΓΝΟ.....	108
1. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ.....	109
2. ΙΚΤΕΡΙΚΟ ΝΕΟΓΝΟ/ΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΑ ΜΗΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	111
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΤΟΚΕΤΟ.....	112
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΤΙ-D ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	112

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	119
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	119
ΘΕΜΑΤΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	120
A. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ Ag-Ab ΣΤΗΝ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ.....	120
I. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΡΗ.....	120
II. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΜΕ LISS.....	120
III. ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ.....	121
IV. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΖΥΜΟ.....	122
V. ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ.....	123
VI. ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ.....	123
VII. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ.....	123
B. ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.....	126
Γ. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ.....	126
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	128
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	129
1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ & ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ RBC.....	129
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	130
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	132
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	134
1. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ.....	134
2. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ Β' ΟΜΟΖΥΓΗ Μ.Α.....	138
3. ΛΟΙΠΕΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	141
4. ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΕΩΝ.....	145
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	153
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	158
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	159

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Συχνότητα των αντιγόνων & φαινοτύπων ABO στον πληθυσμό.....	28
Πίνακας 2. Η συχνότητα των κοινών γονότυπων Rh.....	38
Πίνακας 3. Συχνότητα των αντιγόνων & φαινοτύπων Kell στον πληθυσμό.....	41
Πίνακας 4. Συχνότητα αντιγόνων & φαινοτύπων Duffy στον πληθυσμό.....	44
Πίνακας 5. Συχνότητα των Kidd αντιγόνων & φαινοτύπων στον πληθυσμό.....	46
Πίνακας 6. Συχνότητα των αντιγόνων & φαινοτύπων MNSs U στον πληθυσμό.....	48
Πίνακας 7. Συχνότητα των αντιγόνων Lutheran στον πληθυσμό.....	50
Πίνακας 8. Αναστολή του αντι-Cha με τη μέθοδο τιτλοποίησης.....	52
Πίνακας 9. Δοκιμασία ανίχνευσης αντισωμάτων (Screen).....	66
Πίνακας 10. Ταυτοποίηση αντισώματος (panel).....	67
Πίνακας 11. Διαχωρισμός των IgM αντισωμάτων από τα IgG αντισώματα.....	73
Πίνακας 12. Συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας των αντισωμάτων αντι-D και των υποκατηγοριών IgG με τη σοβαρότητα της αιμολυτικής νόσου του εμβρύου και του νεογνού.....	92
Πίνακας 13. Σύγκριση GMA1, GMA2 & CTT (KMΣ) με τη μέθοδο kappa και Kendall.....	132
Πίνακας 14. Τιτλοποιήσεις που αφορούν κύηση.....	137
Πίνακας 15. Τιτλοποιήσεις σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με β ομόζυγη μεσογειακή αναιμία.....	139
Πίνακας 16. Τιτλοποιήσεις σε παθολογικούς και χειρουργικούς ασθενείς.....	142
Πίνακας 17. Οι υψηλότεροι τίτλοι που παρατηρήθηκαν για κάθε αντίσωμα και με τις τρεις μεθόδους στο σύνολο της μελέτης.....	144
Πίνακας 18. Η κατανομή των ασθενών σε σχέση με το ιστορικό τους.....	147
Πίνακας 19. Κατανομή των ασθενών ανάλογα με τον τύπο αλλοανοσοποίησης.....	148
Πίνακας 20α. Τιτλοποίηση αντισώματος με CTT vs GMA1 (Diamed).....	149

Πίνακας 20β. Συσχέτιση αποτελεσμάτων με CTT vs GMA1 (Diamed) με βάση την ειδικότητα αντισώματος.....	150
Πίνακας 21α. Τιτλοποίηση αντισώματος με CTT vs GMA2 (Grifols).....	150
Πίνακας 21β. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων με CTT vs GMA2 (Grifols) με βάση την ειδικότητα αντισώματος.....	151
Πίνακας 22α. Τιτλοποίηση αντισώματος με GMA1 (Diamed) vs GMA2 (Grifols).....	152
Πίνακας 22β. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων GMA1 (Diamed) vs GMA2 (Grifols) με βάση την ειδικότητα αντισώματος.....	152

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΩΝ

Γράφημα 1: Αντισώματα εγκύων γυναικών.....	134
Γράφημα 2: Αντισώματα πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με β ομόζυγη μεσογειακή αναιμία.....	139
Γράφημα 3: Αντισώματα παθολογικών και χειρουργικών ασθενών.....	141
Γράφημα 4: Κατανομή της μεθόδου GMA1 με βάση το ιατρικό ιστορικό.....	145
Γράφημα 5: Κατανομή της μεθόδου GMA2 με βάση το ιατρικό ιστορικό.....	146
Γράφημα 6: Κατανομή της μεθόδου CTT με βάση το ιατρικό ιστορικό.....	146
Γράφημα 7: Κατανομή των ειδικοτήτων των αντισωμάτων (συνολικά).....	148

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

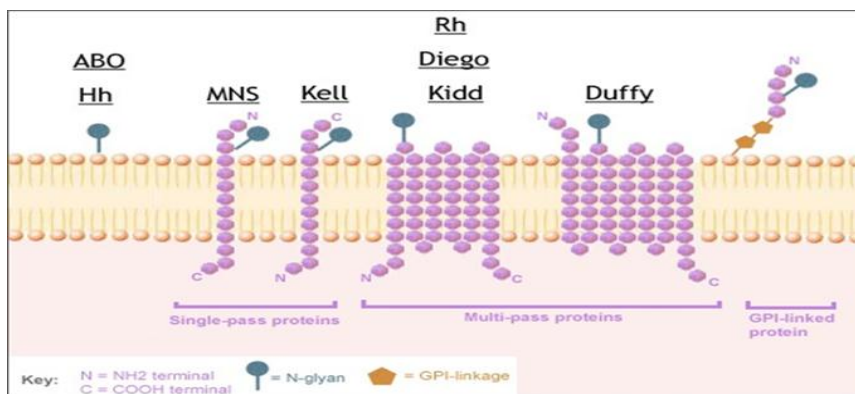
Εικόνα 1. Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μερικά από τα αντιγόνα της ομάδας αίματος που συνδέονται με αυτήν.....	23
Εικόνα 2. Αλγόριθμος ανίχνευσης αντισωμάτων κατά την εγκυμοσύνη.....	95
Εικόνα 3. Αλγόριθμος διαχείρισης εγκυμοσύνης από αντι-D, αντι-K ή αντι-c αλλοανοσοποίηση.....	96
Εικόνα 4. Διαχείριση της εγκυμοσύνης όταν έχει ανιχνευθεί αντι-D στο πλάσμα εγκύου για πρώτη φορά μετά από μια δόση αντι-D Ig.....	116
Εικόνα 5. Τα αντισώματα έναντι της ανθρώπινης σφαιρίνης σχηματίζουν γέφυρα μεταξύ γειτονικών ευαισθητοποιημένων ερυθροκυττάρων με ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη (Ig) G ή τα συστατικά του συμπληρώματος.....	122
Εικόνα 6. Βαθμολόγηση αντιδράσεων συγκόλλησης με κλασική μέθοδο σωληναρίου.....	124
Εικόνα 7. Μικροσωληνίσκοι γέλης AHG (θετική και αρνητική αντίδραση).....	124
Εικόνα 8. Εμφάνιση προτύπων αντίδρασης και βαθμολόγηση για τεχνική συγκόλλησης γέλης ή στήλης.....	125
Εικόνα 9. Ερμηνεία των αντιδράσεων αιμοσυγκόλλησης.....	125

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η ύπαρξη ορισμένων αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθορίζει τις διάφορες ομάδες αίματος. Η έκφραση των αντιγόνων αυτών είναι γενετικά καθορισμένη και επομένως κληρονομείται. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 300 διαφορετικά αντιγόνα στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, από αυτά λιγότερα από 50 είναι γνωστό πως είναι πολυμορφικά αλλά λιγότερα είναι αυτά που μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή αντισωμάτων που έχουν κλινική σημασία [1,2].

Οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για αυτούς τους πολυμορφισμούς είναι ποικίλοι, αν και η πλειοψηφία αντιπροσωπεύει πολυμορφισμούς απλού νουκλεοτιδίου (SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms) που κωδικοποιούν υποκαταστάσεις αμινοξέων. Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: διαγραφή γονιδίου, απλή διαγραφή νουκλεοτιδίων και διαδοχικό διπλασιασμό, οι οποίοι εισάγουν μετατοπίσεις πλαισίου ανάγνωσης, παρανοηματική μετάλλαξη (nonsense mutation), διαγονιδιακό ανασυνδυασμό μεταξύ στενά συνδεδεμένων γονιδίων δημιουργώντας υβριδικά γονίδια και υβριδικές πρωτεΐνες, και ένα SNP στην περιοχή του εκκινητή ενός γονιδίου ομάδας αίματος [3,4]. Σπουδαιότερα από κλινική άποψη είναι αυτά που ανήκουν σε δύο αντιγονικά συστήματα, το σύστημα ABO και το σύστημα Rhesus από τα οποία έχουν λάβει την ονομασία τους και οι ομάδες αίματος στον άνθρωπο.



Εικόνα 1. Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μερικά από τα αντιγόνα της ομάδας αίματος που συνδέονται με αυτήν. Εκτός από τα αντιγόνα σακχάρου (γλυκάνης ή υδατανθράκων), η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων περιέχει τρεις τύπους πρωτεϊνών που φέρουν αντιγόνα ομάδας αίματος: πρωτεΐνες μονής διέλευσης, πρωτεΐνες πολλαπλής διέλευσης και πρωτεΐνες συνδεδεμένες με γλυκοσυλοφωσφατιδυλοσινοτόλη (GPI).

L.Dean. Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane. Blood Groups and Red Cell Antigens 2005(2)

1. ΣΥΣΤΗΜΑ ABO

Το σύστημα ABO είναι το πρώτο που ανακαλύφθηκε το 1900 από τον Landsteiner, και παραμένει το σπουδαιότερο για τη μεταγγισιοθεραπεία. Το σύστημα ABO αποτελείται από τα A και B αντιγόνα στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και από τα φυσικά αντισώματα στον ορό έναντι αυτών των αντιγόνων. Σύμφωνα με αυτό, τα άτομα κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες ομάδων αίματος A, B, AB και O. Η γονιδιακή περιοχή που είναι υπεύθυνη για την έκφραση των αντιγόνων ABO εδράζει στο χρωμόσωμα 9 στο 9q34.1-q34.2 [5,6]. Περιέχει 7 εξόνια που καλύπτουν περισσότερα από 18 kb γονιδιωματικού DNA. Το Exon 7 είναι το μεγαλύτερο και περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της κωδικοποιούμενης αλληλουχίας. Το Exon 6 περιέχει τη διαγραφή που βρίσκεται στα περισσότερα αλληλόμορφα O και έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας [7].

Τα αλληλόμορφα A και B διαφέρουν μεταξύ τους σε επτά υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων, τέσσερα από τα οποία μεταφράζονται σε διαφορετικά αμινοξέα στο γονιδιακό προϊόν (R176G, G235S, L266M, G268A). Τα κατάλοιπα στις θέσεις 266 και 268 καθορίζουν την ειδικότητα A ή B της γλυκοζυλοτρανσφοράσης που κωδικοποιούν [6,8].

Το αλληλόμορφο O διαφέρει από το αλληλόμορφο A ως προς την έλλειψη της γουανίνης στη θέση 261. Η έλλειψη προκαλεί μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και οδηγεί σε μετάφραση σχεδόν εξ ολοκλήρου διαφορετικής πρωτεΐνης που στερείται ενζυμικής δραστηριότητας [8].

Το αντιγόνο H (που καθορίζει την ομάδα O), παρότι είναι γενετικά ανεξάρτητο από το ABO σύστημα αποτελεί την πρόδρομη ουσία για τη σύνθεση των A και B αντιγόνων. Η αντιγονική σύσταση των ABH αντιγόνων καθορίζεται από μια αλληλουχία σακχάρων τα οποία συνδέονται με τη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου με γλυκοπρωτεϊνικό ή γλυκολιπιδικό δεσμό [9]. Η αλληλουχία των σακχάρων αυτών είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη φύση (ζώα, φυτά, μύκητες, βακτηρίδια), γι' αυτό και στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται στη μεμβράνη όλων των κυττάρων (με γλυκοπρωτεϊνικό ή γλυκολιπιδικό δεσμό) καθώς και στις εκκρίσεις (με γλυκοπρωτεϊνικό δεσμό), γεγονός στο οποίο οφείλεται και ο όρος αντιγόνα ιστών και αίματος με τον οποίο συχνά αναφέρονται [1,2,10].

Τα σάκχαρα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των αλυσίδων που χαρακτηρίζουν τα αντιγόνα του συστήματος ABO, είναι η N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, η D- γαλακτόζη, και η L-

φουκόζη. Η βασική πρόδρομη ουσία των αντιγόνων του συστήματος ABO είναι η αλληλουχία των σακχάρων N- ακετυλογαλακτοζαμίνη, και D- γαλακτόζη. Η προσθήκη μιας L-φουκόζης στο τελευταίο σάκχαρο, (παρουσία του ενζύμου τρανσφεράσης της L-φουκόζης, H-τρανσφεράση), τροποποιεί την πρόδρομη ουσία σε H αντιγόνο (ερυθρά ομάδα O). Η προσθήκη στο αντιγόνο H μιας επί πλέον N- ακετυλογαλακτοζαμίνης (παρουσία του ενζύμου τρανσφεράσης της N- ακετυλογαλακτοζαμίνης, A-τρανσφεράση), το τροποποιεί σε αντιγόνο A, ενώ εάν αντί αυτής προστεθεί μια D-γαλακτόζη, (παρουσία του ενζύμου τρανσφεράσης της D-γαλακτόζης, B-τρανσφεράση), το αντιγόνο H μετατρέπεται σε αντιγόνο B [1,2,10]. Ο φαινότυπος O προκύπτει όταν το γονίδιο γλυκοζυλτρανσφεράσης είναι ανενεργό [11].

Το γεγονός ότι η ομάδα O προκύπτει από αδρανοποίηση του γονιδίου δημιουργεί βασικό πρόβλημα σχεδιασμού DNA – τεχνικών για το ABO σύστημα, διότι μεταλλάξεις μπορεί να υπάρχουν σε πολλά σημεία της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου. Το πλέον συνηθισμένο είναι το O αλληλόμορφο (O^1) που διαφέρει από το A^1 λόγω της απαιολιφής G στη θέση 261 που προκαλεί αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και οδηγεί στην παραγωγή ανενεργού ενζύμου. Το γεγονός ότι τα O αλληλόμορφα προκύπτουν από αλλαγές σε υπόβαθρο A αλληλόμορφου, επιβάλλει να περιληφθεί το σύνολο των O αλληλόμορφων σε κάθε DNA-τεχνική τυποποίησης, ώστε να μην υπάρχει ο κίνδυνος ένας φαινότυπος O να καθοριστεί ως φαινότυπος A [12,13].

Τα αντιγόνα ABO μπορούν να ανιχνευθούν στα ερυθρά αιμοσφαίρια ήδη από την 5^η-6^η εβδομάδα της κύησης. Η ποσότητα των ABO αντιγόνων στα ερυθρά ομφαλίου λώρου είναι μικρότερη από των ενηλίκων εν μέρει ως αποτέλεσμα της ανωριμότητας των πρόδρομων αλυσίδων τύπου 2 στα ερυθροκύτταρα του μυελού. Από την ηλικία των 2-4 ετών τα επίπεδα ABO στην επιφάνεια των ερυθρών είναι όπως των ενηλίκων [14].

Στον ανθρώπινο οργανισμό τα αντιγόνα ABO βρίσκονται στη μεμβράνη όλων των κυττάρων (με γλυκοπρωτεϊνικό ή γλυκολιπιδικό δεσμό) [11] καθώς και στις εκκρίσεις (με γλυκοπρωτεϊνικό δεσμό), γεγονός στο οποίο οφείλεται και ο όρος αντιγόνα ιστών και αίματος [1,2,10]. Τα αντιγόνα A και B είναι σημαντικά, γιατί η παρουσία πάνω στα ερυθρά του ενός ή και των δύο αντιγόνων καθορίζει την ύπαρξη αντισωμάτων στο πλάσμα έναντι του αντιγόνου ή των αντιγόνων που απουσιάζουν [1,2,10]. Εκτός από τις ομάδες A,B,AB και O έχουν ταυτοποιηθεί πολλές υποομάδες και φαινότυποι που οφείλονται σε ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές έκφρασης των αντιγόνων αυτών, καθώς και στην διαφορετική τους

κατανομή στους ιστούς. Υπάρχουν πολλά παραλλαγμένα αλληλόμορφα ABO που κωδικοποιούν έναν αριθμό διαφορετικών φαινοτύπων ABO, αλλά δεν κωδικοποιούν ειδικά αντιγόνα διαφορετικά από τα αντιγόνα A και B. Για παράδειγμα, υποομάδες A, όπως A₃, A_x και A_{el}, εκφράζουν το αντιγόνο A και οι υποομάδες B, όπως οι B₃ και B_x, εκφράζουν το αντιγόνο B [15].

Υποομάδες ABO: Οι υποομάδες ABO είναι φαινότυποι που διαφέρουν κυρίως στην ποσότητα των αντιγόνων A και B που υπάρχουν στα ερυθροκύτταρα και στις εκκρίσεις. Οι A υποομάδες είναι πιο κοινές από τις υποομάδες B [16]. Κλινικά, οι δύο πιο συνηθισμένες υποομάδες που απαντώνται είναι οι A1 και A2. Η A1 αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία των ατόμων της ομάδας A (80%) και χαρακτηρίζεται από περίπου 1.000.000 αντιγονικούς επιτόπους ανά ερυθροκύτταρο. Η A2 είναι η δεύτερη πιο συνηθισμένη υποομάδα (20%) [16,17] και διαθέτει μόνο το ένα πέμπτο από τον αριθμό των αντιγονικών θέσεων της A ομάδας, ενώ και η δομή του αντιγόνου A είναι διαφορετική. Τόσο η A1 όσο και η A2 παρουσιάζουν ισχυρή συγκόλληση με αντι-A αντιδραστήριο σε δοκιμασίες ρουτίνας. Η A1 μπορεί να διαχωριστεί από την A2 με τη χρήση λεκτίνης *Dolichos biflorus*, η οποία συγκολλά τα ερυθροκύτταρα A1, αλλά όχι τα ερυθροκύτταρα A2. Επειδή ο φαινότυπος A2 αντανακλά την ανεπαρκή μετατροπή του αντιγόνου H → A, τα ερυθροκύτταρα A2 παρουσιάζουν αυξημένη αντιδραστικότητα με την αντι-H λεκτίνη *Ulex europaeus*.

Null φαινότυπος-Bombay (Oh): [14] Χαρακτηρίζεται από την απουσία αντιγόνων H, A και B στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στις εκκρίσεις. Γενετικά, τα άτομα είναι ομόζυγα για μη λειτουργικά γονίδια H (hh) και *Secretor* (sese), με αποτέλεσμα την πλήρη απουσία αλυσίδας τύπου H και τύπου 2 H, A και B. Τα ερυθροκύτταρα ταυτοποιούνται ως H αρνητικά με την αντι-H λεκτίνη *Ulex europaeus* και μονοκλωνικό αντι-H. Επειδή αυτά τα άτομα δεν διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο *Secretor* απαραίτητο για τη σύνθεση Leb, τα άτομα Oh ταυτοποιούνται επίσης ως Le(b-). Έχουν περιγραφεί μελέτες γονότυπου σε ένα ευρύ φάσμα αδρανοποιητικών μεταλλάξεων τόσο στα H όσο και στα *Secretor* γονίδια στα άτομα Oh. Επειδή δεν διαθέτουν όλα τα αντιγόνα ABH, τα άτομα αυτά έχουν φυσικές ισοαιμοσυγκολλητίνες A, B και H. Στο συνήθη προσδιορισμό ABO τα άτομα αυτά αρχικά ταυτοποιούνται ως ομάδα O. Ο φαινότυπος Oh γίνεται εμφανής κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης αντισωμάτων με O ερυθροκύτταρα, τα οποία είναι πλούσια σε αντιγόνο H. Τα αντι-H που υπάρχουν στα άτομα O θα συγκολλήσουν ισχυρά όλα τα ερυθροκύτταρα της

ομάδας Ο και μερικές φορές θα επιδείξουν αιμόλυση in-vivo. Ο φαινότυπος Oh μπορεί να επιβεβαιωθεί αποδεικνύοντας την απουσία αντιγόνου Η στα ερυθροκύτταρα [18] και την παρουσία αντι-Η στον ορό που αντιδρά με ερυθροκύτταρα ομάδας Ο αλλά όχι με Oh ερυθρά από άλλα άτομα [19,20].

Φαινότυπος Para-Bombay: [14] Γενετικά, τα άτομα αυτά είναι ομόζυγα για ένα μη λειτουργικό γονίδιο Η (hh), αλλά έχουν κληρονομήσει τουλάχιστον ένα λειτουργικό γονίδιο Secretor (Se). Υπάρχει έλλειψη ορολογικά ανιχνεύσιμου αντιγόνου Η αλλά μπορεί να φέρουν μικρές ποσότητες αντιγόνου Α και / ή Β, επειδή σε αντίθεση με το κλασικό τύπο Bombay, τα Para-Bombay άτομα εκφράζουν αντιγόνα τύπου Α αλυσίδας ABH στις εκκρίσεις και το πλάσμα τους.

Αντιγόνο τύπου Α αλυσίδας Α ή Β στο πλάσμα προσροφάται στα ερυθροκύτταρα, με αποτέλεσμα την ασθενή έκφραση Α ή Β αντιγόνου. Para-Bombay μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε άτομα της ομάδας Ο, όπως αποδεικνύεται από την παρουσία ιχνών Η στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στις εκκρίσεις τους. Ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδος Para-Bombay ορίζονται ως Ah, Bh, και ABh. Σε εργαστηριακές εξετάσεις, τα ερυθροκύτταρα αυτής της ομάδος μπορούν (ή δεν μπορούν) να δώσουν ασθενείς αντιδράσεις με τα αντι-Α και αντι-Β αντιδραστήρια. Σε μερικές περιπτώσεις, τα αντιγόνα Α και Β μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μετά από προσρόφηση και έκλουση. Τα ερυθροκύτταρα Para-Bombay είναι μη αντιδραστικά με αντι-Η λεκτίνη, μονοκλωνικό αντι-Η, και ανθρώπινο αντι-Η από τα άτομα Oh.

Οι οροί ατόμων Para-Bombay περιέχουν αντι-Η, αντι-ΗΙ, ή και τα δύο, και ανάλογα με τον τύπο ABO, αντι-Α και αντι-Β.

Ασθενής έκφραση των ABO αντιγόνων προκύπτει από κληρονομικότητα ασθενών υποομάδων ABO. Ασθενείς με λευχαιμία μπορεί επίσης να παρουσιάσουν εξασθενημένη έκφραση των αντιγόνων ABO.

Ασθένειες που σχετίζονται με τα αντιγόνα ABO: [7] Δεν είναι γνωστή καμία ασθένεια που να προκύπτει από την έλλειψη έκφρασης των αντιγόνων ABO, αλλά η ευαισθησία σε μια σειρά ασθενειών έχει συνδεθεί με τον φαινότυπο ABO ενός ατόμου. Οι συσχετίσεις αυτές παραμένουν αμφιλεγόμενες και περιλαμβάνουν την παρατήρηση ότι ο γαστρικός καρκίνος φαίνεται να είναι πιο συνηθισμένος στα άτομα της ομάδας Α ενώ τα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά έλκη εμφανίζονται πιο συχνά στα άτομα της ομάδας Ο [21].

Υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ του φαινοτύπου ABO και του επιπέδου των δύο πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πήξη του αίματος, τον παράγοντα VII (FVIII) και τον παράγοντα von Willebrand (vWF).[11,22] Τα άτομα με ομάδα αίματος O έχουν περίπου 25% χαμηλότερα επίπεδα FVIII και vWF στο πλάσμα τους. Είναι γνωστό ότι τα χαμηλά επίπεδα FVIII και vWF σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας. Τα άτομα που δεν είναι ομάδας O έχει φανεί ότι διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων [22].

Πίνακας 1. Συχνότητα των αντιγόνων & φαινοτύπων ABO στον πληθυσμό

Frequency of ABO blood group antigens	A: 43% Caucasians, 27% Blacks, 28% Asians B: 9% Caucasians, 20% Blacks, 27% Asians A1: 34% Caucasians, 19% Blacks, 27% Asians Note: Does not include AB blood groups
Frequency of ABO phenotypes	Blood group O is the most common phenotype in most populations. Caucasians: group O, 44%; A ₁ , 33%; A ₂ , 10%; B, 9%; A1B, 3%; A2B, 1% Blacks: group O, 49%; A ₁ , 19%; A ₂ , 8%; B, 20%; A1B, 3%; A2B, 1% Asians: group O, 43%; A ₁ , 27%; A ₂ , rare; B, 25%; A1B, 5%; A2B, rare Note: Blood group A is divided into two main phenotypes, A ₁ and A ₂

L. Dean. Blood Groups and Red Cell Antigen 2005(5)

Αντισώματα ABO: Τα άτομα διαθέτουν αντισώματα ABO που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα A ή B που απουσιάζουν από τα ερυθρά τους κύτταρα [6,11]. Αυτή η προβλεπτή συμπληρωματική σχέση επιτρέπει τη δοκιμασία προσδιορισμού ομάδος ABO με αντιορούς καθώς και με τη χρήση γνωστών ερυθρών ελέγχου. Μια υπόθεση για την ανάπτυξη αυτών των αντισωμάτων βασίζεται στο γεγονός ότι οι διαμορφώσεις που προσδίδουν αντιγονικούς καθοριστές A και B υπάρχουν επίσης σε άλλες βιολογικές οντότητες, συγκεκριμένα στα βακτηριακά τοιχώματα κυττάρων. Τα βακτήρια είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον και η παρουσία τους στην εντερική χλωρίδα, τη σκόνη, τα τρόφιμα και άλλους ευρέως διανεμημένους παράγοντες εξασφαλίζει μια σταθερή έκθεση όλων των ατόμων σε αντιγόνα τύπου A και τύπου B [23].

Τα αντιγόνα A,B,H ήδη αμέσως μετά τη γέννηση του ανθρώπου, κατά τους πρώτους μήνες της εξωμήτριας ζωής, εισέρχονται στον οργανισμό κυρίως μέσω του πεπτικού σωλήνα και

φαγοκυτταρώνονται από τα φαγοκύτταρα. Εφόσον ο οργανισμός εκφράζει ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, το αναγνωρίζει σαν δικό του και δεν κινεί τη διαδικασία της άνοσης αντίδρασης για την παραγωγή αντισωμάτων. Εάν όμως ο οργανισμός στερείται ενός συγκεκριμένου αντιγόνου τότε αμέσως μετά τη φαγοκυττάρωση αυτού του αντιγόνου από τα μακροφάγα, πυροδοτείται η άνοση αντίδραση και παράγονται αντισώματα έναντι του συγκεκριμένου ξένου αντιγόνου.

Έτσι, το αντι-A παράγεται από τα άτομα της ομάδας O και της ομάδας B και το αντι-B παράγεται από την ομάδα O και άτομα της ομάδας A. Τα άτομα της ομάδας AB, που έχουν και τα δύο αντιγόνα, δεν παράγουν αντισώματα αντι-A και αντι-B. Αυτά τα αντισώματα είναι ψυχρού τύπου δηλ. ανοσοσφαιρίνες IgM και αποκαλούνται φυσικά αντισώματα και ο τίτλος τους κυμαίνεται από άτομο σε άτομο [24].

Πρόκειται για φυσικά αντισώματα, που ανευρίσκονται χωρίς να έχει προηγηθεί αντιγονικός ερεθισμός μέσω μετάγγισης ή κύησης, γι' αυτό είναι το μόνο σύστημα με αναμενόμενα αντισώματα στον ορό των ατόμων (φυσικά αντισώματα). Η ύπαρξη των αντισωμάτων αντι-A, αντι-B και αντι-H ταυτοποιεί απόλυτα την ομάδα αίματος ως προς το σύστημα ABO [7].

Τα ABO φυσικά αντισώματα εμφανίζονται στον ορό του αίματος από τον 3^ο έως τον 6^ο μήνα της βρεφικής ηλικίας. Το 85% των βρεφών έχουν τα αναμενόμενα αντισώματα στην ηλικία των 6 μηνών [11,23].

Σε μελέτη παιδιών ομάδας O, ο μέσος τίτλος αντι-A ήταν 4 στους 3- 6 μήνες, 16 στους 6-9 μήνες και 64 στους 12-18 μήνες. Η μέγιστη τιμή τίτλου (128) έλαβε χώρα στο πέμπτο έτος. Οι τίτλοι αντι-B τείνουν να υστερούν, ιδίως στο πρώτο έτος της ζωής. Στην ηλικία των 12 μηνών, αν και το 30% των παιδιών ομάδας O και B είχε τίτλους αντι-A ίσους με τη μέση τιμή των ενηλίκων, μόνο το 4% των παιδιών της ομάδας A είχαν τίτλους αντι-B ίσους με το επίπεδο του μέσου ενήλικα [23]. Η παραγωγή αντισωμάτων αυξάνεται, φτάνοντας στο επίπεδο των ενηλίκων σε ηλικία 5-10 ετών και μειώνεται αργότερα στη ζωή. Οι τίτλοι των ABO αντισωμάτων κυμαίνονται από 4 έως 2048 ή και υψηλότεροι [14]. Οι ηλικιωμένοι συνήθως έχουν χαμηλότερα επίπεδα αντι-A και αντι-B από τους νεαρούς ενήλικες [24,25].

Με την πάροδο της ηλικίας ο τίτλος και των δύο μειώνεται, έτσι ώστε μερικές φορές να μην ανιχνεύονται τα αναμενόμενα αντισώματα στον ορό των εξεταζόμενων ατόμων. Τα αντισώματα ABO είναι σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση σε άτομα που πάσχουν από συγγενή ή επίκτητη υπο-γ-σφαιριναιμία, και απουσιάζουν σε άτομα με σύνδρομο Wiskott-Aldrich. Στα αγόρια με αυτό το σύνδρομο δεν υπάρχει ανοσοαπόκριση σε αντιγόνα

πολυσακχαριτών και έτσι δεν έχουν αντισώματα ABO. Το γονίδιο που προσβάλλεται στο σύνδρομο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη WASP που εμπλέκεται στη ρύθμιση της συναρμολόγησης του κυτταροσκελετού στα κύτταρα του αίματος. Ελαττωματική WASP επηρεάζει την λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων και μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της ωρίμανσης T και B λεμφοκυττάρων, άρα αιτιολογείται η ανοσοανεπάρκεια σε αυτά τα άτομα [26].

Τα αντι-A και τα αντι-B μπορεί επίσης να υπάρχουν σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε εντατική θεραπεία πλασμαφαίρεσης [23].

Το αντι-A1 εμφανίζεται ως αλλοαντίσωμα στον ορό ασθενών σε ποσοστό από 1% έως 8% στα A2 άτομα και 22% έως 35% στα άτομα A2B [14,16]. Αυτά τα αντισώματα είναι κλινικά σημαντικά όταν δρουν στους 37°C γιατί καταστρέφουν τα A1 κύτταρα [27].

Σε περίπτωση ασύμβατης ως προς το σύστημα ABO κύησης, ή σε ασύμβατη μετάγγιση, πυροδοτείται η αναμνηστική άνοση αντίδραση και παράγονται νέα αντισώματα σε υψηλούς τίτλους, τα οποία είναι όχι μόνο IgM αλλά και IgG θερμού τύπου, αποκαλούμενα άνοσα αντισώματα. Στις περιπτώσεις ασύμβατης κατά ABO μετάγγισης τα αντισώματα αυτά μπορούν να προκαλέσουν ενδοαγγειακή καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων (βαριά αιμόλυση) δυνητικά θανατηφόρα.

2. ΣΥΣΤΗΜΑ RHESUS

Μετά το σύστημα ABO, το σύστημα Rhesus είναι το σημαντικότερο από κλινική άποψη. Το σύστημα Rhesus είναι ένα από τα πιο πολυμορφικά και ανοσογόνα συστήματα που είναι γνωστά στους ανθρώπους [28]. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά 49 Rh αντιγόνα [29]. Τα αντιγόνα D, C, E, c και e είναι από τα πιο σημαντικά, και από αυτά ξεχωρίζει το αντιγόνο D ως σημαντικότερο όλων που ανακαλύφθηκε από τους Levine και Stetson το 1939 [30]. Τα αντιγόνα του συστήματος Rh εκφράζονται σε δύο πολυπεπτίδια της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων (D και CE) που κωδικοποιούνται από δύο γειτονικά και ιδιαιτέρως ομόλογα γονίδια του χρωμοσώματος 1 [31,32].

Η πολυπλοκότητα των αντιγόνων του συστήματος Rh αρχίζει με τα πολυμορφικά γονίδια που τα κωδικοποιούν. Τα αντιγόνα του συστήματος Rh είναι πρωτεΐνες. Υπάρχουν δύο γονίδια, τα *RHD* και *RHCE*, τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα, είναι σε κοντινή απόσταση

από το χρωμόσωμα 1 και κωδικοποιούν πρωτεΐνες Rh 416 αμινοξέων. Στην ονοματολογία των CD, ονομάζονται CD240D και CD240CE [33]. Το *RHD* κωδικοποιεί το αντιγόνο D και το *RHCE* κωδικοποιεί τα αντιγόνα CE σε διάφορους συνδυασμούς (ce, cE, Ce ή CE). Τα γονίδια έχουν δέκα εξώνια, είναι 97% ταυτόσημα και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διαφέρουν από 32 έως 35 αμινοξέα που εμφανίζονται ως κύκλοι στον RhD. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα περισσότερα αντιγόνα ομάδας αίματος που κωδικοποιούνται από μεμονωμένα γονίδια με αλληλόμορφα που διαφέρουν μόνο με ένα ή μερικά αμινοξέα [34].

Πολλές γενετικές αναδιατάξεις μεταξύ τους έχουν δημιουργήσει υβριδικά γονίδια *Rh* που κωδικοποιούν πολλά Rh αντιγόνα εκ των οποίων τα σημαντικότερα είναι τα D,C,E,c και e [35].

Η αντιδραστικότητα των αντισωμάτων Rh, ενισχύεται με ερυθρά επεξεργασμένα με ένζυμα και η βέλτιστη δραστηριότητά τους είναι στους 37⁰ C.

Αντιγόνο και αντίσωμα D: Το *RhD* γονίδιο που κωδικοποιεί το D αντιγόνο, είναι μία μεγάλη πρωτεΐνη στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, έχει ένα ενδοκυττάριο ένα εξωκυττάριο και ένα διαμεμβρανικό τμήμα. Υφίσταται αλληλόμορφο του γονιδίου αυτού, το οποίο δεν εκφράζει το D αντιγόνο και συνεπώς, αυτό θα απουσιάζει από την μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (RhD-αρνητικός τύπος) [36]. Περίπου το 85% των ατόμων έχουν το ένα ή και τα δύο γονίδια D και χαρακτηρίζονται Rhesus D(+), ενώ η απουσία του γονιδίου D χαρακτηρίζει τα Rhesus D(-) άτομα [1,37,38]. Το αντιγόνο D θεωρείται το πιο πολύπλοκο από τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Ο αρνητικός φαινότυπος σε ευρωπαϊκής προέλευσης πληθυσμούς οφείλεται σε έλλειψη του αντίστοιχου γονιδίου και έλλειψη του πολυπεπτιδίου D, ενώ σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες ο αρνητικός φαινότυπος μπορεί να προκύπτει από διαφορετική οργάνωση του γονιδιακού τόπου. Επίσης κάθε άτομο που φέρει γονίδιο D με κάποια μοριακή παραλλαγή η οποία επηρεάζει την αλληλουχία αμινοξέων του πολυπεπτιδίου, μπορεί να παρουσιάζει μη τυπικό D αντιγόνο, ειδικά όταν η εξέταση των ερυθροκυττάρων γίνεται με τη χρήση μονοκλωνικών αντιωρών οι οποίοι στρεφόμενοι επιλεκτικά έναντι ειδικών επιτόπων, δεν αντιδρούν με τα ερυθρά που φέρουν διαφοροποιημένες πεπτιδικές περιοχές. Η πολυπλοκότητα αυξάνεται διότι συμβαίνουν ανταλλαγές γονιδίων μεταξύ των γειτονικών *RHD* και *RHCE* κατά τη διάρκεια της μείωσης, που δημιουργούν υβριδικά αλληλόμορφα τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αλληλουχίες που προέρχονται από τα D και CE πολυπεπτίδια.

Τα ερυθροκύτταρα από ορισμένα άτομα του γονότυπου *Dce/Ce* παρουσιάζουν ασθενή έκφραση του D, μια κατασταλτική επίδραση που ασκείται από το *RHC* στη θέση *trans* στην *RHD* στο αντίθετο χρωμόσωμα. Παρόμοια καταστολή του D μπορεί να παρατηρηθεί με άλλους απλότυπους *RHD* που συνοδεύονται από *RHCe* σε *trans* θέση [34]. Ως επιπρόσθετος συνδυασμός, το τροποποιημένο *RHCE* *ce* συχνά κληρονομείται ως partial RHD (DIII, DAU, DAR κ.λπ.).

Η παρουσία του αντιγόνου C, μειώνει την έκφραση του αντιγόνου D και συνεπώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια *DcE / DcE* (*R2R2*) έχουν μεγαλύτερη ισχύ όσον αφορά το D από τα ερυθροκύτταρα *DCe / DCe* (*R1R1*). Με κυτταρομετρία ροής, η ισχύς του αντιγόνου D μειώνεται με την ακόλουθη σειρά: *DcE / DcE* (*R2R2*) > *DcE / DcE* (*R1R2*) > *DCe / DCe* (*R1R1*) > *DcE / ce* (*R2r*) > *DCe / ce* (*R1r*) [34].

Οι περισσότεροι D(+) φαινότυποι έχουν συμβατική πρωτεΐνη RhD. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί περισσότερα από 100 διαφορετικά αλληλόμορφα *RhD* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αλλαγές αμινοξέων. Αυτά μπορεί να προκαλέσουν πολυάριθμες παραλλαγές στην έκφραση του D και περιλαμβάνουν weak D, partial D, και Del φαινότυπους. Ερυθρά αιμοσφαίρια με κάποια μορφή τροποποιημένης έκφρασης D υπάρχουν σπάνια στην καθημερινή πρακτική μετάγγισης.

Οι ποικιλίες έκφρασης D διακρίνονται σε κατηγορίες D (variants).

D weak: [35] Τα D weak ερυθρά έχουν ιστορικά οριστεί ότι έχουν μειωμένη ποσότητα αντιγόνου D, απαιτώντας δοκιμασία έμμεσης coombs (IAT) για ανίχνευση. Η έκφραση D weak είναι αποτέλεσμα μεμονωμένων νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων σε *RHD* που κωδικοποιούν αμινοξέα που εντοπίζονται ενδοκυτταρικά, ή σε διαμεμβρανικές περιοχές του RhD, παρά στην εξωτερική επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την εισαγωγή της πρωτεΐνης στη μεμβράνη, που αντανακλάται στο μειωμένο αριθμό θέσεων του D αντιγόνου στα ερυθροκύτταρα. Πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις προκαλούν την έκφραση D weak. Ασθενείς που παρουσιάζουν τους D weak τύπους 1, 2, 3, ή 4.1 δεν είναι επιρρεπείς σε άλλο-αντι-D ανοσοποίηση σε περίπτωση που μεταγγιστούν με D θετικά ερυθρά [39]. Ο πιο συνηθισμένος είναι ο τύπος 1, ο οποίος έχει Val270Gly μετάλλαξη και η οποία μαζί με τους τύπους 2 και 3, αντιπροσωπεύει περίπου το 90% των D weak στους Καυκάσιους με κατανομές που ποικίλλουν μεταξύ των διαφόρων εθνοτήτων [40].

Η έκφραση D weak είναι αρκετά συχνή στη μαύρη φυλή, συχνά εμφανιζόμενη ως μέρος ενός απλότυπου *Dce*. Τα γονίδια για ασθενή έκφραση του D είναι λιγότερο κοινά στους λευκούς και μπορεί να θεωρηθούν ως μέρος ενός ασυνήθιστου *DCe* ή *DcE* απλότυπου.

D partial: [35] Τα D partial ερυθροκύτταρα έχουν ταξινομηθεί με βάση το γεγονός ότι τα ερυθροκύτταρα είναι θετικά ως προς το D, αλλά τα άτομα αυτά μπορεί να σχηματίσουν αντι-D όταν εκτεθούν σε D συμβατικό αντιγόνο. Σε αυτά τα ερυθροκύτταρα λείπουν τμήματα του D αντιγόνου. Η πλειοψηφία των D partial φαινοτύπων οφείλεται σε υβριδικά γονίδια στα οποία αντικαθίστανται τμήματα *RHD* από τα αντίστοιχα τμήματα του *RHCE*. Οι νέες αλληλουχίες της υβριδικής πρωτεΐνης που προέρχεται από περιοχές του RhD που συνδέονται με το RhCE, όχι μόνο μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια επιτόπων D, αλλά επίσης μπορεί να δημιουργήσει νέα αντιγόνα. Για παράδειγμα τα ερυθροκύτταρα DVI φέρουν το αντιγόνο BARK. Μερικοί φαινότυποι D partial όπως και οι D weak είναι το αποτέλεσμα μιας αλλαγής ενός αμινοξικού καταλοίπου. Σε αντίθεση με το D weak, οι αλλαγές αφορούν το τμήμα του D αντιγόνου στην εξωτερική επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.

Στον ευρωπαϊκό πληθυσμό η κατηγορία DVI είναι η συχνότερη [41] έχει την μεγαλύτερη κλινική σημασία, και είναι η παραλλαγή D που συνηθέστερα συνδέεται με την παραγωγή αντι-D [42]. Αντιγόνα ποικιλιών D που είναι περισσότερο συχνά σε άτομα αφρικανικής καταγωγής είναι κυρίως τα: DIVa, DAU και ασθενή D τύπου 4 (DIIIa, και DAR). Ο τύπος DAR παρότι χαρακτηρίζεται από μοριακές βλάβες που δεν υποδεικνύουν δομική αλλαγή του επιφανειακού τμήματος της πρωτεΐνης, παρουσιάζει όμως αλλοανοσοποίηση μετά από επαφή με ερυθρά που φέρουν το αρχέγονο πλήρες αντιγόνο [39,43,44].

DEL: [35] Τα ερυθροκύτταρα εκφράζουν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα αντιγόνου D που δεν μπορούν να ανιχνευτούν με τις συνήθεις ορολογικές μεθόδους. Ωστόσο, αυτά τα ερυθροκύτταρα μπορούν να προσροφήσουν στην επιφάνειά τους αντι-D και στη συνέχεια το αντι-D να ταυτοποιηθεί με την διαδικασία της έκλουσης. Τα ερυθροκύτταρα τύπου Del βρίσκονται στο 10-30% των D(-) Ασιατών και προκύπτουν από πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις *RHD* που μειώνουν σημαντικά την έκφραση RhD στη μεμβράνη. Τα άτομα που μεταγγίζονται με ερυθρά που έχουν πλήρη φαινότυπο DEL και ένα αλληλόμορφο *RHD* (1227G> A) (ασιατικός τύπος DEL) δεν διατρέχουν τον κίνδυνο σχηματισμού αντι-D μετά από μετάγγιση D(+) RBCs [45].

Τα ερυθρά Del είναι πολύ λιγότερο κοινά σε άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής (0,027%) και φέρουν διαφορετική μετάλλαξη.

Rh null: [34] Ο φαινότυπος που περιγράφεται ως Rh null, παράγεται από δύο τουλάχιστον διαφορετικούς γενετικούς μηχανισμούς. Στον πιο συνηθισμένο τύπο ρυθμιστή Rh null, εμφανίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο *RHAG* που οδηγούν στην πλήρη απουσία του (Rh πολυπεπτίδια και RhAG) που είναι αναγκαία για την έκφραση των Rh αντιγόνων. Τέτοια άτομα μεταδίδουν τα κανονικά γονίδια *RHD* και *RHCE* στους απογόνους τους. Η άλλη μορφή του Rh null, το amorph, έχει ένα φυσιολογικό γονίδιο *RHAG*. Ωστόσο, υπάρχει μια μετάλλαξη σε κάθε γονίδιο *RHCE* μαζί με την κοινή διαγραφή του *RHD* [όπως στα D(-) άτομα]. Ο τύπος amorph του Rh null είναι σημαντικά σπανιότερος από τον τύπο του ρυθμιστή. Γονείς και απόγονοι αυτού του τύπου Rh null είναι υποχρεωτικά ετεροζυγώτες για το άμορφο. Τα ερυθροκύτταρα Rh null, τα οποία δεν διαθέτουν πρωτεΐνες Rh, παρουσιάζουν δομικές διαταραχές της μεμβράνης με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ως στοματοκύτταρα, σφαιροκύτταρα, να αιμολύονται ευκολότερα και τα άτομα αυτά να εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία [32].

Λίγες κατηγορίες D παρουσιάζουν συχνότητα μεγαλύτερη από 1-2/1000 στο γενικό πληθυσμό, παγκόσμια. Στον ευρωπαϊκό πληθυσμό η κατανομή του weak D έχει ως εξής: Μελέτες στη Δυτική Ευρώπη ανέφεραν ότι weak D τύπου 1 έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα στη Γερμανία (62.5%), το Βέλγιο (54%), την Τσεχική Δημοκρατία (58%), την Αυστρία (44.5%), τη Γαλλία (36.7%) και Καταλονία (49%) παρόμοια με τα αποτελέσματα στον ελληνικό πληθυσμό (57.8%).

Ο weak D τύπου 2 κυριαρχεί στην Πορτογαλία (64%) και στην Ιρλανδία (44%) ενώ ανιχνεύθηκε μόνο στο 3.1% των weak D στην Ελλάδα. Ο weak D τύπου 3 είναι ο δεύτερος επικρατέστερος, μετά τον weak D τύπου 1 στην Αυστρία (32.5%) και στην μεσογειακή Κροατία (36.4%) παρόμοια με τα αποτελέσματα στον ελληνικό πληθυσμό (12.5%) υποδηλώνοντας ότι οι πληθυσμοί της νοτιοανατολικής Ευρώπης μπορεί να έχουν υψηλότερη συχνότητα weak D τύπου 3 σε σύγκριση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες [46,47]. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι το τρίτο πιο κοινό αλληλόμορφο weak D ήταν τύπου 11. Μια μελέτη στην Ιταλία που αναλύει ένα περιορισμένο αριθμό περιπτώσεων (n = 11) παρήγαγε παρόμοια αποτελέσματα με το 70% των παραλλαγών D weak να

αντιπροσωπεύονται από τους τύπους 1, 5 και 11 (70,3% στη μελέτη του ελληνικού πληθυσμού) [48].

Συγκρίνοντας την κατανομή των D weak με τα αποτελέσματα των μεσογειακών χωρών (Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία), αν και διαφορετικές μελέτες εφαρμόζουν διαφορετική ορολογική διαδικασία επιλογής, φαίνεται ότι στον ελληνικό πληθυσμό υπάρχει ένα ξεχωριστό πρότυπο. Δεδομένου ότι το αλληλόμορφο D weak 11 βρίσκεται συνήθως στους ασιατικούς πληθυσμούς, θα μπορούσαμε να αποδώσουμε μερικώς τη συχνότητά του στον ελληνικό πληθυσμό στην ανταλλαγή πληθυσμού από τη Μικρά Ασία στις αρχές του περασμένου αιώνα.

Επιπλέον, η παρουσία weak τύπου 4.2, που είναι κοινή στην Αφρική, μπορεί να αντικατοπτρίζει τις θαλάσσιες διασυνδέσεις της χώρας μας με τις χώρες της Βόρειας Αφρικής [40].

Το αντιγόνο D μπορεί να ανιχνευθεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια του εμβρύου την 5^η – 6^η εβδομάδα της κύησης [49,50,51]. Τα αντισώματα Rh είναι ως επί το πλείστον IgG και κυρίως IgG1, αν και όλα τα IgG2, IgG3 και IgG4 έχουν ανιχνευθεί [52].

Τα αντισώματα στο σύστημα Rhesus δημιουργούνται μετά από έκθεση των αρνητικών ατόμων σε ερυθρά θετικά για το αντιγόνο, είτε με μετάγγιση είτε κατά την κύηση. Το D είναι το πιο ισχυρά ανοσογόνο και ακολουθεί το c και E [34].

Κατά την πρώτη μετάγγιση συνήθως δεν υπάρχουν επιπτώσεις. Στη συνέχεια όμως ο οργανισμός του λήπτη ευαισθητοποιείται και παράγει αντι-D αντισώματα, τα οποία θα καταστρέψουν μαζικά τα D(+) ερυθρά σε περίπτωση επόμενης μετάγγισης, γεγονός που θέτει σε κίνδυνο τη ζωή του ασθενούς. Το αντίσωμα συνήθως παραμένει για αρκετά χρόνια, για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 έως 38 ετών [50,51].

Εάν τα επίπεδα αντισωμάτων του ορού μειωθούν πολύ ή δεν είναι ανιχνεύσιμα και ακολουθήσει επανέκθεση στο αντιγόνο δημιουργείται ταχεία δευτερογενής ανοσοαπόκριση.

Αντίστοιχα οι D(-) γυναίκες που κυοφορούν D(+) έμβρυο έχουν σημαντική πιθανότητα να ευαισθητοποιηθούν αν δεν χορηγηθεί αντι-D ανοσοσφαιρίνη. Και στην περίπτωση αυτή το πιθανότερο είναι ότι δεν θα υπάρχουν επιπτώσεις για το έμβρυο της πρώτης κύησης. Αντιθέτως όμως στις επόμενες κυήσεις τα προϋπάρχοντα αντισώματα στα ερυθρά της μητέρας, θα περάσουν μέσω του πλακούντα στην κυκλοφορία του αίματος D(+) εμβρύου

και μπορεί να προκαλέσουν από ήπιο ίκτερο και αναιμία στο έμβρυο, έως βαριά αιμολυτική νόσο του νεογνού [53].

Αντιγόνα και αντισώματα Cc/Ee: Στη δεκαετία του 1940 ανακαλύφθηκαν και άλλα 4 σημαντικά αντιγόνα του συστήματος Rhesus (C, c, E, e), που φαίνεται να κληρονομούνται σε διάφορους συνδυασμούς με το αντιγόνο D, ενώ η κλινική σημασία των υπολοίπων αντιγόνων Rh είναι μικρότερη. Το γονίδιο *RHCE*, κωδικοποιεί τα αντιγόνα CE σε διάφορους συνδυασμούς (ce, cE, Ce ή CE). Ο απλότυπος Dce είναι ο πιο κοινός στους Καυκάσιους (42%), τους Αμερικανούς (44%) και τους Ασιάτες (70%). Στους μαύρους, ο πιο κοινός απλότυπος είναι Dce [29].

Ο γενετικός τύπος του συστήματος Rhesus (RH) αποτελείται από δύο συναφή δομικά γονίδια, *D* και *CcEe*, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεμβράνης ερυθροκυττάρων που φέρουν τα αντιγόνα D, Cc και Ee. Σε ανάλυση αλληλουχίας μεταγράφων και γονιδιωματικού DNA από άτομα που ανήκουν σε διαφορετικούς Rh φαινοτύπους για τον προσδιορισμό της μοριακής βάσης των πολυμορφισμών *C/c* και *E/e* βρέθηκε ότι τα αλληλόμορφα *E* και *e* διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο που καταλήγει σε υποκατάσταση Pro226Ala, ενώ τα αλληλόμορφα *C* και *c* διαφέρουν κατά έξι νουκλεοτίδια που έχουν ως αποτέλεσμα τέσσερις υποκαταστάσεις αμινοξέων Cys16Trp, He60Leu, Ser68Asn και Ser103Pro. Με την κλωνοποίηση του γονιδίου *RhD*, αυτά τα ευρήματα παρέχουν τη μοριακή γενετική βάση που καθορίζει τις ιδιότητες D, C, c, E και e [54].

Τα κοινά αλληλόμορφα *RHCE* κωδικοποιούν τα αντιγόνα C ή c και E ή e. Ωστόσο, είναι γνωστά περισσότερα από 60 διαφορετικά αλληλόμορφα και πολλά σχετίζονται με τροποποιημένη ή μειωμένη έκφραση των κύριων αντιγόνων και σε ορισμένες περιπτώσεις, την απώλεια αντιγόνων υψηλής συχνότητας. Τα σύνθετα αντιγόνα (ce, Ce, cE και CE) ορίζουν επιτόπους που εξαρτώνται από τις αλλαγές διαμόρφωσης που προκύπτουν από τα αμινοξέα που σχετίζονται με τα *C/c* και *E/e*. Αυτά αναφέρονται ως προϊόντα *cis*, για να υποδείξουν ότι τα αντιγόνα εκφράζονται από τον ίδιο απλότυπο, και εκφράζονται σε μία πρωτεΐνη [34].

Ο πολυμορφισμός *C/c* προκύπτει από τέσσερα SNPs που προκαλούν τέσσερις αλλαγές αμινοξέων, εκ των οποίων το ένα (S103P) καθορίζει την εξειδίκευση του αντιγόνου C ή c. Ο πολυμορφισμός *E/e* προκύπτει από ένα SNP (676→ C) που προκαλεί μια αλλαγή ενός αμινοξέος (A226P).

Οι τέσσερις πιθανοί συνδυασμοί προκύπτουν σε διαφορετικές συχνότητες (μεταξύ των Ευρωπαίων: $Ce > ce > cE > CE$) και κληρονομούνται ως απλότυποι [33].

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *RHCE* καταλήγουν σε ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές στην έκφραση του C/c ή E/e αντιγόνου. Σε άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής, η μεταβληθείσα C σχετίζεται με μεταβολές αμινοξέων που βρίσκονται στον πρώτο εξωκυτταρικό βρόχο του RhCe και την έκφραση αντιγόνων CW (Gln41Arg) ή CX (Ala36Thr) [35].

Ένας D weak φαινότυπος μπορεί να προκύψει όταν το Ce (r') υπάρχει σε θέση *trans* σε *RHD* (π.χ. $R0r'$). Επιπλέον, η περαιτέρω ασθενής έκφραση ενός ήδη D weak από το Ce μπορεί να οδηγήσει σε ένα φαινομενικό αρνητικό D (rr' , $r'r'$, ή $r''r'$) ή Del φαινότυπο σε ένα δείγμα που είναι Rweak D r' [35].

Η αλλοιωμένη ή μερική έκφραση e σχετίζεται με πολλά άλλα αλληλόμορφα *RHce* που έχουν υποστεί πολλαπλές μεταλλάξεις. Αυτά βρίσκονται πρωτίστως σε άτομα αφρικανικής καταγωγής. Τα ερυθροκύτταρα ταυτοποιούνται ως e-θετικά, αλλά τα ομόζυγα άτομα για αυτά τα αλληλόμορφα κάνουν αλλοαντισώματα με ειδικότητα όμοια με e και μπορεί να εμφανίζονται ως αυτοαντισώματα. Αυτά τα ερυθρά αιμοσφαίρια στερούνται επίσης το υψηλής συχνότητας αντιγόνο hrS (hrS^-). Το αντι- hrS είναι ένα κλινικά σημαντικό αντίσωμα και έχει προκαλέσει θανάτους μετά μετάγγιση [35].

Εάν τα ερυθρά φέρουν μόνο C ή c, ή μόνο E ή e, το άτομο θεωρείται ότι είναι ομόζυγο για το συγκεκριμένο αλληλόμορφο.

Τα αντισώματα C-c-E-e δημιουργούνται μετά από έκθεση των αρνητικών ατόμων σε ερυθρά θετικά για το αντιγόνο, είτε με μετάγγιση είτε κατά την κύηση. Το c είναι το πιο ισχυρά ανοσογόνο και ακολουθεί το E. Περιστασιακά, τα αντι-E αντισώματα εμφανίζονται ως φυσικά. Τα αντισώματα Rh ενισχύονται με χρήση ερυθρών ελέγχου επεξεργασμένα με ένζυμο [55,56].

Μερικά αντισώματα Rh τείνουν να εμφανίζονται μαζί. Για παράδειγμα σε άτομο με φαινότυπο D Ce /D ce , που αναδεικνύεται αντίσωμα αντι-E είναι σχεδόν σίγουρο ότι έχει εκτεθεί και στο c όπως και στο E, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά μπορεί να είναι ασθενέστερο ή μη ανιχνεύσιμο στο χρονικό διάστημα που ανιχνεύθηκε το αντι-E [34]. Μελέτη σε 100 ασθενείς με αντι-E, έδειξε ότι 32 από αυτούς είχαν αναπτύξει και αντι-c [57].

Πίνακας 2. Η συχνότητα των κοινών γονότυπων Rh στον πληθυσμό

Haplotype	Rh genes	White population	Black population	Americans	Asian
R ₁	RHD, RHCEe	0.42	0.17	0.44	0.70
R	RHce		0.37	0.26	0.11
R ₂	RHD, RHcE	0.14	0.11	0.34	0.21
R ₀	RHD, RHce	0.04	0.44	0.02	0.03
r'	RHce		0.02	0.02	0.02
R''	RHcE		0.01	0.00	0.06
R _z	RHD, RHCE	0.00	0.00	0.06	0.01
r ^y	RHCE		0.00	0.00	0.00

Velkova E. Correlation between the Amount of Anti-D Antibodies and IgG Subclasses with Severity of Haemolytic Disease of Foetus and Newborn. *Open Access Maced J Med Sci* 2015;3:293-297.

Αντιγόνο και αντίσωμα Cw: Το αντιγόνο Cw είναι ένα σπάνιο αντιγόνο του συστήματος Rhesus, που προκύπτει από την σημειακή μετάλλαξη A 122G στο γονίδιο *RHCE*, η οποία προκαλεί αντικατάσταση ενός αμινοξέος (Gln41Arg) στην πρώτη εξωκυττάρια αγκύλη του πολυπεπτιδίου Rh. Το ποσοστό στους Καυκάσιους είναι <2%, πλην των Φιλανδών, όπου προσεγγίζει ή υπερβαίνει το 4%. Εμπλέκεται μάλιστα σε περιπτώσεις αλλοανοσοποίησης μετά μετάγγιση και σε αιμολυτική νόσο του νεογνού [58]. Περιστασιακά, τα αντισώματα Cw εμφανίζονται ως φυσικά [59].

Αντιγόνο και αντίσωμα G: Το αντιγόνο Rhesus G περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Allen και Tippet το 1958 [60] και έχει αναφερθεί ως πιθανή αιτία αιμολυτικής νόσου του εμβρύου και του νεογνού είτε ανεξάρτητα, είτε σε συνδυασμό με το αντι-D και αντι-C [61,62].

Το αντιγόνο G του συστήματος Rhesus συναντάται στα ερυθρά που φέρουν το αντιγόνο D ή C ή και τα δύο και καθορίζεται στο κατάλοιπο 103Ser σε RhD, RhCe ή RhCE [35]. Το αντι-G σχηματίζεται στα RhD (rr) αρνητικά άτομα μετά από μετάγγιση ή κύηση και μπορεί να προκαλέσει αιμολυτική νόσο εμβρύου-νεογνού που η βαρύτητά της κυμαίνεται από ήπια έως βαριά [63,64]. Συνήθως συνυπάρχει με αντι-C ενώ λίγες περιπτώσεις αμιγούς αντι-G έχουν περιγραφεί. Το αντίσωμα έχει την εργαστηριακή εικόνα του αντι -D+C, και συχνά υπάρχει το ένα ή και τα δύο αντισώματα αλλά η δραστηριότητα του αντι-G δεν μπορεί να διαχωριστεί σε αντι-C και αντι-D. Στις αλλοανοσοποιημένες έγκυες γυναίκες που

παρουσιάζουν εικόνα αντι-C και αντι-D, μπορεί να υπάρχει υποκείμενο αντι-G που προκαλεί HDFN είτε μόνο του είτε επιπρόσθετα των δύο αντισωμάτων [65].

Η διαφορική διάγνωση των αντισωμάτων ενώ δεν έχει κλινική σημασία στην καθημερινή ιατρική των μεταγγίσεων είναι σημαντική κατά την κύηση στα πλαίσια της χορήγησης ή όχι ανοσοπροφύλαξης [62,66,67].

Η προγεννητική παρακολούθηση με την συστηματική εκτίμηση του τίτλου αποτελεί ασφαλή μέθοδο εκτίμησης της πορείας της νόσου στην παρουσία αντι-G. Η αιμολυτική νόσος που προκαλεί το αντι-G είναι συνήθως ήπιας βαρύτητας [62].

Κατά τη διάρκεια της κύησης δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις με αντισώματα αντι-C και αντι-G αλλά όχι αντι-D. Στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει να χορηγηθεί ανοσοσφαιρίνη RhD_{IG} κατά τη διάρκεια της κύησης για την αποτροπή της ανοσοποίησης στο D [68].

Όταν δεν είναι διαθέσιμα τα απαραίτητα μέσα για την απόδειξη της απουσίας του αντι-D η θεραπεία με RhD_{IG} ανοσοσφαιρίνη συνιστάται όταν ο τίτλος με r'r (D-C+) ερυθρά είναι υψηλότερος από τον τίτλο που έγινε με R₂ R₂(D+C-) ερυθρά [69].

Διαφοροποίηση από αντι-G και αντι-LW:

Αν και κανένα αντίσωμα LW δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα να είναι υπεύθυνο για οποιαδήποτε σοβαρή HTR ή HDFN εξακολουθεί να είναι σημαντικό να είμαστε προσεκτικοί σχετικά με την πιθανή αναγνώρισή του.

Εκτός από το αντι-G, το ασθενές αντι- LW μπορεί να συγχέεται με αντισώματα αντι-D και η διαφοροποίησή του είναι ιδιαίτερα σημαντική σε έγκυες γυναίκες RhD(-), λόγω της πιθανότητας της ανάγκης για RhD προφύλαξη. Η έκφραση των αντιγόνων LW μπορεί να κατασταλεί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και να επανέλθει η έκφραση του αντιγόνου μετά τον τοκετό. Τα αντισώματα LW δεν είναι ασυνήθιστα και μπορεί να παραχθούν χωρίς εμφανή έκθεση κατά τη διάρκεια των περιόδων καταστολής των αντιγόνων.

Πώς ανιχνεύονται εργαστηριακά: Είναι γενικά IgG και δεν προκαλούν αιμόλυση, δεν ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, αντιδρούν στην αντι-ανθρώπινη σφαιρίνη(AHG), παρουσιάζουν ισχυρές αντιδράσεις με ερυθροκύτταρα RhD(+) και μπορεί να αντιδράσουν ή όχι με RhD(-). Τα αντιγόνα LW είναι ανθεκτικά στην παπαΐνη, (δεν καταστέλλονται από τα ένζυμα φυσίνη και παπαΐνη) αλλά μετουσιώνονται (καταστέλλονται) με επεξεργασία με DTT [34]. Για να γίνει διάκριση του αντι-LW από το αντι- D τα ερυθροκύτταρα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία με DTT, (μετουσιώνει τα αντιγόνα LW αλλά όχι τα Rh) και ο

έλεγχος να γίνεται με ερυθρά ομφαλίου λώρου τα οποία παρουσιάζουν υψηλή έκφραση των αντιγόνων LW [70].

Τα αντιγόνα LW εκφράζονται σε υψηλότερες εντάσεις σε D(+) ερυθροκύτταρα σε σχέση με τα D(-), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή ταυτοποίηση του αντι-D [71].

3. ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

I. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ KELL

Η γλυκοπρωτεΐνη που φέρει αντιγόνα του συστήματος Kell (CD238) κωδικοποιείται από γονίδιο στο χρωμόσωμα 7 (7q33) [72]. Έχει μοριακό βάρος 93kDa και περιλαμβάνει 732 αμινοξέα. Πρόκειται για μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II με το αμινοτελικό της άκρο στο κυτοσόλιο, μια απλή διαμεμβρανική περιοχή και ένα μεγάλο εξωκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο 665 αμινοξέων. Η εξωκυτταρική περιοχή περιέχει 15 κατάλοιπα κυστεΐνης, υποδηλώνοντας ότι αυτό το τμήμα του μορίου είναι καλά πτυχωμένο. Ένα από αυτά τα κατάλοιπα (Cys72) σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την πρωτεΐνη Xk. Οι μοριακές βάσεις των περισσότερων αντιγόνων του συστήματος Kell είναι γνωστές και όλες προκύπτουν από υποκαταστάσεις ενός αμινοξέος. Οι φαινότυποι Ko και Kmod προκύπτουν από μια ποικιλία διατάξεων των αδρανοποιητικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *KEL* [73].

Το σύστημα των ομάδων Kell περιγράφηκε το 1946 με κυριότερα αντιγόνα τα K(Kell) και k(Cellano) και επίσης τα αντιθετικά αντιγόνα K_{ra}/K_{rb} και J_{sa}/J_{sb}. Το αντιγόνο K_x φαίνεται ότι είναι η πρόδρομη ουσία του συστήματος Kell. Το αντιγόνο K_x βρίσκεται σε ίχνη, στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στην περίπτωση που το σύστημα Kell εκφράζεται με τα αντιγόνα K_k, K_{ra}, K_{rb}, J_{sa}, J_{sb}.

Αντίθετα όταν ο φαινότυπος είναι Ko, δηλαδή δεν αναπτύσσονται τα προαναφερθέντα αντιγόνα του συστήματος Kell, τότε στα ερυθρά υπάρχει μόνο το αντιγόνο K_x [74]. Περιγράφονται σπάνιες περιπτώσεις απουσίας του K_x από τα ερυθρά αιμοσφαίρια που συνοδεύονται από διαταραχή της μεμβράνης των ερυθρών. Τα ερυθρά αυτά έχουν τον φαινότυπο McLeone (K-kw, K_p^{a-bw}, J_s^{a-bw}) [75]. Η απουσία του αντιγόνου K_x από τα λευκά αιμοσφαίρια (όπου επίσης υπάρχει το σύστημα Kell), συνοδεύεται από αδυναμία των κοκκιοκυττάρων να κινητοποιήσουν ένζυμα αναγκαία για τη φαγοκυττάρωση με αποτέλεσμα την παρουσία παθολογικής κατάστασης που ονομάζεται χρόνια κοκκιωματώδης νόσος.

Η νέα ονοματολογία του συστήματος Kell έχει ως εξής: K1, K2, K3, K4, K6, και K7 και αντιστοιχεί στα K, k, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb. Το K5 αντιστοιχεί στο Ku το αντιγόνο που θεωρείται ότι εντοπίζεται από το αντίσωμα που προκαλείται από άτομα Ko [K-,k-, Kp(a-b-)].

Επίσης έχουν περιγραφεί και τρία παρα-Kell αντιγόνα: Boc, Sgro, και San.

Τα αντιγόνα του συστήματος Kell είναι πλήρως ανεπτυγμένα κατά τη γέννηση και εκφράζονται στα εμβρυικά RBCs ήδη από τη 10η-11η εβδομάδα κύησης [76].

Εκφράζονται 3000-6000 μόρια αντίγραφα/ερυθροκύτταρο. Αναλυτικότερα ο αριθμός των θέσεων K σε ερυθρά κύτταρα KK είναι 4000-6100 και σε κύτταρα Kk 2500-3500 [73].

Παρά τη χαμηλή του συγκέντρωση στα ερυθρά το αντιγόνο K είναι ισχυρά ανοσογόνο (2^ο μετά το αντι-D) σε ότι αφορά την παραγωγή αντισωμάτων [11,77]. Πρέπει να αποφεύγεται συστηματικά η μετάγγιση Kell(+) ερυθρών σε άτομα ομοζυγώτες k (Cellano).

Αντιδραστήρια σουλφυδρυλίου όπως το 2-αμινοαιθυλαιοθειουρικό βρωμιούχο (AET) ή διθειοθρεϊτόλη (DTT) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποδυναμώσει ή να καταστρέψει τα αντιγόνα του συστήματος Kell [78].

Πίνακας 3. Συχνότητα των αντιγόνων & φαινοτύπων Kell στον πληθυσμό

Frequency of Kell antigens	~100%: k, Kp ^b , Ku, Js ^b , K11, K12, K13, K14, K18, K19, Km, K22, K26, K27 K antigen: 2% in Blacks, 9% in Caucasians, up to 25% in Arabs ~2%: Kp ^a , U1 ^a ~0.01%: Js ^a (0.01% in Caucasians, 20% in Blacks), Kp ^c , K23 Others: K17 (~0.3%), K24 (rare), VLAN (rare), K16 (unknown)
Frequency of Kell phenotypes	K-k+ in 91% Caucasians and 98% Blacks K+k- in 0.2% Caucasians and is rare in Blacks K+k+ in 8.8% Caucasians and 2% Blacks Kp (a-b+) in 97.7% Caucasians and 100% Blacks Js (a-b+) in 100% Caucasians and 80% Blacks

L. Dean. The Kell blood group. Blood Groups and Red Cell Antigen 2005(8)

Αντισώματα για τα αντιγόνα του συστήματος Kell

Δεδομένου ότι το αντιγόνο Kell είναι ισχυρά ανοσογόνο συχνά ανευρίσκεται στον ορό μεταγγισμένων ατόμων αντίσωμα αντι-K το οποίο είναι IgG, και είναι το συνηθέστερο αντίσωμα μετά το σύστημα Rh [11,34].

Το αντίσωμα Kell (αντι-Kell) είναι αιτία πολλών αιμολυτικών αντιδράσεων άμεσων και επιβραδυνόμενων αλλά και αιτία αιμολυτικής νόσου του νεογνού. Το αντίσωμα Cellano

(αντι-k) έχει κλινικά και ορολογικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά του αντι-K αλλά αναπτύσσεται πολύ πιο σπάνια δεδομένου ότι σε πληθυσμό 500 ατόμων μόνο το ένα άτομο στερείται το αντιγόνο k. Όπως είναι φυσικό όταν αναπτυχθεί αυτό το αντίσωμα είναι εξαιρετικά δύσκολο να βρεθούν τα κατάλληλα Cellano αρνητικά ερυθρά για μετάγγιση.

Τα αντι-Kra, αντι-Krb, αντι-Jsa, αντι-Jsb είναι λιγότερο συχνά από το αντι-Kell αλλά έχουν παρόμοια ορολογικά χαρακτηριστικά. Η σπανιότητα ανάπτυξης αυτών των αντισωμάτων ειδικά των αντι-k, αντι-Krb, και αντι-Jsb οφείλεται στη χαμηλή αντιγονικότητα των αντίστοιχων αντιγόνων. Το αντι-Ku αναπτύσσεται κατόπιν ανοσοποίησης των Ko ατόμων.

Το αντι-K και πολύ σπανιότερα το αντι-k μπορεί να προκαλέσει σοβαρές αιμολυτικές αντιδράσεις, και σοβαρή HDFN [11]. Τα αντι-Jsa και αντι-Jsb είναι γνωστό ότι προκαλούν DHTR. Το αντι-Kra, και πολύ πιο σπάνια τα αντι-Krb και αντι-Jsb, έχουν προκαλέσει σοβαρή HDN. Αντισώματα του συστήματος Kell, ιδιαίτερα αντι-Krb, μπορεί να βρεθούν ως αυτοαντισώματα σε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία [73].

Τα αντισώματα K ανιχνεύονται σε διάστημα μεγαλύτερο των 5 ετών μετά την ευαισθητοποίηση από το αντιγόνο [79].

II. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ DUFFY

Το σύστημα των ομάδων Duffy περιγράφηκε από τους Cutbush & Chanazin το 1950. Περιλαμβάνει πέντε αντιγόνα που βρίσκονται σε μια γλυκοπρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Duffy (*DARK*), η οποία αποτελείται από δύο εξώνια, με το εξώνιο 1 να κωδικοποιεί μόνο τα πρώτα επτά αμινοξέα της γλυκοπρωτεΐνης Duffy. Το *DARK* βρίσκεται στην περιοχή (γενετικό τόπο) 1q23.2 [5].

Fya(Fy1) Fyb(Fy2): Στους λευκούς και στους Ασιάτες ο πολυμορφισμός Duffy αποτελείται από δύο αντιγόνα Fya και Fyb, που οδηγούν σε τρεις φαινότυπους Fya(a+b-), Fy(a+b+), και Fy(a-b+). Τα Fya και Fyb αλληλόμορφα αντιπροσωπεύουν ένα SNP στο εξώνιο 2 του *DARK*, που κωδικοποιεί τα Gly42 και Asp42 αντίστοιχα, στην αμινοτελική εξωκυτταρική περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης. Τα Fya και Fyb είναι πολύ ευαίσθητα στα περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης της παπαΐνης φυσίνης και βρωμελαΐνης, αλλά δεν καταστρέφονται από θρυψίνη [80].

Το Fy που είναι ένα τρίτο αλληλόμορφο, δεν παράγει γλυκοπρωτεΐνη Duffy συνεπώς δεν παράγει Fya ή Fyb και έχει μεγάλη συχνότητα μεταξύ των μαύρων. Στη Δυτική Αφρική

απαντάται σε ποσοστό άνω του 90%, ενώ στην Ευρώπη είναι μόνο 3%. Επίσης ο φαινότυπος Fy(a-b-) ανευρίσκεται στην Υεμένη, και σε μεγάλη συχνότητα στην Ιαπωνία και Κορέα.

Fy3, Fy4, Fy5 και Fy6: Πολύ σπάνια μη Αφρικανοί με Fy(a-b-) ερυθροκύτταρα είναι ομόζυγοι για απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα γονίδια *DARK*. Αυτά τα άτομα δεν έχουν γλυκοπρωτεΐνη Duffy στα ερυθρά τους και δεν θα ήταν αναμενόμενο να την έχουν σε οποιουδήποτε άλλους ιστούς. Το Fy5 επίσης απουσιάζει από τα κύτταρα του Fy(a-b-) φαινοτύπου, αλλά σε αντίθεση με τα Fy3, Fy5 λείπει από τα κύτταρα του φαινοτύπου Rh null [80].

Το αντιγόνο Fy5 φαίνεται να ορίζεται από την αλληλεπίδραση των γονιδίων Duffy και Rh. Το αντιγόνο Fy6 έχει περιγραφεί μόνο από μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού και δεν υπάρχει στα ερυθρά κύτταρα που είναι Fy (a-b-) και Fy: -3, -5 [77]. Τα αντιγόνα Fya, Fyb και Fy6 εντοπίζονται στο N-τελικό άκρο της γλυκοπρωτεΐνης Duffy και είναι ευαίσθητα στην μετουσίωση από πρωτεάσες όπως η φυσίνη, η παπαΐνη και η α-χυμοθρυψίνη, σε αντίθεση με τα Fy3 Fy4, Fy5 που δεν καταστρέφονται από την παπαΐνη [73].

Τα αντιγόνα Fy επιδεικνύουν το "φαινόμενο δόσης" κατά το οποίο άτομα ομόζυγα για ένα αλληλόμορφο έχουν περισσότερα αντιγόνα στα ερυθροκύτταρα τους από άτομα ετερόζυγα γι' αυτό το αλληλόμορφο.

Η πρωτεΐνη Duffy είναι υποδοχέας για το πλασμώδιο της ελονοσίας [81]. Οι λοιμώξεις από το *Plasmodium vivax* είναι σπάνιες στην υποσαχάρια Αφρική λόγω της απουσίας του αντιγόνου Duffy, του μοναδικού γνωστού ερυθροκυτταρικού υποδοχέα για τον προσδέτη εισβολής του μεροζοΐτη του πλασμωδίου, Duffy binding protein 1 (DBP1). Όμως έχουν καταγραφεί και λοιμώξεις για Duffy αρνητικά άτομα στην Αφρική, υποδηλώνοντας ότι το *P. Vivax* ίσως να χρησιμοποιεί και άλλους προσδέτες εκτός της DBP1 για να εισβάλλει σε αρνητικά κατά Duffy υποδοχέα ερυθροκύτταρα μέσω άλλων υποδοχέων [82]. Τα παραπάνω δεν αφορούν το *Plasmodium falciparum* της ελονοσίας που προσβάλλει ανεξάρτητα του Fy φαινότυπου. Θεωρείται ότι κάποιο προστατευτικό ρόλο για το *Plasmodium falciparum* παίζει η αιμοσφαιρίνη S(HbS). Τα αντιγόνα του συστήματος Duffy είναι καλώς ανεπτυγμένα στα βρέφη.

Πίνακας 4. Συχνότητα αντιγόνων & φαινοτύπων Duffy στον πληθυσμό

Frequency of Duffy antigens	Fy^a : 66% Caucasians, 10% Blacks, 99% Asians Fy^b : 83% Caucasians, 23% Blacks, 18.5% Asians Fy3 : 100% Caucasians, 32% Blacks, 99.9% Asians
Frequency of Duffy phenotypes	The Duffy null phenotype, Fy(a-b-), is very rare in Caucasians but is found in 68% of Blacks Fy(a+b+): 49% Caucasians, 1% Blacks, 9% Chinese Fy(a-b+): 34% Caucasians, 22% Blacks, <1% Chinese Fy(a+b-): 17% Caucasians, 9% Blacks, 91% Chinese

L. Dean. The Duffy blood group. Blood Groups and Red Cell Antigen 2005(9)

Αντισώματα για τα αντιγόνα του συστήματος Duffy

Τα αντισώματα Fya και Fyb σχετίζονται με αιμολυτική νόσο του νεογνού και αιμολυτική αντίδραση μετά μετάγγιση. Το συχνότερο αντίσωμα και το πιο δραστικό είναι το Fya ενώ το Fyb είναι σπανιότερο και πιο ήπιο.

Τα περισσότερα από τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τις ορολογικές δοκιμασίες καταστρέφουν τους αντιγονικούς καθοριστές του συστήματος. Έτσι τα αντισώματα Fya και Fyb συνήθως δίνουν αρνητικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι ελέγχου αντισωμάτων που περιλαμβάνουν ένζυμα [73]. Επίσης εκτός των παραπάνω έχουν περιγραφεί τα αντισώματα Fy3, Fy4, και Fy5 και Fy6 τα οποία είναι εξαιρετικά σπάνια.. Το αντι-Fy3 είναι ένα αντίσωμα που αντιδρά με όλα τα ερυθροκύτταρα εκτός από αυτά με Fy(a-b-) φαινότυπο. Σε αντίθεση με τα Fya και Fyb, το Fy3 είναι ανθεκτικό στις πρωτεάσες. Το αντι-Fy4 φαίνεται να αντιδρά με τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ατόμων με το σιωπηλό αλληλόμορφο Fy. Το αντίσωμα Fy5, καταδεικνύει πιθανή συγγένεια μεταξύ των συστημάτων Rhesus και Duffy τα γονίδια των οποίων πρέπει να σημειωθεί ότι βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα. Το αντι-Fy5 βρέθηκε μόνο σε άτομα με πολλαπλές μεταγγίσεις από την αφρικανική εθνότητα. Το αντι-Fy6 ήταν το σύμβολο που δόθηκε σε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που έδωσε ορολογικές αντιδράσεις παρόμοιες με του αντι-Fy3 [80].

Το αντι-Fy6 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού που περιγράφει ένα αντιγόνο υψηλής συχνότητας στην ίδια περιοχή με τα Fya και Fyb. Το αντίσωμα αντιδρά με όλα τα ερυθροκύτταρα Fy (a +) και / ή Fy (b +), δεν αντιδρά με Fy (a-b-), ερυθροκύτταρα [77].

Τα αντισώματα Fya ανιχνεύονται σε διάστημα μεγαλύτερο των 5 ετών μετά την ευαισθητοποίηση από το αντιγόνο [79].

III. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ KIDD

Το σύστημα Kidd περιλαμβάνει τρία αντιγόνα που βρίσκονται σε μία γλυκοπρωτεΐνη με 10 περιοχές που επεκτείνονται στη μεμβράνη, κυτταροπλασματικά N- και C- τελικά άκρα, και μία θέση εξωκυτταρικής N- γλυκοζυλίωσης [80]. Λειτουργούν ως μεταφορείς ουρίας σε ενδοθηλιακά κύτταρα του νεφρού [83].

Το γονίδιο *Kidd* (*SLC14A1*) περιέχει 11 εξώνια, με τα εξώνια 4 έως 11 να κωδικοποιούν την ώριμη πρωτεΐνη και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18q12.3 [5, 84]. Το σύστημα Kidd ανακαλύφθηκε το 1951 και αποτελείται από 2 αντιθετικά αντιγόνα, Jka και Jkb, μαζί με ένα τρίτο Jk3. Το αντιγόνο Jk3 εκφράζεται σε όλα τα άτομα εκτός από αυτά με τον σπάνιο φαινότυπο Kidd-null. Έτσι απαντώνται τέσσερις φαινότυποι Kidd: Jk (a + b-), Jk (a-b +), Jk (a + b +) και Jk (a-b-).

Τα αντιγόνα Jka(JK1) και Jkb(JK2) είναι τα προϊόντα των αλληλόμορφων που αντιπροσωπεύουν τα Asp280 και Asn280 στον τέταρτο εξωτερικό βρόχο της γλυκοπρωτεΐνης Kidd. Έχουν παρόμοιο επιπολασμό σε λευκούς και Ασιάτες αλλά η παρουσία του αντιγόνου Jka είναι πιο συχνή από το Jkb στη μαύρη φυλή. Τα αντιγόνα Kidd είναι ανθεκτικά σε πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η παπαΐνη και η φυσίνη.

Ο φαινότυπος null Jk(a-b-) Jk:-3, συνήθως προκύπτει από ομοζυγωτία για ένα σιωπηλό γονίδιο στον τόπο *Jk*. Αν και είναι πολύ σπάνιος στους περισσότερους πληθυσμούς, ο φαινότυπος null είναι σχετικά κοινός στα άτομα πολυνησιακής καταγωγής με συχνότητα περίπου 1/400. Το πολυνησιακό αλληλόμορφο null περιέχει μια μετάλλαξη θέσης ματίσματος στο ιντρόνιο 5, με αποτέλεσμα την απώλεια του εξώνιου 6 από το mRNA. Στους Φιλανδούς όπου το Jk (a-b-) είναι λιγότερο σπάνιο από ότι σε άλλους Ευρωπαίους η υπεύθυνη μετάλλαξη κωδικοποιεί μια υποκατάσταση Ser291Pro. Τα ανοσοποιημένα άτομα με φαινότυπο Jk(a-b-) μπορεί να παράγουν αντι-Jk3. Μια εξαιρετικά σπάνια μορφή του φαινοτύπου Jk(a-b-) βρέθηκε σε μελέτη σε ιαπωνικό πληθυσμό από την ετεροζυγωτία για έναν κυρίαρχο αναστολέα *In(Jk)* σε αναλογία με τον κυρίαρχο αναστολέα *In(Lu)* των Lutheran και άλλων αντιγόνων. Πολύ ασθενής έκφραση του Jka και /ή Jkb μπορεί να ανιχνευθεί σε ερυθρά *In(Jk)* με δοκιμασίες προσρόφησης/έκλουσης [80].

Τα αντιγόνα Kidd είναι λιγότερο αντιγονικά σε σύγκριση με τα Rh και Kell. Ενοχοποιούνται κυρίως για πρόκληση επιβραδυνόμενων αιμολυτικών αντιδράσεων εξαιτίας της ισχυρής αναμνηστικής απόκρισης από αντισώματα Kidd. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα μνήμης που παράγονται κατά την πρώτη αντιγονική έκθεση εκθέτουν μια αυξημένη ανταπόκριση αντισώματος σε επακόλουθη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο [85]. Ο φαινότυπος Kidd-null που είναι εξαιρετικά σπάνιος στις περισσότερες εθνικότητες είναι κλινικά σημαντικός λόγω της ικανότητας εκείνων με φαινότυπο Kidd-null να παράγουν αντισώματα κατευθυνόμενα κατά του αντιγόνου Jk3 [86]. Τα Kidd αντιγόνα είναι ανεπτυγμένα κατά τη γέννηση.

Πίνακας 5. Συχνότητα των αντιγόνων & φαινότυπων Kidd στον πληθυσμό

Frequency of Kidd antigens	Jk^a: 77% Caucasians, 92% Blacks, and 73% Asians Jk^b: 74% Caucasians, 49% Blacks, and 76% Asians Jk3: 100% in most populations, >99% in Polynesians
Frequency of Kidd phenotypes	Jk(a+b+): 50% Caucasians, 41% Blacks, 49% Asians Jk(a+b-): 26% Caucasians, 51% Blacks, 23% Asians Jk(a-b+): 23% Caucasians, 8% Blacks, 27% Asians JK(a-b-): Rare in most populations, found in 0.9% Polynesians

L. Dean. The Kidd blood group. Blood Groups and Red Cell Antigen 2005(10)

Αντισώματα για τα αντιγόνα του συστήματος Kidd

Το αντι-Jka (ανακαλύφθηκε το 1951) και το αντι-Jkb (ανακαλύφθηκε το 1953) είναι αντισώματα που προκαλούν συνήθως ήπια αιμολυτική νόσο στα νεογνά [87] και είναι συνήθως τύπου IgG1 και IgG3. Τόσο το Jka όσο και το Jkb αντιδρούν καλύτερα με την έμμεση δοκιμασία Coombs αλλά μερικά αντισώματα αντιδρούν και σε εναιώρημα φυσιολογικού ορού. Συχνά η ανίχνευσή τους είναι δύσκολη διότι παρουσιάζουν ασθενή αντίδραση και γιατί ανιχνεύονται εμμέσως διαμέσου της σύνδεσης με το συμπλήρωμα (κίνδυνος ενδοαγγειακής αιμόλυσης). Γενικά μπορεί να είναι απαραίτητη η ανίχνευσή τους με ερυθρά επεξεργασμένα με ένζυμο. Τα αντι-Jka και Jkb ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο σε ασθενείς που εξετάζονται σε διάστημα εντός 3 μηνών από την ευαισθητοποίηση από το αντιγόνο [79]. Περίπου το 50% των Jka και Jkb αντισωμάτων δεσμεύουν το συμπλήρωμα και προκαλούν ενδοαγγειακή αιμόλυση.

Τα αλλοαντισώματα Kidd έχουν την ικανότητα να προκαλούν σοβαρή οξεία αιμολυτική αντίδραση (AHTR) και επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση μετά μετάγγιση (DHTR) [88]. Αναφέρεται ότι πάνω από το ένα τρίτο των DHTR προκαλούνται από το αντι-Jka [85]. Τα αντισώματα Kidd επιδεικνύουν επίσης το φαινόμενο δόσης. Συνήθως συνυπάρχουν και με άλλα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα.

IV. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ MNS

Το σύστημα MN είναι το δεύτερο μετά το ABO σύστημα ομάδων αίματος που ανακαλύφθηκε το 1927 ενώ τα αντιγόνα S και s περιγράφηκαν το 1947 και 1951 αντίστοιχα. Το MNS είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σύστημα ομάδων αίματος που αποτελείται από 46 αντιγόνα, με τα αντιγόνα MNSs και U να είναι τα πιο σημαντικά αντιγόνα του συστήματος MNS σε σχέση με τη μεταγγισιοθεραπεία [77]. Όπως και με το σύστημα Rh, μεγάλο μέρος της πολυπλοκότητας προκύπτει από ανασυνδυασμό μεταξύ στενά συνδεδεμένων ομόλογων γονιδίων. Τα αντιγόνα του συστήματος MNS βρίσκονται στη μία ή και στις δύο γλυκοπρωτεΐνες: γλυκοφορίνη A (GPA, CD235A) και γλυκοφορίνη B [11] (GPB, CD235B). Τα αντιγόνα M και N βρίσκονται στη γλυκοφορίνη A (glycophorin A- GPA) ή α-γλυκοπρωτεΐνη και τα αντιγόνα S,s και U εντοπίζονται στη γλυκοφορίνη B (glycophorin B- GPB) ή δ-γλυκοπρωτεΐνη [89,90]. Κάθε γλυκοπρωτεΐνη διαπερνά τη μεμβράνη μία φορά με ένα εξωτερικό N-τελικό άκρο (GPA, 72 αμινοξέα; GPB, 44 αμινοξέα) και ένα C-τελικό κυτταροπλασματικό άκρο (GPA, 36, GPB, 8). Οι εξωκυτταρικές περιοχές και των δύο μορίων έχουν πολλές Ο-γλυκάνες πλούσιες σε σιαλικό οξύ. Η GPA είναι N-γλυκοζυλιωμένη στην ασπαραγίνη-45 (26 σε φυσική πρωτεΐνη), ενώ η GPB δεν είναι N-γλυκοζυλιωμένη. Η μακρά κυτοσολική ουρά της GPA αλληλοεπιδρά με τον κυτταροσκελετό. Η GPA έχει περίπου 106 αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο αλλά η GPB έχει περίπου 200.000 αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο [80]. Η GPB είναι μικρότερη γλυκοπρωτεΐνη και φέρει τα αντιγόνα S, s, και U. Η GPB που εκφράζει το αντιγόνο S έχει μεθειονίνη στη θέση 29, ενώ η GPB που φέρει το αντιγόνο s έχει θρεονίνη στην ίδια θέση. Στο αμινοτελικό άκρο της GPB υπάρχει ένα τμήμα από 26 αμινοξέα, τα οποία έχουν ταυτόσημη αλληλουχία με το αμινοτελικό άκρο της GPA^N. Αυτό είναι υπεύθυνο για ένα N αντιγόνο σε όλα τα ερυθρά που έχουν φυσιολογικούς MNSs τύπους. Ερυθρά που στερούνται την GPB χάνουν όχι μόνο τα Ss και U αντιγόνα, αλλά και τα N.

Πίνακας 6. Συχνότητα των αντιγόνων & φαινοτύπων MNSs U στον πληθυσμό

Frequency of MNS antigens (%)	M: 78% Caucasians, 74% Blacks N: 72% Caucasians, 75% Blacks S: 55% Caucasians, 31% Blacks s: 89% Caucasians, 93% Blacks												
Frequency of MNS phenotypes (%)	M+N+S-s+: 22% Caucasians, 33% Blacks M+N+S+s+: 24% Caucasians , 13% Blacks M-N+S-s+: 15% Caucasians, 19% Blacks M+N-S+s+: 14% Caucasians, 7% Blacks M+N-S-s+: 8% Caucasians, 16% Blacks M-N+S+s+: 6% Caucasians, 5% Blacks M+N-S+s: 6% Caucasians, 2% Blacks Less common phenotypes are M+N+S+s- (4% Caucasians, 2% Blacks) and M-N+S+s- (1% Caucasians, 2% Blacks). The phenotypes M+N-S-s-, M+N+S-s-, and M-N+S-s- are rare in Caucasians but are found in ~0.5% of Blacks <table><tr><td>S+s-U+</td><td>11% Caucasians</td><td>3% Blacks</td></tr><tr><td>S+s+U+</td><td>44% Caucasians</td><td>28% Blacks</td></tr><tr><td>S-s+U+</td><td>45% Caucasians</td><td>69% Blacks</td></tr><tr><td>S-s-U-</td><td>0% Caucasians</td><td><1% Blacks</td></tr></table>	S+s-U+	11% Caucasians	3% Blacks	S+s+U+	44% Caucasians	28% Blacks	S-s+U+	45% Caucasians	69% Blacks	S-s-U-	0% Caucasians	<1% Blacks
S+s-U+	11% Caucasians	3% Blacks											
S+s+U+	44% Caucasians	28% Blacks											
S-s+U+	45% Caucasians	69% Blacks											
S-s-U-	0% Caucasians	<1% Blacks											

1. L. Dean. *The MNS blood group. Blood Groups and Red Cell Antigen* 2005(12)

2. *Other Blood Groups. AABB* 2005;15:335-338

Αντισώματα για τα αντιγόνα του συστήματος MNS

Τα αντισώματα M και N δρουν συνήθως σε χαμηλές θερμοκρασίες και γι' αυτό δεν έχουν κλινική σημασία [11]. Τα αντι-M ανευρίσκονται συχνά στον ορό ατόμων χωρίς να έχει προηγηθεί μετάγγιση αίματος. Είναι κυρίως IgM, αλλά και IgG, και προκαλούν συγκόλληση σε εναιώρημα φυσιολογικού ορού σε θερμοκρασία δωματίου. Επειδή τα αντιγόνα M βρίσκονται σε μεγάλη πυκνότητα πάνω στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να προκληθεί συγκόλληση σε εναιώρημα φυσιολογικού ορού όπως αυτό γίνεται και με τα αντισώματα του συστήματος ABO. Είναι ψυχρά αλλά έχουν συνήθως μεγάλο θερμικό εύρος από 4-37 °C και είναι κλινικά σημαντικά όταν δρουν στους 37 °C [91].

Τα αντισώματα M και N δεν αντιδρούν με ερυθρά επεξεργασμένα με ένζυμο (τα πρωτεολυτικά ένζυμα αποσπούν τις σιαλογλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης του ερυθρού και εξαφανίζουν την αντίδραση των αντι-M και αντι-N με τα αντίστοιχα αντιγόνα) [80]. Τα αντισώματα M και N σπάνια προκαλούν αιμολυτική νόσο του νεογνού [11] σε αντίθεση με

τα SsU που εκτός από HDFN μπορεί να προκαλέσουν αιμολυτική αντίδραση μετά μετάγγιση [92,93].

V. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LUTHERAN

Το σύστημα Lutheran ανακαλύφθηκε το 1946 από τους Gallender και Race. Είναι ένα πολύπλοκο σύστημα που περιλαμβάνει 20 αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων τεσσάρων αντιθετικών ζευγών: Lua /Lub (His77Arg), Lu6 / Lu9 (Ser275Phe), Lu8 /Lu14, (Met204Lys) και Aua / Aub (Thr529Ala) [94].

Εδράζουν στο γονίδιο 19q 12- q13 [11] σε στενή σύνδεση με το γονίδιο Se.

Τα άλλα αντιγόνα Lutheran είναι υψηλής συχνότητας σε όλους τους πληθυσμούς που ελέγχθηκαν. Το Lua (LU1) έχει συχνότητα περίπου 8% στους Ευρωπαίους και στους Αφρικανούς, αλλά είναι σπάνιο αλλού. Το αντιθετικό αντιγόνο, Lub (LU2), είναι κοινό. Ένας άλλος πολυμορφισμός τα Aua (LU18) και Aub (LU19) έχουν συχνότητα περίπου 80% και 50%, αντίστοιχα, στους λευκούς. Τα αντιγόνα Lutheran καταστρέφονται μετά από επεξεργασία των ερυθρών με θρυψίνη ενώ ελαχιστοποιείται η αντίδρασή τους μετά από επεξεργασία με παπαΐνη και φυσίνη. Τα αντιγόνα Lutheran βρίσκονται σε ένα ζεύγος γλυκοπρωτεϊνών μονής διέλευσης, έχουν πέντε εξωκυτταρικούς τομείς IgSF και διαφέρουν από το μήκος των κυτοπλασμικών περιοχών τους. Οι Lutheran γλυκοπρωτεΐνες συνδέουν την εξωκυττάρια θεμέλια γλυκοπρωτεΐνη λαμινίνη και μπορούν να δρουν ως μόρια προσκόλλησης [95]. Εμφανίζεται ο εξαιρετικά σπάνιος φαινότυπος Lu null από την ομοζυγωτία για τα ανενεργά γονίδια LU.18 και μπορεί να οφείλεται σε 3 γενετικά υποστρώματα: α) Ομοζυγωτία για ένα μη παραγωγό Lutheran γονίδιο β) Ετεροζυγωτία για ένα επικρατές γονίδιο που καταστέλλει τη λειτουργία του Lutheran γονιδίου γ) Παρουσία σε άνδρες ενός φυλοσύνδετου γονιδίου (στο Χ-χρωμόσωμα) που καταστέλλει τη λειτουργία του Lutheran γονιδίου. Τα συχνότερα αντιγόνα είναι τα Lua και τα Lub.

Πίνακας 7. Συχνότητα των αντιγόνων και φαινότυπων Lutheran στον πληθυσμό

Αντιγόνα	Φαινότυποι	Γονότυποι	Συχνότητα
Lua 3,5%	Lu(a+b+)	Lua Lub	6.8%
Lub 96,5%	Lu(a+b-)	Lua Lua	0,1%
	Lu(a-b+)	Lub Lub	93.1%
	Lu(a-b-)	Lu ³	πολύ σπάνια

G. Daniels.Lutheran.Immunohematology 2009;25:152-159

Αντισώματα για τα αντιγόνα του συστήματος Lutheran

Το αντίσωμα Lutheran ανακαλύφθηκε όταν στον ορό ασθενούς που είχε μεταγγιστεί πολλές φορές βρέθηκε άγνωστο μέχρι τότε αντίσωμα. Το αντίσωμα ονομάστηκε Lua. Αργότερα βρέθηκε το αντίσωμα αντι-Lub σε άτομο που παρουσίαζε τον σπάνιο γονότυπο Lua/Lua. Μετέπειτα βρέθηκε και το αντίσωμα αντι- Lua και αντι-Lub (αντι-Lu3).

Τα αντισώματα Lua και Lub δεν έχουν μεγάλη κλινική σημασία, διότι δεν προκαλούν αιμολυτική νόσο του νεογνού δεδομένου ότι τα αντίστοιχα αντιγόνα δεν είναι αναπτυγμένα κατά τη γέννηση [96]. Επίσης σπάνια αναφέρονται περιπτώσεις επιβραδυνόμενης αιμολυτικής αντίδρασης μετά μετάγγιση από αυτά τα αντισώματα [11]. Τα συγκεκριμένα δημιουργούν μικρού ή μετρίου μεγέθους χαλαρές συγκολλήσεις μεταξύ ελεύθερων ερυθρών.

Τα περισσότερα Lutheran αντισώματα δεν αντιδρούν με τα ερυθρά κύτταρα που έχουν υποστεί επεξεργασία με βρωμιούχο 2-αμινοαιθυλο-ισοθειουρόνιο (AET) ή διθειοθρεϊτόλη (DTT), τα οποία μειώνουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς της ανοσοσφαιρίνης (IgSF) [97].

VI. ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CHIDO

Αντιγόνα και αντισώματα

Τα αντιγόνα Chido που ανήκουν στην κατηγορία των HTLA (High-titer, Low-avidity) αντισωμάτων έχουν αναγνωριστεί ως το 017 σύστημα ομάδων αίματος στο ISBT. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6q21.3. Το αντιγόνο Chido (Cha) ανευρίσκεται σε ποσοστό 98% στους Καυκάσιους. Τα αντισώματα Chido είναι IgG και κυρίως IgG2 και IgG4. Το αντίσωμα Chido αντιδρά με σχεδόν όλα τα διαθέσιμα ερυθρά ελέγχου καθώς το

αντίστοιχο αντιγόνο είναι υψηλής συχνότητας και εκφράζεται στα ερυθρά της πλειοψηφίας των αιμοδοτών.

Μια σημαντική επιτυχία επιτεύχθηκε όταν ανακαλύφθηκε ότι το πλάσμα όλων των Cha(+) ατόμων περιέχει την ουσία (αντιγόνο) Chido που είναι ικανό να αναστείλει ειδικά το αντι-Chido αντίσωμα [98,99,100].

Ο ορός των περισσότερων τυχαίων αιμοδοτών περιέχει διαλυτές Cha αντιγονικές ουσίες, που είναι σε θέση να εξουδετερώσουν αντι-Cha αντισώματα. Αυτά τα αντισώματα αποτυγχάνουν να αντιδράσουν με ερυθρά επεξεργασμένα με ένζυμο. Αν ένα HTLA αντίσωμα παρουσιάζει και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά μπορεί να υπάρχουν υποψίες ότι το αντίσωμα μπορεί να είναι αντι-Cha. Επιπλέον η χρήση των τεχνικών αναστολής του ορού και η χρήση επεξεργασμένων με ένζυμο ερυθρών μπορεί να βοηθήσει περαιτέρω στην ανίχνευση άλλων αλλοαντισωμάτων ομάδων αίματος [101]. Το Chido έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται στενά με το σύστημα HLA και ότι το αντιγόνο εντοπίζεται στο C4 συστατικό του συμπληρώματος [102]. Τα αντισώματα Chido βρίσκονται στον ορό πολυμεταγγιζόμενων ατόμων ή πολύτοκων γυναικών και ανιχνεύονται με την τεχνική του αντισφαιρινικού ορού και με IgG αντιορούς. Συνήθως δεν δεσμεύουν το συμπλήρωμα [102]. Και τα δύο συνδέονται ασθενώς με τα ερυθροκύτταρα και υπόκεινται σε αυτόματη έκλυση. Εκτός από την πολύ εύθραυστη συγκόλληση εύκολα διασπώνται. Η επεξεργασία με ένζυμο επηρεάζει δυσμενώς την αντίδραση των αντισωμάτων Chido και οι αντιδράσεις μπορεί να είναι ασθενέστερες ή ανύπαρκτες.

Συμπερασματικά τα αντισώματα Chido μπορεί να αναγνωριστούν α) από τις εύθραυστες συγκολλήσεις β) τις ασθενείς αντιδράσεις με ερυθρά ομφαλίου λώρου ή ερυθρά ενηλίκων κατεργασμένα με ένζυμο και γ) από την μερική ή πλήρη αναστολή τους από πλάσμα ασύμβατων δοτών.

Η ανακάλυψη της ουσίας Chido στο πλάσμα έδωσε τη δυνατότητα να γίνει μεγαλύτερη πρόοδος για το χαρακτηρισμό αντι-Chido [100].

Πίνακας 8. Αναστολή του αντι-Cha με τη μέθοδο τιτλοποίησης

<u>Ουσίες που προστίθενται</u>	<u>Αραίωση του αντι-Cha</u>						
	1	2	4	8	16	32	φο
+ φ.ο	2	1	1	w	0	0	0
+ Ch(a-) ορός	2	1	1	1	W	0	0
+ Ch(a+) ορός	0	0	0	0	0	0	0

W= ασθενές

Suzan D. Rolih et al. Recognition and Resolution of High-Titer, Low-Avidity Antibodies. American Association of Blood Banks, 1979 pp1-47.

Στον πίνακα 8 φαίνονται οι τεχνικές που εφαρμόζεται για την αναστολή του αντισώματος Chido.

Οι ουσίες που προστίθενται στον ορό ασθενούς με αντι-Cha αντίσωμα είναι: α) φυσιολογικός ορός που εξασθενεί την αντίδραση λόγω της αραίωσης που υφίσταται το δείγμα, β) Cha(-) ορός που δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα, και γ) Cha(+) ορός που εξουδετερώνει τα αντισώματα Cha με αποτέλεσμα να παρακάμπτεται το εργαστηριακό πρόβλημα και να επιδεικνύονται συμβατές μεταγγίσεις. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω του ότι ο ορός των περισσότερων τυχαίων αιμοδοτών περιέχει διαλυτές Cha αντιγονικές ουσίες, που είναι σε θέση να εξουδετερώσουν αντι-Cha αντισώματα.

Τα HTLA αντισώματα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στην αντιδραστικότητα με τα ερυθρά ελέγχου και τα ερυθρά των αιμοδοτών, συχνά μιμούνται πολλαπλά αλλοαντισώματα και έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με ιστορικό πολλών μεταγγίσεων [104,105]. Ωστόσο με προσεκτική εξέταση όλων των φάσεων των δοκιμασιών μπορεί να φανεί η παρουσία πολλαπλών ειδικοτήτων. Η αντιδραστικότητα στους 20°C μπορεί να υποδείξει αντι-P₁, αντι-Lea αντι-M κ.τ.λ., και η χρήση ερυθρών επεξεργασμένων με ένζυμο στους 37°C μπορεί να υποδείξει εικόνα αντι-Kell και Rh αντισωμάτων.

Είναι αρκετά κοινή η παρουσία HTLA αντισωμάτων και άλλων αλλοαντισωμάτων μαζί. Μερικά από τα υποκείμενα αντισώματα είναι κλινικά σημαντικά: Το αντι-Vel, αντι-Kell, αντι-E, αντι-C, αντι-c, αντι-S, αντι-Fya, αντι-Jka, αντι-Jkb [106].

Τα Chido αντισώματα είναι IgG και ικανά να διαπεράσουν τον πλακούντα. Ωστόσο δεν είναι πιθανή η ευαισθητοποίηση του νεογνού λόγω του ελεύθερου αντιγόνου στο πλάσμα και της ασθενούς έκφρασης των αντιγόνων στα ερυθρά του νεογνού [107].

Ch αυτοαντισώματα είναι υπεύθυνα για θετική DAT που εμφανίστηκε σε γυναίκα στην 35^η εβδομάδα της κύησης και αρνητικοποιήθηκε λίγους μήνες μετά τον τοκετό. Αυτό συνέβη σε δύο εγκυμοσύνες και στις δύο περιπτώσεις τα νεογνά είχαν DAT αρνητική [103].

Έχει αναφερθεί ότι στους νοσοκομειακούς ασθενείς 1,5 % των ορών τους περιέχουν αντι-Bg αντισώματα και στους ορούς που περιέχουν ισχυρά αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα το ποσοστό φθάνει το 34% [108].

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ – ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα είναι πρωτεΐνες του τύπου των γ-σφαιρινών που λέγονται και ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins-Ig) και όλες έχουν δύο λειτουργίες: να δεσμεύουν ξένα αντιγόνα που εισβάλλουν στον ξενιστή και να μεσολαβούν με δραστικές λειτουργίες για την εξουδετέρωση ή την εξάλειψη ξένων εισβολέων [109].

Φέρουν 4 αλυσίδες : 2 βαριές (H = heavy) που μπορεί να είναι γ-IgG, μ-IgM, α-IgA, ε-IgE, δ-IgD και 2 ελαφριές (L = light κ, λ). Οι ανοσοσφαιρίνες ανάλογα με το είδος της βαριάς τους αλυσίδας κατατάσσονται σε τάξεις IgM, IgG, IgA, IgD και IgE [109,110,111].

Τα αντισώματα IgG είναι σημαντικά στη λειτουργία της ανοσοποιητικής δράσης και διαίρουνται σε τέσσερις υποτάξεις: IgG1 έως IgG4. Κάθε υποτάξη έχει μια διαφορετική σταθερή περιοχή, που συνιστά ξεχωριστές περιοχές Fc. Κάθε τομέας Fc έχει διαφορετική ικανότητα για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και / ή την αλληλεπίδραση με υποδοχείς Fc των μακροφάγων.

- **IgG1:** ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και έχει συγγένεια με τον Fc υποδοχέα των μακροφάγων και σχετίζεται με αιμόλυση σε ποσοστό 75% (πρέπει IgG1/RBC>950)
- **IgG2:** ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και συνήθως έχει χαμηλή συγγένεια με τον Fc υποδοχέα των μακροφάγων και σπάνια σχετίζεται με αιμόλυση.
- **IgG3:** ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και έχει υψηλή συγγένεια με τον Fc υποδοχέα των μακροφάγων και σχετίζεται με αιμόλυση σε ποσοστό 100% μέσω μακροφάγων ακόμη και όταν ο αριθμός τους είναι τόσο μικρός που δεν φτάνει να θετικοποιήσει την DAT.
- **IgG4:** δεν ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, δεν αναγνωρίζεται από τον Fc υποδοχέα των μακροφάγων και δεν σχετίζεται με αιμόλυση [112].

Αν και υπάρχουν αρκετές οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος, η κύρια αφορά την "κλασική οδό", η οποία ξεκινά από την σύνδεση αντιγόνου αντισώματος που ενεργοποιεί τον C1 παράγοντα του συμπληρώματος. Λόγω της πενταμερούς δομής τους, τα IgM αντισώματα είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Η δομή IgM υφίσταται μετασχηματιστική μετατόπιση κατά την πρόσδεση αντιγόνου, εκθέτοντας έτσι θέσεις δεσμεύσεως συμπληρώματος. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι τόσο ισχυρή ώστε ένα μόνο μόριο IgM που συνδέεται με το αντιγόνο είναι αρκετό να ενεργοποιήσει την κλασική οδό του συμπληρώματος (τον παράγοντα C1). Αντίθετα, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από την IgG δεν είναι τόσο ισχυρή και απαιτεί την

σύνδεση τουλάχιστον δύο μορίων IgG με το αντιγόνο για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος [110].

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα αποτελούν ένα μικρό υποσύνολο των ανοσοσφαιρινών και είναι συνήθως IgM (μοριακού βάρους περίπου 900.000-1.000.000 Da) και IgG (μοριακού βάρους περίπου 300.000 Da). Τα ερυθροκυτταρικά αντισώματα μπορεί να είναι φυσικά ή άνοσα.

Ένα αντίσωμα λέγεται φυσικό όταν βρεθεί στον ορό ατόμου που δεν έχει ποτέ μεταγγιστεί με ερυθρά αιμοσφαίρια που φέρουν το αντίστοιχο αντιγόνο ή δεν έχει προηγηθεί εγκυμοσύνη εμβρύου με το αντίστοιχο αντιγόνο. Τα αντισώματα αυτά είναι συνήθως IgM ψυχρά και συνδέουν το συμπλήρωμα [115].

Φυσικά αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα είναι οι ανοσοσφαιρίνες αντι-A, αντι-B και αντι-H του συστήματος ABO. Η παρουσία τους θεωρείται πολύ χρήσιμη γιατί μας πιστοποιεί απόλυτα τις ομάδες αίματος ως προς το σύστημα ABO [1,2,10].

Ο όρος “φυσικά” αντισώματα δεν είναι απολύτως ακριβής. Τα φυσικά αντισώματα είναι άνοσα αντισώματα αλλά η ανοσοποίηση αφορά συνήθως επαφή με αντιγόνο μέσω των τροφών και όχι μέσω μετάγγισης ή κύησης.

Άνοσα είναι τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα που ανιχνεύονται μετά από γνωστή ανοσοποίηση μέσω μετάγγισης ή κύησης.

1. ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ ΚΑΙ γ - ΣΦΑΙΡΙΝΕΣ

Ανοσοσφαιρίνες λέγονται τα αντισώματα και οι δομικά σχετιζόμενες με αυτά πρωτεΐνες του ορού και των λοιπών βιολογικών υγρών του οργανισμού.

Οι πρωτεΐνες του ορού διαχωρίζονται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πέντε κλάσματα: τη λευκωματίνη, τις α1-σφαιρίνες, τις α2-σφαιρίνες, τις β-σφαιρίνες και τις γ-σφαιρίνες. Πειραματικές μελέτες σε ανοσοποιημένα κουνέλια, είχαν από παλιά δείξει ότι οι γ-σφαιρίνες ήταν τα ίδια τα αντισώματα του οργανισμού. Έτσι οι δύο έννοιες γ-σφαιρίνες και αντισώματα, συνέπιπταν απόλυτα ως προς το οριζόμενο αντικείμενο.

Το 1953 με την εισαγωγή της μεθόδου της ανοσοηλεκτροφόρησης στη μελέτη των πρωτεϊνών, φάνηκε ότι όλες οι γ-σφαιρίνες δεν είναι αντισώματα, και ότι όλα τα αντισώματα δεν είναι γ-σφαιρίνες. Μετά από όλα αυτά έγινε αποσαφήνιση ότι ο όρος γ-σφαιρίνη δεν είναι ταυτόσημος με τον όρο αντίσωμα. Έτσι το 1959 εισήχθη ο όρος

«ανοσοσφαιρίνη» (Immunoglobulin), προκειμένου να υποδηλωθεί κάθε πρωτεΐνη με αντισωματικές ιδιότητες ανεξάρτητα από την ηλεκτροφορητική της κινητικότητα.

2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Οι ανοσοσφαιρίνες παράγονται κατά κύριο λόγο στα πλασματοκύτταρα, και κατά ένα σχετικά μικρό ποσοστό στα διεγερμένα β- λεμφοκύτταρα [111]. Οι IgG παράγονται στους λεμφαδένες, το σπλήνα και το μυελό. Εισερχόμενες στην κυκλοφορία, περνούν στους ιστούς. Οι IgA παράγονται κατά το μεγαλύτερο μέρος τους στους υποβλεννογόνιους χιτώνες των κοίλων σπλάχνων, ιδιαίτερα του πεπτικού και του πνεύμονα. Ελευθερώνονται και αναμιγνύονται με τις βλεννογονικές εκκρίσεις. Οι IgM συντίθενται κατά βάση στο σπλήνα, κυκλοφορούν στο αίμα και δύσκολα περνούν στους ιστούς [109].

Ο χρόνος ημίσειας ζωής των IgG ανοσοσφαιρινών στο πλάσμα έχει υπολογιστεί σε 23 ημέρες, των IgA και IgM σε 6 και 5 ημέρες αντίστοιχα.

3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΛΛΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Αντιερυθροκυτταρικά αλλοαντισώματα λέγονται τα αντισώματα που έχουν παραχθεί μετά από ευαισθητοποίηση έναντι των αντιγόνων που απουσιάζουν από τα ερυθροκύτταρα [129].

Η ανοσολογία βασίζεται στη μνήμη, στην ειδικότητα και στην αναγνώριση του «ξένου» και στοχεύει στην προφύλαξη από τη νόσο.

Η αλλογενής μετάγγιση αίματος είναι μια μορφή μεταμόσχευσης. Μέσω αυτής της διαδικασίας προάγεται η είσοδος “ξένων” αντιγόνων στο λήπτη, τα οποία παραμένουν για ποικίλο χρονικό διάστημα. Η πρώτη επαφή με έναν ξένο οργανισμό καταγράφεται ως πληροφορία (μνήμη), ώστε ο οργανισμός να τον αναγνωρίσει και να τον εξουδετερώσει στο μέλλον. Η προστασία είναι «ειδική» και στρέφεται μόνο κατά του συγκεκριμένου παράγοντα που ο οργανισμός τον θεωρεί «ξένο». Ένας ανοσοεπαρκής λήπτης συχνά εκφράζει μια ανοσολογική απάντηση στα αντιγόνα του δότη.

Οι ανοσολογικές συνέπειες της μετάγγισης αίματος μπορεί να είναι η ανοσοποίηση, ανοσοκαταστολή, ή η αναφυλαξία του δέκτη ή είναι πιθανό να μη διαπιστωθεί καμία από τις επιπλοκές αυτές. Είναι δυνατόν κατά τη μετάγγιση αίματος και των παραγώγων του να

προκληθεί η παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ερυθρών, των λευκών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων, ή και των πρωτεϊνών του πλάσματος [130].

Παθοφυσιολογικά η ανοσοποίηση στα ερυθροκύτταρα περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια, συμπεριλαμβανομένων της αναγνώρισης, επεξεργασίας και παρουσίασης του αντιγόνου από HLA τάξης II σε TCR, ενεργοποίηση βοηθητικών CD4 T κυττάρων, αλληλεπίδραση μεταξύ B και T κυττάρων, και τέλος διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα [131].

Μελέτες σε ποντικούς και ανθρώπους έχουν δείξει ότι η διαδικασία αλλοανοσοποίησης σε αντιγόνα RBC μπορεί να ρυθμιστεί σε κάθε στάδιο μέσω επίκτητων και γενετικών παραγόντων. Οι αντιγονικές διαφορές μεταξύ RBC δότη και λήπτη είναι απαραίτητες για την αρχική ενεργοποίηση της αλλοανοσοποίησης. Επιπλέον, οι γυναίκες παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό αλλοανοσοποίησης, το οποίο εξηγείται εν μέρει από την έκθεση σε ξένα αντιγόνα κατά την εγκυμοσύνη [52]. Δεν αναπτύσσουν όλοι οι ασθενείς αλλοαντισώματα μετά την έκθεση σε ξένα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Μια μελέτη μαθηματικής μοντελοποίησης υποστήριξε την υπόθεση ότι παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, συμπεριλαμβανομένης της φύσης της υποκείμενης νόσου, επηρεάζουν την αλλοανοσοποίησή του.

Η ανοσολογική απάντηση (αντίδραση) του ανοσολογικού συστήματος στην είσοδο ενός αντιγόνου, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα (χυμική απάντηση) ή σε διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων με πολλαπλές λειτουργίες (κυτταρική απάντηση) [114].

Ο μηχανισμός παραγωγής των αλλοαντισωμάτων όπως προαναφέρθηκε απαιτεί τη συνεργασία πολλών κυτταρικών υποπληθυσμών όπως των B, των T λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων και διακρίνεται σε διάφορα στάδια [110].

Η αντίδραση ενός οργανισμού μετά την πρώτη επαφή (έκθεση) με ένα αντιγόνο λέγεται πρωτογενής απάντηση. Κατά την πρώτη μετάγγιση η παραγωγή αντισωμάτων έναντι των αλλοαντιγόνων είναι μικρής ποσότητας και βραδεία.

Στην περίπτωση ανοσολογικής απάντησης με παραγωγή αντισώματος, διακρίνουμε 3 φάσεις: Η λανθάνουσα περίοδος, που η διάρκειά της κυμαίνεται από μερικές ημέρες έως μερικές βδομάδες, η σύνθεση του αντισώματος και η ακόλουθη προοδευτική μείωση του τίτλου του αντισώματος.

Η αναμνηστική ή δευτερογενής απάντηση αφορά την παραγωγή αντισώματος μετά από δεύτερη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο [114].

Αναπτύσσεται κατά τις επόμενες μεταγγίσεις και χαρακτηρίζεται από την ταχεία παραγωγή σχετικά μεγάλης ποσότητας αντισώματος [114]. Ο τίτλος του αντισώματος ανέρχεται εντός 48 ωρών μετά τη μετάγγιση και κορυφώνεται την έκτη μέρα. Είναι σύνηθες κατά την πρωτογενή απάντηση το αντίσωμα να ανήκει στις ανοσοσφαιρίνες M ενώ κατά την δευτερογενή στις ανοσοσφαιρίνες G [96].

Τα αντισώματα IgM τείνουν να μειώνονται γρήγορα σε συγκέντρωση μετά το τελευταίο ερέθισμα και συνήθως καθίστανται μη ανιχνεύσιμα μετά από 1-2 χρόνια. Ορισμένα αντισώματα IgG (π.χ. αντι- Rh D) μειώνονται πολύ πιο αργά και μπορεί να είναι εύκολα ανιχνεύσιμα 30 χρόνια ή και παραπάνω – βιβλιογραφίες αναφέρουν και 38 χρόνια μετά το τελευταίο ερέθισμα [50,51]. Άλλα, (π.χ. αντι-Jka) μπορεί να καταστούν μη ανιχνεύσιμα λίγους μήνες μετά το τελευταίο ερέθισμα [115].

Η παραγωγή αντισωμάτων ως αποτέλεσμα ανοσοποίησης από αντίστοιχα αντιγόνα ποικίλλει ανάλογα με το είδος του αντιγόνου π.χ. άτομο Rh D αρνητικό που μεταγγίζεται με αίμα Rh D θετικό παράγει ευκολότερα αντι-D αντισώματα σε σχέση με το αντιγόνο Fy που είναι χαμηλής αντιγονικότητας. Σε έλεγχο της ειδικότητας των αλλοαντισωμάτων μετά μετάγγιση βρέθηκε ότι το 76% εξ αυτών ανήκε στο σύστημα Rh [116].

Η πιθανότητα ενός μεταγενέστερου σχηματισμού αντι-D φαίνεται ότι είναι περίπου 80%, ένα ποσοστό που βασίζεται κυρίως σε μελέτες σε υγιείς εθελοντές. Όσον αφορά τη μετάγγιση ασθενών υπάρχει πολύ μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης αντισωμάτων. Στις μελέτες με υγιείς εθελοντές, περίπου το 85% των D(-) ατόμων που μεταγγίστηκαν με 200 mL ή περισσότερα D(+) ερυθρά, εμφάνισαν αντι-D. Η αλλοανοσοποίηση όμως από αντι-D μετά από μετάγγιση D(+) ερυθρών σε D(-) ασθενείς ήταν μικρότερη από την προηγούμενη και εκτιμάται ότι είναι 30,4% [52,117]. Ανοσοκατεσταλμένα D(-) άτομα μπορεί να αναπτύξουν ορολογικά ανιχνεύσιμα αντισώματα αντι- D εντός 3 μηνών μετά την έκθεση σε D(+) ερυθρά. Ο ρυθμός αλλοανοσοποίησης είναι υψηλότερος στις νεότερες ηλικίες και σε εκείνους που έχουν μεταγγιστεί με πολλές μονάδες ερυθρών [118].

Αναφορικά με τον χρονικό προσδιορισμό της αλλοανοσοποίησης μετά από μετάγγιση, σε έλεγχο 452 ασθενών, βρέθηκε ότι το 8,4% (38/452) των ασθενών ανέπτυξε αντισώματα εντός 24 εβδομάδων από τη μετάγγιση [52].

3α. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ερυθροκυττάρων:

- Η ανοσογονικότητα [79] που αντικατοπτρίζει χαρακτηριστικά του επιτόπου του αντιγόνου όπως η δομή (η αρχική χημική δομή του αντιγόνου - αντιγόνα που ήταν αρχικά ολιγοσακχαρίτες παράγουν αντισώματα του τύπου IgM και εκείνα που η αρχική τους προέλευση ήταν γλυκοπρωτεΐνες παράγουν αντισώματα του τύπου IgG) η βιοχημική σύνθεση, και ο αριθμός τους [119].
- Η ευαισθησία του κάθε ατόμου. Πολλά άτομα που στερούνται κάποιου ειδικού αντιγόνου μπορεί να έχουν πρωτεΐνες ή υδατάνθρακες παρόμοιους με το αντιγόνο αυτό και με τον τρόπο αυτό καλύπτονται από ενδεχόμενη ανοσοποίηση.
- Ο αριθμός των ερυθροκυττάρων που μεταγγίζονται δηλαδή το μέγεθος του αντιγονικού ερεθισμού [120,121,122].
- Το ποσό των αντιγόνων που φέρουν τα μεταγγιζόμενα ερυθρά. Υπάρχει διαφορά στην πυκνότητα των αντιγόνων σε δότες ομόζυγους ή ετερόζυγους για ένα ερυθροκυτταρικό αντιγόνο (όπως αυτά των συστημάτων Rh, Kidd, Duffy, MNS). Για παράδειγμα RhD(-) ασθενείς που θα μεταγγιστούν με RBCs από δότες που εκφράζουν RhD weak (έχει μειωμένη έκφραση του αντιγόνου D) και ιδιαίτερα τους τύπους 1, 2, ή 3 θα ευαισθητοποιηθούν λιγότερο από ότι αν μεταγγιστούν με D(+) ερυθρά [122].
- Η οδός εισόδου του αντιγόνου (μετάγγιση αίματος, κύηση, τοκετός) [79,122].
- Η συχνότητα του αντιγόνου στον πληθυσμό [123]. Όταν ένα άτομο στερείται κάποιου αντιγόνου υψηλής συχνότητας σε περίπτωση μετάγγισης αίματος σχεδόν σίγουρα θα εκτεθεί σε ένα αντιγόνο που στερείται με πιθανότητα να αναπτύξει το αντίστοιχο αντίσωμα.
- Η συχνότητα του αντιγονικού ερεθισμού.
- Η κληρονομική "ευαισθησία" του ατόμου που εκτίθεται στο αντιγονικό ερέθισμα. Είναι δυνατή η κατά προσέγγιση εκτίμηση του κινδύνου ανοσοποίησης, (και η επακόλουθη εμφάνιση συμβαμάτων κατά τη μετάγγιση ερυθρών), με τον υπολογισμό της συχνότητας των γόνων των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων και του παρατηρούμενου επιπολασμού των αντίστοιχων αντισωμάτων σε μεγάλο αριθμό ατόμων [52].

3β. Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοανοσοποίηση

Η χρονική διάρκεια που παραμένουν τα αντιερυθροκυτταρικά αλλοαντισώματα στην κυκλοφορία του δέκτη δεν μπορεί να προσδιοριστεί και εξαρτάται από τη φύση του αλλοαντισώματος [79].

Ο ρυθμός της αλλοανοσοποίησης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που μελετάται [136].

Σε περίπτωση που ο έλεγχος για την ανίχνευση αντισωμάτων RBC μετά από μετάγγιση δεν διεξαχθεί, πολλά αντισώματα μπορεί να μην ανιχνευθούν πριν από την επόμενη μετάγγιση που θα γίνει, θέτοντας τον ασθενή σε κίνδυνο όπως μία επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση μετά μετάγγιση. Η συστηματική ανίχνευση αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα μετά τη μετάγγιση θα μείωνε αυτούς τους κινδύνους.

Το χρονικό διάστημα μεταξύ των μεταγγίσεων και της διερεύνησης αντισωμάτων συνδέεται έντονα με την ειδικότητα του αντισώματος. Τα αντι-Jk (a) και αντι-Jk (b) εντοπίζονται κυρίως σε ασθενείς που εξετάστηκαν εντός 3 μηνών, ενώ τα αντι-K και αντι-Fy είναι τα περισσότερο αντιληπτά αντισώματα σε διάστημα μεγαλύτερο των 5 ετών μετά τη μετάγγιση [79].

Ο τίτλος του αντισώματος συσχετίζεται εμφανώς με τον αριθμό των μεταγγίσεων. Σε περίπτωση που ο τίτλος πέσει και ο ασθενής επανεκτεθεί στο ίδιο αντιγόνο η δευτερογενής ανοσολογική απάντηση θα είναι ταχύτερη με αποτέλεσμα την επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση.

Ο βαθμός κινδύνου για την ανοσοποίηση κατά την εγκυμοσύνη επηρεάζεται από άλλους παράγοντες όπως το εάν ο πατέρας είναι ομοζυγώτης (π.χ. στην περίπτωση του D αντιγόνου με μητέρα αρνητική dd, μητέρα και έμβρυο προστατεύονται μόνο στην περίπτωση αρνητικού dd πατέρα), καθώς και η προστασία που παρέχει κατά την αλλοανοσοποίηση η συμβατότητα ABO μητέρας – εμβρύου [133].

Η συχνότητα της αλλοανοσοποίησης για τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα εκτιμάται 1-1,6% ανά μονάδα μεταγγιζόμενων ερυθρών σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς, με την προϋπόθεση ότι D(-) ασθενείς μεταγγίζονται με D(-) ερυθρά. Η συχνότητα της αλλοανοσοποίησης στα άτομα με δρεπανοκυτταρικό σύνδρομο φθάνει το 30% [129] σε σύγκριση με το 2-5% των υπόλοιπων αποδεκτών μετάγγισης [132].

3γ. Επιπτώσεις αλλοανοσοποίησης

Η συνηθέστερη συνέπεια της αλλοανοσοποίησης είναι η εξωαγγειακή καταστροφή των ερυθρών (φαγοκυττάρωση των RBC από μακροφάγα), η οποία συμβαίνει στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και γίνεται με τον εξής μηχανισμό [111]: Φαγοκυττάρωση των ευαισθητοποιημένων ερυθρών, δηλαδή ερυθρών που φέρουν στην επιφάνεια τους IgG1 ή IgG3, ή και τους παράγοντες C3 ή C4 από τα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα (μετά από σύνδεσή τους μέσω των υποδοχέων Fc ή και του συμπληρώματος) [52,134].

Η ευαισθητοποίηση των ερυθρών με αλλοαντισώματα IgG είναι αναγκαία αλλά όχι και ικανή προϋπόθεση για την πρόκληση της αιμόλυσης. Παράγοντες που προσδιορίζουν την ταχύτητα, τη θέση και το μηχανισμό της αιμόλυσης είναι το θερμικό εύρος, η ειδικότητα, η συγκέντρωση, και η ισχύς σύνδεσης, η τάξη και η υπόταξη των Ig και η ικανότητα σύνδεσης και ενεργοποίησης του συμπληρώματος από τα αλλοαντισώματα. Καθοριστικό ρόλο επίσης παίζουν η φύση, η πυκνότητα και ο βαθμός κινητικότητας του αντιγόνου στη μεμβράνη των ερυθρών, η δραστικότητα (ενεργοποίηση) των μακροφάγων, καθώς και η ποσότητα των μεταγγισθέντων ερυθρών [115].

Όλοι αυτοί οι παράγοντες θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για την εκτίμηση της *in vivo* και *in vitro* αιμόλυσης. Πιο κρίσιμοι παράγοντες θεωρούνται το θερμικό εύρος του αλλοαντισώματος και η λυτική του ικανότητα [135].

3δ. Επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση

Οι επιβραδυνόμενες αιμολυτικές αντιδράσεις μετά μετάγγιση (DHTRs- Delayed haemolytic transfusion reactions) εμφανίζονται σε ασθενείς που έχουν προηγούμενο ιστορικό ύπαρξης αλλοαντισωμάτων τα οποία μπορεί να είναι σε επίπεδο πολύ χαμηλό για να προκαλέσουν σημαντική ενδοαγγειακή ή εξωαγγειακή αιμόλυση και συχνά σε επίπεδο επίσης χαμηλό για να εντοπιστούν ορολογικά και έτσι να επιδεικνύονται συμβατές μεταγγίσεις [146]. Η έκθεση σε θετικά ως προς το αντιγόνο ερυθροκύτταρα έναντι των οποίων έχει αναπτυχθεί αντίσωμα προκαλεί αναμνηστική απόκριση και αυξημένη σύνθεση του αντίστοιχου αντισώματος. Μετά από μερικές ημέρες, ο τίτλος του αντισώματος καθίσταται αρκετά υψηλός ώστε να αιμολύει τα μεταγγισμένα ερυθροκύτταρα.

Οι επιβραδυνόμενες αιμολυτικές αντιδράσεις από μετάγγιση διαπιστώνονται συνήθως 3-10 ημέρες μετά τη μετάγγιση, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις διαπιστώνονται έως και 14 ή και 23 ημέρες μετά τη μετάγγιση [52].

Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει μετά από μετάγγιση, μεταμόσχευση, ή κύηση. Τα αντισώματα που προκαλούν τέτοιες αντιδράσεις συνήθως ανήκουν στα συστήματα Rh (D,C,E,c,e), Kell, Kidd (Jka, Jkb) ή σπανιότερα σε άλλα αντιγονικά συστήματα Duffy (Fya, Fyb), MNS και άλλα [147]. Αναφέρονται περιπτώσεις DHTRs από αντι-U και αντι-HI [344].

Αυτά που ενοχοποιούνται κυρίως για πρόκληση επιβραδυνόμενων αιμολυτικών αντιδράσεων είναι τα αντιγόνα Kidd εξαιτίας της ισχυρής αναμνηστικής απόκρισης από αντισώματα Kidd. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα μνήμης που παράγονται κατά την πρώτη αντιγονική έκθεση εκθέτουν μια αυξημένη ανταπόκριση αντισώματος σε επακόλουθη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο. Αναφέρεται ότι πάνω από το ένα τρίτο των DHTRs προκαλούνται από το αντι-Jka [85].

Οι επιβραδυνόμενες αιμολυτικές αντιδράσεις μετά μετάγγιση είναι δυνητικά απειλητικές για τη ζωή σε επιπλοκές που παρατηρούνται σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο. Είναι σημαντικό στην DHTR να συμπεριληφθούν στη διαφορική διάγνωση επεισόδια οξύ πόνου μετά από μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ασθενή με δρεπανοκυτταρική νόσο [148].

4. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα είναι ανοσοσφαιρίνες οι οποίες διακρίνονται σε δύο βασικές ομάδες, στα φυσικώς παραγόμενα αντισώματα και στα άνοσα όπως προαναφέρθηκε. Τα πρώτα είναι κυρίως τύπου IgM και σπάνια IgG και IgA. Τα δεύτερα είναι τύπου IgG και σπάνια IgM.

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα ανάλογα με τις επιμέρους ιδιότητές τους τα διακρίνουμε σε:

- Εκείνα που είναι ικανά να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και τα ονομάζουμε πλήρη ή διδύναμα και είναι συνήθως IgM.

- Εκείνα που αδυνατούν να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και ονομάζονται ατελή ή μονοδύναμα και είναι συνήθως IgG.

Ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους διακρίνονται σε:

- Ψυχρά αντισώματα με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 0-4°C. Συνήθως είναι IgM και είναι κλινικά σημαντικά μόνο όταν το θερμικό τους εύρος φτάνει στους 37°C [113].
- Θερμά αντισώματα με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 37°C Συνήθως είναι IgG και κλινικά σημαντικά.

ΠΡΟΜΕΤΑΓΓΙΣΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Ο προμεταγγισιακός έλεγχος πραγματοποιείται για να διασφαλιστεί η φυσιολογική επιβίωση των μεταγγιζόμενων ερυθρών αιμοσφαιρίων δηλαδή για την πρόληψη της αιμολυτικής αντίδρασης μετά μετάγγιση μέσω μηχανισμού που προκαλείται από την ανοσοποίηση [124].

Ο προσδιορισμός των αλλοαντισωμάτων συνήθως γίνεται κατά τη διάρκεια του προμεταγγισιακού ελέγχου. Καθώς τα πρότυπα και οι κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμασίες πριν από τη μετάγγιση αναθεωρούνται ώστε να αντικατοπτρίζουν την εξελισσόμενη επιστήμη, οι μεμονωμένες πρακτικές εργαστηριακών δοκιμασιών θα πρέπει να αξιολογούνται περιοδικά για να εξασφαλιστεί ότι συμμορφώνονται με τα ισχύοντα πρότυπα και αντιπροσωπεύουν την αναγνωρισμένη βέλτιστη πρακτική.

Οι εργαστηριακές δοκιμασίες προμεταγγισιακού ελέγχου που πραγματοποιούνται στον ασθενή είναι:

- Ομάδα ABO/Reverse
- Αντιγόνο RhD
- Προσδιορισμός A υποομάδας κατ' επιλογή
- Έλεγχος άλλων αντιγόνων του συστήματος Rhesus C,c,E,e, και έλεγχος αντιγόνου Kell (προαιρετικά).
- Έλεγχος μη αναμενόμενων αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων με έμμεση Coombs - Indirect Antiglobulin Test (IAT).
- Άμεση Coombs (DAT) κατά περίπτωση όταν ζητείται ή επιβάλλεται για διερεύνηση.
- Δοκιμασία διασταύρωσης μεταξύ των μεταγγιζόμενων ερυθρών (δότης) και του ορού του ασθενούς.
- Εκτεταμένος φαινότυπος άλλων κλινικά σημαντικών ερυθροκυτταρικών αντιγόνων σε περίπτωση ασυμβατότητας ή πριν την έναρξη των μεταγγίσεων σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς.
- Ο προμεταγγισιακός έλεγχος για νεογνά ηλικίας <4 μηνών απαιτεί τον καθορισμό ABO/RhD συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου για D weak όταν η μητέρα είναι RhD(-) και IAT της μητέρας ή DAT του νεογνού [14].

Ο έλεγχος της ομάδας ABO και του αντιγόνου RhD καθώς και η IAT πρέπει να πραγματοποιείται πριν από τη μετάγγιση συμπυκνωμένων ερυθρών ή προεγχειρητικά

ακόμη και όταν η πιθανότητα της μετάγγισης είναι μικρή και δεν απαιτείται διασταύρωση [125]. Για τη μετάγγιση πλάσματος απαιτείται προσδιορισμός ABO μόνο, ενώ για τη μετάγγιση αιμοπεταλίων απαιτείται συμβατότητα ABO/RhD όταν είναι δυνατόν χωρίς να είναι απαραίτητη η διασταύρωση. Εάν ο ασθενής εμφανίσει άνοση ανθεκτικότητα στη μετάγγιση αιμοπεταλίων, τότε ενδείκνυται η μετάγγιση HLA (Human Leukocyte Antigen) συμβατών αιμοπεταλίων. Για τη μετάγγιση κοκκιοκυττάρων απαιτείται ABO/RhD συμβατότητα και διασταύρωση, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται και HLA συμβατότητα για την αποφυγή HLA αλλοανοσοποίησης [126,127,128].

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η έμμεση Coombs (Indirect Antiglobulin Test-IAT) που αποτελεί τη βάση των ανοσοαιματολογικών δοκιμασιών αναδεικνύει τα κλινικά σημαντικά αντιερυθροκυτταρικά αλλοαντισώματα τα οποία βρίσκονται στον ορό του ασθενούς και μπορεί να προκαλέσουν οξεία ή επιβραδυνόμενη αιμόλυση μετά μετάγγιση ή αιμολυτική νόσο του νεογνού. Τα αντισώματα αυτά δρουν κατά κανόνα στη θερμοκρασία των 37 °C, είναι συνήθως IgG αντισώματα και ανιχνεύονται in vitro κατά κύριο λόγο με την IAT [137,138,139]. Η IAT πραγματοποιείται με 3 – 4 διαφορετικά και κατάλληλα επιλεγμένα ερυθρά ελέγχου ομάδος O που συνδυαστικά εκφράζουν όλα τα κλινικά σημαντικά ερυθροκυτταρικά αντιγόνα, με την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών (σωληναρίου, γέλης, στερεάς φάσης) με διάφορες ουσίες ενισχυτικές της αντίδρασης αντιγόνου αντισώματος [128,137-141]. Σε όλες τις παραπάνω τεχνικές, τα ερυθροκύτταρα επωάζονται 15-30' (ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται) με τον ορό του ασθενούς, ώστε να γίνει ευαισθητοποίηση, ενώ ο πολυδύναμος αντισφαιρινικός ορός είτε προστίθεται στη συνέχεια είτε είναι ενσωματωμένος εξ αρχής στις ειδικές κάρτες ελέγχου. Στο τέλος της διαδικασίας το δείγμα ελέγχεται για την ύπαρξη συγκόλλησης.

Τα ερυθρά ελέγχου πρέπει να έχουν ισχυρή έκφραση των αντιγόνων που σχετίζονται με την παραγωγή κλινικά σημαντικών αντιερυθροκυτταρικών αλλοαντισωμάτων δηλαδή D, C, E, c, e, M, N, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, Lea, Leb, P1 και να εκφράζονται οι φαινότυποι R1R1, R2R2. Τέτοια ερυθροκυτταρικά δείγματα προσφέρονται από διάφορες εμπορικές εταιρείες, και θα πρέπει μεταξύ αυτών να περιλαμβάνονται και δείγματα που προέρχονται από ομοζυγώτες τουλάχιστον για τα αντιγόνα c, E, Jka και M. Η δοκιμασία της IAT εκτός από

αντισφαιρινικό ορό, επίσης μπορεί να γίνει και με ερυθρά επεξεργασμένα με πρωτεολυτικά ένζυμα (βρωμελαΐνη ή παπαΐνη ή φυσίνη), τα οποία έχουν την ιδιότητα να καταστέλλουν ή να ενισχύουν την έκφραση των διαφόρων ερυθροκυτταρικών αντιγόνων. Όταν ανιχνεύεται κάποιο αντίσωμα, πρέπει να προσδιορίζεται η ειδικότητά του και να αξιολογείται η κλινική του σημασία.

Πίνακας 9. Δοκιμασία ανίχνευσης αντισωμάτων (Screen)

	RH						MNS				LU		P	Lewis		Kell		Duffy		Kidd		Gel Test
	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	P ₁	Le ^a	Le ^b	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	IAT
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0
2	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	2+
3	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	w+

Antibody Identification: Art or Science? A Case Study Approach AABB 2013

Επί θετικού αποτελέσματος IAT ακολουθεί:

- Ταυτοποίηση του αντισώματος που γίνεται με τη χρήση 11 ή περισσότερων ερυθρών ελέγχου ομάδος O (panel) γνωστής αντιγονικής σύνθεσης χωρίς επεξεργασία με ένζυμο (δοκιμασία με αντισφαιρινικό ορό), και με επεξεργασμένα με ένζυμο (δοκιμασία χωρίς αντισφαιρινικό ορό). Το πάνελ αποτελείται από εναιωρήματα ερυθροκυττάρων και τυπικά κάθε πίνακας περιλαμβάνει ερυθροκύτταρα φαινοτύπων R1R1 (DCCee), R1wR1 (D [C] CwCee), R2R2 ('ccEE), r'r (CCee), r "r (ccEE) και rr (ccee). Το πάνελ περιλαμβάνει επίσης τουλάχιστον ένα δότη που να είναι K+ και ερυθρά με έκφραση διπλής δόσης αντιγόνων όπως, M, N, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, Lea, Leb, P1 [142].

Πίνακας 10. Ταυτοποίηση αντισώματος (panel)

	RH						MNS				LU		P	Lewis		Kell		Duffy		Kidd		Gel Test
	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	P ₁	Le ^a	Le ^b	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	IAT
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	+	0
2	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	2+
3	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	2+
4	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	+	+	0	+	+	0
5	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	w+
6	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	2+
7	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	1+
8	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0
9	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	0
10	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	1+
11	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0
AC																						0

Antibody Identification: Art or Science? A Case Study Approach AABB 2013

- Σε ύπαρξη πολλαπλών αντισωμάτων, για να καταστεί δυνατή η ταυτοποίησή τους εφαρμόζονται τεχνικές προσρόφησης και έκλουσης του αντισώματος.
- Η τιτλοποίηση του αντισώματος. (όπου είναι αναγκαίο)

Μετά την ταυτοποίηση των κλινικά σημαντικών αντισωμάτων χορηγούνται στον ασθενή μονάδες αίματος που στερούνται του ή των αντιγόνων, έναντι των οποίων έχουν αναπτυχθεί αντισώματα.

Όταν η IAT είναι θετική χρησιμεύει για τη διάγνωση των εξής καταστάσεων:

- Σε περιπτώσεις που υπάρχει αλλοαντίσωμα ως αποτέλεσμα προηγούμενης ευαισθητοποίησης (προηγούμενες μεταγγίσεις ή κυήσεις). Ως εκ τούτου πρέπει να αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του προμεταγγισιακού ελέγχου, καθώς και της παρακολούθησης της εγκύου για την πρόληψη της αιμολυτικής νόσου του νεογνού [126,143].
- Σε περιπτώσεις αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας.

Από τα μη αναμενόμενα αντισώματα το 85,6% αυτών αφορά κλινικά σημαντικά αντισώματα [144].

Μερικά αντισώματα Rh τείνουν να εμφανίζονται μαζί. Για παράδειγμα σε άτομο με φαινότυπο DCe/Dce, που αναδεικνύεται αντίσωμα αντι-E είναι σχεδόν σίγουρο ότι έχει εκτεθεί και στο c όπως και στο E, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά μπορεί να είναι ασθενέστερο ή μη ανιχνεύσιμο στο χρονικό διάστημα που ανιχνεύθηκε το αντι-E και να επιδεικνύει φαινομενικά συμβατές μεταγγίσεις. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μετάγγιση E-

c+ ερυθρών μπορεί να προκαλέσει επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση. Έχει προταθεί οι ασθενείς R1R1 (E-c-) που εμφανίζουν μόνο αντι-E να λαμβάνουν προφυλακτικά στη μετάγγιση ερυθρά c(-) [145]. Στα RhD(-) άτομα το αντι-C συνυπάρχει με το αντι- D αρκετά συχνά [35].

ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

A. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Ένας τίτλος ορίζεται ως η συγκέντρωση ενός αντισώματος στο αίμα που αναγνωρίζει το αντίστοιχο αντιγόνο έναντι του οποίου ένας οργανισμός έχει αναπτύξει αντίσωμα.

Η τιτλοποίηση κλινικά σημαντικών αντισωμάτων κατά την εγκυμοσύνη είναι κατάλληλη για την εκτίμηση της πιθανότητας εμφάνισης σοβαρής HDFN για να καθοριστεί μια γραμμή παρακολούθησης για σύγκριση με τους τίτλους που θα βρεθούν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [127].

Ο τίτλος προσδιορίζεται με διαδοχική αραίωση του ορού του αίματος και εξετάζεται κάθε αραίωση για το αντίσωμα που έχει ταυτοποιηθεί (για παράδειγμα, αντισώματα έναντι του παράγοντα Rhesus D).

Ο τίτλος είναι πάντα ακέραιος αριθμός και λαμβάνει εξ ορισμού μία από τις τιμές 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 κοκ. Ο αναφερόμενος τίτλος είναι ο αντίστροφος της υψηλότερης αραίωσης που δίνει θετική αντίδραση [149]. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του συγκεκριμένου αντισώματος στο δείγμα ορού, τόσο υψηλότερος είναι ο τίτλος.

Για παράδειγμα, ένας τίτλος 8 στη δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης θα ήταν πολύ χαμηλός. Ένας τίτλος 256 θα ήταν υψηλός. Ένας χαμηλός ή μη ανιχνεύσιμος τίτλος δείχνει ότι υπάρχει χαμηλή συγκέντρωση αντισώματος στον ορό.

Σε αρχική έκθεση, ο τίτλος του αντισώματος είναι πολύ χαμηλός ή μη ανιχνεύσιμος. Μετά την επανειλημμένη έκθεση, το ανοσοποιητικό σύστημα παράγει συνεχώς αντισώματα, με αποτέλεσμα την αύξηση του τίτλου.

B. ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Η τιτλοποίηση των αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων είναι χρήσιμη στις εξής περιπτώσεις:

1. Προγεννητικές μελέτες [78]

Για την εκτίμηση της δραστηριότητας αντισωμάτων σε αλλοανοσοποιημένες έγκυες γυναίκες για να προσδιοριστεί αν και πότε θα εκτελεστεί μια επεμβατική διερεύνηση της

κατάστασης του εμβρύου, κυρίως όταν η ειδικότητα του αντισώματος είναι γνωστό ότι προκαλεί HDFN.

2. Ανίχνευση αντισωμάτων [78]

Μερικά αντισώματα που συγκολλούν ουσιαστικά όλες τις θέσεις στο πάνελ στις δοκιμασίες ανίχνευσης - ταυτοποίησης αντισωμάτων μπορεί να παρουσιάζουν ένδειξη της ειδικότητας του αντισώματος δείχνοντας δραστικότητα διαφορετικής ισχύος με διαφορετικά δείγματα σε μελέτες τιτλοποίησης. Για παράδειγμα ισχυρό αντι-I μπορεί να αντιδράσει όταν δεν είναι αραιωμένο τόσο με ερυθρά ενήλικα όσο και με ερυθρά ομφαλίου λώρου αλλά η τιτλοποίηση μπορεί να αποκαλύψει αντιδραστικότητα σε υψηλότερη αρραίωση με ερυθρά I + ενηλίκων από ότι με ερυθρά ομφαλίου λώρου.

3. Διαχωρισμός των HTLA αντισωμάτων [78,103]

Η τιτλοποίηση είναι ένας τρόπος επιβεβαίωσης της παρουσίας HTLA αντισωμάτων (high titer – low avidity). Τα περισσότερα αντισώματα αντιδρούν ασθενώς ή χάνουν την αντιδραστικότητά τους όταν αραιώνονται ακόμη και σε χαμηλές αραιώσεις, αλλά ορισμένα αντισώματα που δίνουν αδύναμες αντιδράσεις όταν δεν αραιώνονται συνεχίζουν να αντιδρούν σε αραιώσεις υψηλές της τάξης του 2048. Επίσης δεν παρουσιάζουν την προοδευτικά φθίνουσα πορεία όσο αυξάνεται η αρραίωση του αντισώματος. Τέτοια αντισώματα είναι το αντι-Ch, -Rg, -Cs^a, -Yk^a, -McC^a-JMH και άλλες ειδικότητες. Όταν παρατηρούνται ασθενείς αντιδράσεις σε έμμεσες δοκιμασίες αντισφαιρινικού ορού, μπορεί με την τιτλοποίηση να έχουμε ένδειξη της ειδικότητας που αφορά αυτή την ομάδα των αντισωμάτων.

Δεν επιδεικνύουν τέτοια χαρακτηριστικά όλα τα αντισώματα όπως αυτά του χαμηλού τίτλου υψηλής συγγένειας.

Αν και η επίδειξη αυτών των ορολογικών χαρακτηριστικών μπορεί να βοηθήσει στην επισημάνση αυτών των ειδικοτήτων αντισώματος (high titer- low avidity), η αποτυχία της ακριβούς ταυτοποίησης του αντισώματος δεν αποτελεί μεγάλη απώλεια (δεν προκαλούν HDNF ούτε μειωμένη επιβίωση των ερυθρών). Και αντισώματα άλλων ειδικοτήτων μπορεί μερικές φορές να αντιδρούν σε υψηλούς τίτλους.

4. Για το διαχωρισμό πολλαπλών αντισωμάτων [78]

Στις περιπτώσεις πολλαπλών αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων, τα αποτελέσματα τιτλοποίησης μπορούν να αναδείξουν ότι ένα αντίσωμα αντιδρά σε υψηλότερες αραιώσεις από ένα άλλο. Αυτή η πληροφορία χρησιμεύει ούτως ώστε όταν αραιωθεί ο ορός πριν από τη δοκιμασία ταυτοποίησης του αντισώματος με πάνελ γνωστών ερυθρών να απομακρυνθεί αποτελεσματικά το ένα αντίσωμα επιτρέποντας την ταυτοποίηση του άλλου.

5. Για την ανίχνευση και αναγνώριση πολλαπλών αντισωμάτων [78]

Ενώ αυτή η διαδικασία δεν επιβεβαιώνει συνήθως τις ειδικότητες μείγματος αντισωμάτων, καθοδηγεί στην επιλογή των ερυθρών ελέγχου, για να γίνει η προσρόφηση και η έκλουση σε αυτά.

6. Παρουσία φαινομένου δόσης [150]

Η τιτλοποίηση είναι η μόνη χρήσιμη τεχνική, για να διαπιστωθεί η διαφορετική σε ένταση αντίδραση του ορού, όταν μερικά αντισώματα παρουσιάζουν το φαινόμενο δόσης και όταν μερικά ερυθρά αιμοσφαίρια περιλαμβάνουν αντιγόνα, που δρουν πιο έντονα από άλλα (τα ερυθρά πρέπει να είναι της ίδιας πυκνότητας στο εναιώρημα).

Όταν τα αραιωμένα δείγματα που φέρουν αντισώματα Rh, MNS, Kidd, Duffy συγκολλούνται με αντιγόνα που φέρουν διπλή δόση αντιγόνου με θετικότητα $\leq 2+$ (με τεχνολογία συγκολλήσεως στήλης), η αντίδραση αντισώματος «μονής δόσης» μπορεί να εξασθενήσει, ακόμη και να είναι αρνητική [151].

7. Φυσικά αντισώματα στο πλάσμα – αιμοπετάλια

Πολλές φορές υπάρχει έλλειψη ταυτόσημης ομάδας πλάσματος - αιμοπεταλίων με του ασθενή που πρόκειται να μεταγγιστεί.

Τότε προκύπτει η ανάγκη επιλογής της ποιο προσιτής ομάδος προς μετάγγιση (ελάχιστο ασυμβατότητα) της οποίας υπάρχει η δυνατότητα με την τιτλοποίηση A ή B αντισώματος να υπάρξει μειωμένη πρόσληψη ανεπιθύμητου αντισώματος (μετάγγιση πλάσματος με χαμηλό τίτλο αντισώματος).

Όσον αφορά τα αιμοπετάλια έχουν αναφερθεί οξείες αιμολυτικές αντιδράσεις (AHTRs- Acute haemolytic transfusion reactions) μετά από μετάγγιση αιμοπεταλίων αφαίρεσης (SDPs – Single donor platelets) ομάδας O προς τους δέκτες A, B και AB ομάδος λόγω της

παρουσίας ασυνήθιστα υψηλών τίτλων αντισωμάτων που μπορούν να βρεθούν στο πλάσμα ορισμένων δοτών ομάδος O, και στο μεγάλο όγκο πλάσματος των (SDPs) [152,153,154].

Δεν έχει αναφερθεί κάποιος αποδεκτός τίτλος για τον περιορισμό αυτών των προϊόντων μετάγγισης σε ασθενείς. Ένα ευρύ φάσμα τίτλων εμπλέκεται στην πρόκληση αιμολυτικών αντιδράσεων μετά μετάγγιση.

8. Διευκρίνιση ειδικότητας αυτοαντισώματος [155]

Τα θερμά IgM αυτοαντισώματα περιστασιακά έχουν βέλτιστη αντιδραστικότητα μεταξύ των 20 και 30°C αντι για 37°C.

Αυτά τα αντισώματα έχουν χαμηλούς ή αμελητέους τίτλους στους 4°C τίτλος <64. Έτσι εύκολα διαφοροποιείται αυτό το IgM θερμό αντίσωμα από αυτά που βλέπουμε στη νόσο των ψυχοσυγκολλητινών (CAS).

9. Για τον προσδιορισμό της τάξης των ανοσοσφαιρινών (IgG ή IgM)

Η διθειοθρεϊτόλη (DTT) και η 2-μερκαπτοαιθανόλη (2-ME) είναι ενώσεις σουλφυδρυλίου που επιδρούν στη συμπεριφορά των αντισωμάτων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη επεξεργασία του ορού ή του πλάσματος για την μετουσίωση της αντιδραστικότητας των IgM αντισωμάτων. Με τη χρήση του σουλφυδρυλίου, τα αντισώματα IgG και IgM μπορούν να διαχωριστούν, η σχετική ποσότητα αντισωμάτων IgM και IgG μπορεί να προσδιοριστεί και να εκτιμηθεί ο κίνδυνος αιμολυτικής νόσου του εμβρύου και του νεογνού [156]. Χρησιμοποιείται σε μελέτες τιτλοποίησης ειδικά για την παρακολούθηση των κλινικά σημαντικών αντισωμάτων.

Το DTT (Dithiothreitol) είναι ένας αποτελεσματικά ανασταλτικός παράγοντας που μπορεί να διακόψει την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών με μη αναστρέψιμη μείωση των δισουλφιδικών δεσμών σε ελεύθερες ομάδες σουλφυδρυλίου. Τα αντιδραστήρια καταργούν τόσο τη συγκόλληση όσο και την δραστικότητα της δέσμευσης του συμπληρώματος. Παρατηρήσεις της δραστικότητας των αντισωμάτων πριν και μετά τη χρήση σουλφυδρυλίου είναι χρήσιμες για τον προσδιορισμό της κατηγορίας της ανοσοσφαιρίνης. Η επεξεργασία με σουλφυδρύλιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστολή των IgM αντισωμάτων και να επιτρέψει την ανίχνευση της συνύπαρξης IgG αντισωμάτων (πίνακας 11) [150,155].

Πίνακας 11. Διαχωρισμός των IgM αντισωμάτων από τα IgG αντισώματα

		ΑΠΑΙΩΣΕΙΣ					ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ
		2	4	8	16	32	
ΟΡΟΣ +	3+		2+	2+	1+	0	IgG
DTT							
ΟΡΟΣ +	3+		2+	2+	1+	0	
PBS							
ΟΡΟΣ+	0	0	0	0	0	0	IgM
DTT							
ΟΡΟΣ+ PBS	3+		2+	2+	1+	0	
ΟΡΟΣ+	2+	1+	0	0	0	0	IgG + IgM*
DTT							
ΟΡΟΣ+ PBS	3+	2+	2+	1+	0	0	
							IgM

* Μπορεί επίσης να υποδεικνύει μόνο μερική αδρανοποίησή του

Mark E Brecher. *Antibody Detection/Identification and Compatibility Testing. AABB Technical Manual 15th ed. 2005;3:761-767.*

10. Φαινόμενο προζώνης [157]

Το φαινόμενο προζώνης αποτελεί αιτία λανθασμένων αποτελεσμάτων των ορολογικών μεθόδων, δίνοντας ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Σε σπάνιες περιπτώσεις δειγμάτων με πολύ υψηλούς τίτλους αντισώματος υπάρχει πιθανότητα η περίσσεια αντισώματος σε σχέση με τις διαθέσιμες αντιγονικές θέσεις να οδηγήσει σε ασθενή ή και αρνητικά αποτελέσματα. Επιθυμητό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με αρραίωση του ορού.

- Αν υπάρχει περίσσεια αντισώματος, το πλάσμα ή ο ορός με το κατάλληλο διάλυμα και κάθε αρραίωση επανεξετάζεται (τιτλοποίηση).
- Αν υπάρχει περίσσεια αντιγόνου αυξάνεται η σχέση ορός/κύτταρα και έτσι αυξάνεται η συγκέντρωση του αντισώματος με προσθήκη επιπλέον ορού και ενισχύεται η αντίδραση.

Αναλογίες αντιγόνου – αντισώματος.

Περίσσεια αντιγόνου σε σχέση με το αντίσωμα έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη πρόσληψη αντισώματος. Για δοκιμασίες αναστολής ή προσρόφησης είναι επιθυμητή μια τέτοια περίσσεια αντιγόνου.

11. Αιμολυτική νόσος του εμβρύου-νεογνού από ABO [96]

Σε περιπτώσεις με μητέρες ομάδας O που δεν έχουν μη αναμενόμενα αντισώματα στον ορό τους, αλλά το παιδί παρουσιάζει αιμολυτική νόσο και η ομάδα αίματός του ταυτοποιείται ως A ή B, υπάρχει η υποψία ότι πρόκειται για αιμολυτική νόσο από ABO. Για να γίνει επιβεβαίωση πρέπει να γίνουν τα παρακάτω:

- Τιτλοποίηση του ορού της μητέρας με ερυθρά ελέγχου ομάδας A₁ και B.
- Τιτλοποίηση του ορού της μητέρας, μετά από εξουδετέρωση των αλλοαντισωμάτων. Η εξουδετέρωση γίνεται με την προσθήκη ειδικών ουσιών A και B (2-4 μέρη των ουσιών αυτών προς ένα μέρος του ορού της μητέρας), επώαση σε 37⁰ C και στη συνέχεια έμμεση δοκιμασία Coombs.
- Στην τιτλοποίηση συμπεριλαμβάνονται αν είναι δυνατόν τα ερυθρά του πατέρα.

12. Εξουδετέρωση αυτοαντισωμάτων

Η τεχνική τιτλοποίησης ενδείκνυται για την εξουδετέρωση αυτοαντισωμάτων και για την ανάδειξη αλλοαντισώματος/των ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους [158].

13. Έλεγχος ειδικότητας των αυτοαντισωμάτων

Επειδή τα αυτοαντισώματα είναι εξειδικευμένα, κυρίως ως προς το σύστημα Rhesus, προσδιορίζεται ο τίτλος των αυτοαντισωμάτων με ερυθρά γνωστής γονοτυπικής σύνθεσης ως προς το σύστημα Rhesus. Η τιτλοποίηση αυτής της ειδικότητας, των αυτοαντισωμάτων βοηθάει στην ασφαλέστερη μετάγγιση των ασθενών με αιμολυτική αναιμία λαμβάνοντας υπόψιν τον τίτλο του αντισώματος του ασθενή για την επιλογή των προς μετάγγιση ερυθρών.

14. Έλεγχος ψυχροσυγκολλητινών (ψυχρών αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων)

Για την αξιολόγηση της κλινικής σημασίας των ψυχροσυγκολλητινών απαιτείται ο προσδιορισμός του θερμικού εύρους και του τίτλου των αντισωμάτων. Όταν ο τίτλος των ψυχροσυγκολλητινών είναι χαμηλός (έως 64) τότε συνήθως στερείται κλινικής σημασίας.

15. Μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων [159]

Δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις των ABO ασύμβατων μεταμοσχεύσεων νεφρών (ABOi). Οι ασθενείς αυτοί υποβάλλονται σε ανοσοκατασταλτικά σχήματα και ανοσοπροσρόφηση πλάσματος για την απομάκρυνση των φυσικών αντισωμάτων ABO. Οι τίτλοι διεξάγονται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του επιπέδου των αντισωμάτων των δεκτών έναντι του μη

συμβατού αντιγόνου του δότη νεφρού ως μέτρο του δυνητικού κινδύνου απόρριψης μοσχεύματος δότη [160]. Γίνεται συνήθως τιτλοποίηση αντισώματος πριν από τη μεταμόσχευση αλλά και μετά από αυτή. Σε μεταμόσχευση ABOί, ο αποδεκτός τίτλος κυκλοφορούντων ισοαιμοσυγκολλητινών αντι-A ή αντι-B κατά την μεταμόσχευση ποικίλει μεταξύ 8-32 ανάλογα με τα κριτήρια του κέντρου μεταμόσχευσης [161]. Οι επιτυχείς μεταμοσχεύσεις απαιτούν τίτλους παρακολούθησης για περίπου 6 μήνες μετά τη μεταμόσχευση. Σε σπάνιες περιπτώσεις, οι ασθενείς μπορεί να εκφράζουν ένα αντιγόνο σε άλλους ιστούς στο σώμα τους, αλλά όχι στα ερυθρά τους. Δεδομένης της έκφρασης αντιγόνου ομάδας αίματος σε ορισμένα όργανα, τα αλλοαντισώματα RBC μπορεί να είναι κλινικά σημαντικά όχι μόνο σε περιπτώσεις μετάγγισης ή εγκυμοσύνης αλλά και σε μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων. Για παράδειγμα, τα αλλοαντισώματα κατά των αντιγόνων Jk έχει αναφερθεί ότι επηρεάζουν τα αποτελέσματα σε μεταμοσχεύσεις νεφρών από δότες Jk(+) [119].

16. Αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων [162,163]

Η μεταμόσχευση αλλογενών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT – Hematopoietic stem cell transplantation) είναι μια θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση αιματολογικών ασθενειών. Λόγω του γεγονότος ότι το σύστημα του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA κληρονομείται ανεξάρτητα από το σύστημα ομάδων αίματος, περίπου 40-50% όλων των HSCTs εκτελούνται με τη συμβολή όλων των ομάδων αίματος ABO. Οι αναμενόμενες ανοσο-αιματολογικές συνέπειες μετά από μεταμόσχευση ενός ABO-ασύμβατου μοσχεύματος βλαστοκυττάρων είναι άμεσες και επιβραδυνόμενες αιμολυτικές επιπλοκές λόγω της παρουσίας ισοαιμοσυγκολλητίνης. Οι τίτλοι ισοαιμοσυγκολλητίνης για ασθενείς που υποβάλλονται σε μείζονα ABO ασύμβατη μεταμόσχευση εξετάζονται πριν από τη μεταμόσχευση και μετά από αυτή έως ότου οι τίτλοι να είναι μη ανιχνεύσιμοι για 2 διαδοχικές εβδομάδες [164]. Μία στρατηγική είναι να παρακολουθούνται στενά τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και ο αριθμός των δικτυοερυθροκυττάρων κατά την παρακολούθηση των μετα-μεταμοσχεύσεων τίτλων αντι-A και αντι-B ισοαιμοσυγκολλητινών IgG και IgM εβδομαδιαίως από την 4η ημέρα μετά την HSCT. Για ασθενείς που έχουν τίτλους ισοαιμοσυγκολλητίνης αντι-A και / ή αντι-B>: 128 κατά την αξιολόγηση πριν από τη μεταμόσχευση, τα IgG και IgM αντισώματα αξιολογούνται δύο φορές την εβδομάδα μετά τη μεταμόσχευση έως την επίτευξη τίτλων κάτω του 16, και

εβδομαδιαίως έως την πλήρη εξαφάνισή τους. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του τίτλου αιμοσυγκολλητίνης επαναλαμβάνεται έως ότου δεν είναι ανιχνεύσιμος για 2 συνεχόμενες εβδομάδες, εκτός από ασθενείς με αυξημένες απαιτήσεις μετάγγισης RBC [164,345]. Οι τίτλοι ταξινομούνται με τους τύπους ABO-αντιγόνου (αντι-A, αντι-B) και αντισώματος (IgM, IgG).

Το μόσχευμα των αιμοποιητικών κυττάρων που δεν είναι ABO συμβατό καθαίρεται από την πρόσμιξη ερυθρών αιμοσφαιρίων με φυγοκέντρηση χρησιμοποιώντας μια συσκευή αφαίρεσης (COBE BCT, Lakewood, CO, ΗΠΑ) στις περιπτώσεις που οι τίτλοι ισοαιμοσυγκολλητίνης του λήπτη ξεπερνούν τον τίτλο 16 (IgM και / ή IgG) [164].

17. Επαναπροσδιορισμός του αρχικού τίτλου

Γίνεται τιτλοποίηση σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς στα πλαίσια ελέγχου για πιθανή επανέκθεση σε αντιγόνο έναντι του οποίου έχουν αναπτύξει αντίσωμα.

18. Χρήση ορού ευαισθητοποιημένου ατόμου ως υποκατάστατο αντιδραστηρίου

Εάν δεν υπάρχει εμπορικός αντιορός προς χρήση, αποθηκευμένο δείγμα από ευαισθητοποιημένο ασθενή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των προς μετάγγιση ερυθρών. Εάν ο ορός του ασθενή χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο, το αντίσωμα πρέπει να χαρακτηρίζεται και να διατηρεί την αντιδραστικότητά του μετά την αποθήκευση. Για τη χρήση αντιδραστηρίων ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται αντί των εμπορικών αντιδραστηρίων, πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατευθυντήριες οδηγίες του FDA που είναι ως εξής:

A) Αντι-K, -k, -Jka, Fya και Cw: αραιώση 1:8 πρέπει να παράγει αντίδραση 1+ τουλάχιστον.

B) Αντι-S, -s, P1, -M, -I, -c (saline), -e (saline), και αντι-A1: Πρέπει σε αραιώση 1:4 να παραχθεί αντίδραση 1+ τουλάχιστον.

Γ) Οι περισσότερες άλλες ιδιαιτερότητες σε μη αραιωμένο δείγμα πρέπει να παράγουν μία αντίδραση 2+ τουλάχιστον [78,165].

ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΟΥ (HDFN)

Η HDFN (Haemolytic disease of the fetus and newborn) είναι η διαταραχή κατά την οποία επιταχύνεται η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου και νεογνού από τη δράση IgG ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων μητρικής προέλευσης, που διέρχονται τον πλακούντα. Η καταστροφή των ερυθρών μπορεί να συμβεί τόσο κατά την εμβρυική ζωή όσο και μετά τη γέννηση. Επειδή η αιμολυτική νόσος ξεκινά από την ενδομήτρια ζωή λέγεται αιμολυτική νόσος του εμβρύου-νεογνού [51]. Η σοβαρότητα της HDFN προσδιορίζεται από την υποκατηγορία της ανοσοσφαιρίνης, την ποσότητα του αντισώματος και τον αριθμό των αντιγονικών θέσεων στα ερυθροκύτταρα [166]. Το συνηθέστερο αντίσωμα που ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι το αντι-D [96,167-169].

Πριν από πενήντα χρόνια η αιμολυτική νόσος του εμβρύου και του νεογνού που οφείλονταν στο παράγοντα Rhesus D ήταν μια σημαντική αιτία περιγεννητικού θανάτου. Μεταξύ των αλλοανοσοποιημένων κυήσεων όσον αφορά τον παράγοντα Rhesus D, η συχνότητα εμφάνισης εμβρυικών θανάτων ήταν 25% και το ένα τρίτο των αλλοανοσοποιημένων νεογνών που επιβίωναν πέθαιναν λίγο μετά τη γέννησή τους. Στην πορεία, εξελίχθηκαν περισσότερο οι μέθοδοι και τα πρωτόκολλα για να αντιμετωπίζεται η αιμολυτική νόσος του νεογνού στη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1960, η χορήγηση RhDIG σε RhD(-) γυναίκες αμέσως μετά τον τοκετό μείωσε σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου και το ποσοστό θνησιμότητας μειώθηκε από 1,2 περιπτώσεις ανά 1000 νεογνά σε 0,02 περιπτώσεις ανά 1000 νεογνά [170,171].

Ενώ θεωρητικά η εμφάνιση της αιμολυτικής νόσου του νεογνού θα έπρεπε να αναλογεί περίπου στο 8% των δεύτερων κυήσεων, εντούτοις στην πράξη δεν ξεπερνά το 1% πριν από τη χορήγηση προληπτικής χορήγησης αντι-D ανοσοσφαιρίνης (μόνο 60-70% των εγκύων έχουν ικανότητα απάντησης στο αντιγόνο D για παραγωγή αντι-D) [127]. Το ποσοστό της αλλοανοσοποίησης των γυναικών μειώθηκε ακόμη περισσότερο μετά την εισαγωγή της προφύλαξης με τη χορήγηση ανοσοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης [172-175].

Αλλοανοσοποίηση και κύηση

Ο αριθμός των γυναικών που εκτίθεται σε κίνδυνο αλλοανοσοποίησης εξαρτάται από τον αριθμό των κυήσεων, την κατανομή ομάδων αίματος στο σύστημα Rhesus, από τον αριθμό των καταστάσεων κινδύνου αλλοανοσοποίησης καθώς και από το πρωτόκολλο πρόληψης [176].

Οι γυναίκες παρότι εκτίθενται σε εμβρυικά ερυθροκύτταρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του τοκετού αλλοανοσοποιούνται σε μικρό ποσοστό. Η ανοσογονικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων φαίνεται να είναι κρίσιμος παράγοντας και η πλειοψηφία των HDFN αφορά κυρίως τα αντιγόνα Rh, K, Fy, Jka, MNS [168,177-179].

Εκτός από την εμβρυομητρική αιμορραγία, άλλη αιτία διέγερσης της αλλοανοσοποίησης αποτελεί η ενδομήτρια μετάγγιση. Αυτές οι μεταγγίσεις συνήθως γίνονται στο δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο της κύησης, εάν το έμβρυο παρουσιάζει σημεία αναιμίας ή ύδρωπα [182].

Η αλλοανοσοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε εμβρυϊκή αναιμία πριν από τις 20 εβδομάδες κύησης. Η πραγματική έκταση της περιγεννητικής απώλειας λόγω αλλοανοσοποίησης των ερυθροκυττάρων είναι άγνωστη. Ωστόσο, στις ανεπτυγμένες χώρες, 1: 300 έως 1: 600 εγκυμοσύνες κινδυνεύουν από (HDFN) λόγω της αλλοανοσοποίησης [76]. Ενώ η αλλοανοσοποίηση έχει μειωθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων πέντε δεκαετιών εξαιτίας της χορήγησης αντι-D ανοσοπροφύλαξης σε γυναίκες RhD(-) αναπαραγωγικής ηλικίας, η ανοσοποίηση εξακολουθεί να αποτελεί σοβαρή επιπλοκή στην περιγεννητική υγεία.

Τα εργαστήρια υπηρεσιών μετάγγισης εμπλέκονται στενά στη διαχείριση της HDFN και στην πρόληψη της αλλοανοσοποίησης στο αντιγόνο D με προφύλαξη RhDIG. Ενώ το τελευταίο εξακολουθεί να περιορίζει τη συχνότητα εμφάνισης της HDNF, η νόσος εξακολουθεί να υφίσταται λόγω της αποτυχίας πρόληψης και άλλων αντισωμάτων εκτός από το αντι-D.

1. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΥΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ HDFN

Η αιμολυτική νόσος του εμβρύου και του νεογνού (HDFN) που οφείλεται σε αλλοανοσοποίηση είναι αποτέλεσμα της μεταφοράς IgG1 ή IgG3 αντισωμάτων μέσω του πλακούντα από τη μητέρα στο έμβρυο [143,177].

Η μοναδική ανοσοσφαιρίνη που μεταφέρεται μέσω του πλακούντα είναι η IgG, η οποία δεσμεύεται και μεταφέρεται από έναν υποδοχέα Fc του πλακούντα. Ο υποδοχέας αυτός αναγνωρίζεται ως νεογνικός υποδοχέας Fc (FcRn). Η δομή του FcRn είναι αντίθετη με

άλλους υποδοχείς Fc. Είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών MHC τάξης I και εξαρτάται από τη λειτουργία του διμερισμού με $\beta 2$ μικροσφαιρίνη. Οι περιοχές $\alpha 2$ και $\beta 2$ μικροσφαιρίνης του FcRn αλληλεπιδρούν με τις περιοχές C γ 2 και C γ 3 του μορίου IgG [183]. Ο υποδοχέας FcRn μεταφέρει IgG σε όξινα κυστίδια (<pH 6.5) εμποδίζοντας έτσι την αποικοδόμηση λυσοσωμάτων και απελευθερώνει IgG στο αίμα του εμβρύου σε pH 7.4. Η αλληλεπίδραση που εξαρτάται από το pH περιλαμβάνει υπολείμματα ιστιδίνης στο τμήμα Fc της IgG και υπολείμματα σε FcRn που φορτίζονται σε όξινο αλλά όχι βασικό pH [184].

Η μεταφορά IgG είναι μια ενεργή διαδικασία και λαμβάνει χώρα μόνο από τη μητέρα στο έμβρυο και όχι στην αντίθετη κατεύθυνση. Στις πρώτες 12 εβδομάδες της κύησης μεταφέρονται μόνο μικρές ποσότητες IgG, αν και όταν ο ορός της μητέρας περιέχει ισχυρό αντι-D, η DAT στα εμβρυϊκά (D+) ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να είναι θετική ήδη από την 6η-10η εβδομάδα. Την εικοστή τέταρτη εβδομάδα της κύησης, η μέση συγκέντρωση IgG στο έμβρυο είναι 1,8 g / l [183].

Εξαιρέσεις σε αυτό φαίνεται να είναι:

α) Τα αντισώματα του αντιγονικού συστήματος Cromer που μεταφέρονται στον παράγοντα επιτάχυνσης αποσύνθεσης (DAF, CD55) [185]. Ο DAF εκφράζεται στον πλακουντιακό τροφοβλάστη των επιθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από το έμβρυο. Έτσι, είναι πιθανό ότι τα αντισώματα που προκύπτουν από το σύστημα Cromer απορροφώνται από τον πλακούντα και δεν εισέρχονται στο έμβρυο [186,187].

β) Τα αντισώματα HTLA: [Csa (Cost), Yka(York), Kna, Knb(Knops), McCa έως McCf(McCoy), Sla, Slb(Swain Langley), JMH(John Milton Hagen) Gya(Gregory) Cha(Chido), Rga(Rodgers) και Hy(Holley)], αν και είναι IgG δεν παρατηρήθηκαν περιπτώσεις αιμολυτικής νόσου του νεογνού που να έχουν αποδοθεί σε κάποιο από αυτά τα αντισώματα [99,105,107,188].

Τα αντισώματα που μπορεί να προκαλέσουν ήπια έως σοβαρή HDFN και σε παρουσία τους συνιστάται αξιολόγηση του εμβρύου είναι τα περισσότερα από αυτά που υφίστανται ως IgG:

Από το σύστημα Rh (αντι-D,-c, -E, -C,-Cw, -CX, -e, -Ew, -ce, -Ces, -Rh 29, -Rh32, -Goa). Από το σύστημα Kell: (αντι-K, -k, -Ku, -Kpa, -Kpb, -Jsa και -Jsb), από το σύστημα Duffy: (αντι-Fya,Fy3), από το σύστημα Kidd: (αντι-Jka, -Jkb -Jk3), από το σύστημα MNS: (αντι-M, -S, -s, -U, -Vw, -Far, -Mv, -Mit, -Mur, -Mia, -Mta), από άλλα συστήματα, αντι-PP1Pk; αντι-Lw, -Dia, Dib -Wra, -Sc2, -Doa, -Co3,-Ge, -Ena, -COa, -Biles, -Heibel, -Radin, -Wrighta, αντισώματα για

τα χαμηλής συχνότητας αντιγόνα: Bi, By, Fra, Good, Rd, Rea, Zd, αντισώματα για τα υψηλής συχνότητας αντιγόνα: Jra, Lan [171].

Τα αντισώματα Rh (αντι-D, αντι-c, αντι-E), Kell (αντι-K), Duffy (αντι-Fya) είναι τα πιο πιθανά να προκαλέσουν HDFN εξαιτίας των οποίων μπορεί να ζητηθεί ενδομήτρια μετάγγιση. Η HDFN, μετά τις μορφές που οφείλονται στην ασυμβατότητα ABO και RhD είναι εκείνη που προκαλείται από ασυμβατότητα για το αντιγόνο c (r')[177,190], το αντιγόνο Kell(K1) [197], το αντιγόνο C τα αντιγόνα του συστήματος Duffy [178,179] και σε μικρότερο βαθμό άλλα αντισώματα Rh (Cw, E, e) [177].

Τα αντισώματα αντι-E και αντι-M είναι αρκετά συχνά κατά την κύηση αλλά συνήθως δεν προκαλούν εμβρυική αναιμία στο βαθμό που προκαλούν τα αντι-D και αντι-K που αποτελούν την κυρίαρχη ένδειξη για ενδομήτρια μετάγγιση και έχουν τον υψηλότερο μέσο αριθμό μεταγγίσεων ανά κύηση [191]. Στην κύηση ο επιπολασμός των αλλοαντισωμάτων μη RhD, έχει διαπιστωθεί ότι κυμαίνεται από 0,15 έως 1,1% [192,193].

Τα αντι-Cw, -Fyb, -Jka, -Jkb, -Jk3, -S και -s συνήθως προκαλούν μόνο θετική DAT στο νεογνό και η θεραπεία, εάν είναι απαραίτητη σχεδόν πάντα περιορίζεται σε φωτοθεραπεία [96].

Τα αντισώματα που συνήθως δεν προκαλούν HDFN είναι: Τα αντι-Lewis, [194] αντι-P1, [195] αντι-I, αντι-N, αντι-M που είναι ψυχρά IgM αντισώματα συνήθως δεν διαπερνούν τον πλακούντα και δεν αναμένεται να προκαλέσουν HDFN [181]. Ωστόσο, ορισμένα από αυτά όπως το αντι-M μπορεί να είναι και IgG οπότε μπορεί να διασχίσουν τον πλακούντα και πιθανώς να προκαλέσουν HDFN [196]. Αν το αντι-M, IgG είναι βέλτιστα δραστικό στους 37⁰ C, και εντοπίζεται στα ερυθρά της μητέρας, πρέπει να ελεγχθεί και ο πατέρας για την παρουσία του αντιγόνου M στα ερυθρά του. Τα IgG αντι-M σπάνια προκαλούν HDN [195].

Αντισώματα όπως τα αντι-I, αντι-P, αντι-Lewis και αντι- Lutheran μπορούν να αγνοηθούν επειδή τα αντίστοιχα αντιγόνα σπάνια είναι ανεπτυγμένα κατά τη γέννηση, επομένως δεν απαιτούνται περαιτέρω δοκιμασίες όταν συναντώνται μόνο αυτές οι ειδικότητες αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [96].

2. HDFN – ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ABO / RHESUS

Η HDFN λόγω της ασυμβατότητας του **ABO** είναι σήμερα η πιο συνηθισμένη αιμολυτική νόσος του νεογνού στο δυτικό κόσμο [133]. Πράγματι, στο 15-20% των κυήσεων στο λευκό

πληθυσμό υπάρχει ABO ασυμβατότητα μεταξύ μητέρας ομάδας O και παιδιού ομάδας A ή B. Σε 10% αυτών των κυήσεων, η HDFN αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα της καταστροφής των εμβρυικών ερυθρών αιμοσφαιρίων, που προκαλούνται από αντισώματα κατηγορίας IgG αντι-A και / ή αντι-B στον μητρικό ορό. Ο ορολογικός συνδυασμός μητέρας-παιδιού στον οποίο αναπτύσσεται ευκολότερα κλινικά σημαντική ABO HDFN είναι η μητέρα της ομάδας O και το νεογνό της ομάδας A. Ωστόσο, μόνο σε περίπου 1,5-2% των περιπτώσεων η αιμολυτική νόσος του νεογνού απαιτεί υποστήριξη με μετάγγιση [63,151].

Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για την επικρατούσα μέτρια κλινική έκφραση της HDFN λόγω της ασυμβατότητας ABO: η αιμολυτική νόσος του νεογνού λόγω ABO από αντι-A και αντι-B αντισώματα που οφείλεται στα IgG αντισώματα της ομάδας O της μητέρας, παρόλο που είναι πολύ συχνή είναι κατά κανόνα υποκλινική για τους εξής λόγους: α) δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως κατά τη γέννηση, β) έχουν ευρεία κατανομή στους ιστούς και δεν περιορίζονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, με αποτέλεσμα ένα μικρό μόνο κλάσμα των IgG αντι-A και αντι-B που διαπερνούν τον πλακούντα να προσκολλάται στα ερυθρά του νεογνού [171,181,197], γ) τα αντι-A και τα αντι-B IgG είναι κατά κύριο λόγο IgG2, μια υποκατηγορία Ig με μικρότερη ικανότητα να διασχίζουν ενεργά τον πλακούντα [96].

Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν περιστασιακές αναφορές στη βιβλιογραφία για σοβαρές περιπτώσεις αιμολυτικής νόσου [198,199].

Η συχνότητα εμφάνισης HDFN λόγω της ασυμβατότητας ABO είναι υψηλότερη στους πληθυσμούς της Αφρικής και της Αραβίας λόγω της συχνότερης έκφρασης των γονιδίων A και B σε αυτούς τους πληθυσμούς.

Τα συμπτώματα της αιμολυτικής νόσου λόγω ABO είναι συνήθως ήπια και εκδηλώνονται στη νεογνική περίοδο [198]. Συνήθως εντός των πρώτων 36 ωρών μετά τη γέννηση στο νεογνό παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έμμεσης χολερυθρίνης και ήπια αναιμία. Τα νεογνά με ABO HDN συνήθως αντιμετωπίζονται με φωτοθεραπεία. Λιγότερο από 2% των νεογνών χρειάζονται μετάγγιση αίματος [180].

Η αιμολυτική νόσος του νεογνού από τον παράγοντα **Rhesus** επιβεβαιώθηκε το 1941 από τον Lewin. Η ασυμβατότητα μεταξύ εμβρύου και μητέρας αφορά στις περισσότερες περιπτώσεις (95%) τον παράγοντα D του συστήματος Rhesus. Σπανιότερα η ανοσοποίηση αφορά άλλους παράγοντες του συστήματος Rhesus, ακόμη δε σπανιότερα άλλους παράγοντες άλλων συστημάτων ομάδων αίματος. Η HDFN λόγω αντι-D συνεχίζει να

εμφανίζεται σε 0,4 ανά 1.000 γεννήσεις και η αλλοανοσοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων παραμένει η πλέον κοινή αιτία της εμβρυϊκής αναιμίας [96].

Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τη συνεχιζόμενη εμφάνιση αυτής της νόσου: (i) η πιθανή εξέλιξη της αντι-D ανοσοποίησης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ως αποτέλεσμα της απόκρυψης εμβρυομητρικής αιμορραγίας (FMH) συνήθως μετά την 28η εβδομάδα της κύησης η οποία επηρεάζει περίπου το 1% των RhD αρνητικών μητέρων ενός RhD θετικού εμβρύου [200], (ii) έλλειψη χορήγησης RhDIG [53], (iii) αναποτελεσματική RhDIG επειδή η χορηγούμενη ποσότητα δεν ήταν επαρκής για τον όγκο της FMH, (iv) πιθανά σφάλματα στην τυποποίηση Rh της εγκύου γυναίκας, και (v) πιθανά σφάλματα στη θεραπεία μετάγγισης γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία (μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων με ανεπιθύμητο αντιγόνο RhD) [96]. Η συχνότητα της αιμολυτικής αυτής νόσου εξαρτάται εν μέρει από το βαθμό επικράτησης του αρνητικού αντιγόνου του Rhesus στον πληθυσμό. Αυτό διαφέρει ανάλογα με τις φυλές και τις εθνικότητες [136].

Η συχνότητα των RhD αρνητικών γυναικών για τις Καυκάσιες είναι (15%) για τις Αφροαμερικανές (5%) και είναι λιγότερο συχνή στις Ασιάτισσες [180].

Σε κάθε 1000 επίτοκες λευκές γυναίκες περίπου 90 κυοφορούν έμβρυο Rhesus D(+), και η μητέρα είναι Rhesus D(-). Η συχνότητα της αιμολυτικής νόσου του νεογνού σε εκτεταμένες έρευνες βρέθηκε ότι είναι 6-7 περιπτώσεις σε 1000 γεννήσεις, δηλαδή μόνο σε μία από τις 15 εγκυμονούσες με εμβρυομητρική ασυμβατότητα στον παράγοντα Rhesus εμφανίζεται αιμολυτική νόσος στο νεογνό. Η εξήγηση είναι: α) Η ανοσοποίηση της μητέρας σπάνια εμφανίζεται κατά την πρώτη κύηση από μητέρες χωρίς ιστορικό μεταγγίσεων ή αμβλώσεων β) μερικά δεύτερα παιδιά είναι Rhesus D(-) και γ) μέρος μόνο των Rhesus (-) γυναικών θα αναπτύξει αντισώματα [122].

Η ανοσοποίηση της μητέρας κατά την κύηση προκαλείται από την είσοδο ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου στην κυκλοφορία της. Είναι γνωστό ότι η επικοινωνία της μητέρας με το έμβρυο γίνεται μέσω του πλακούντα.

Τα εμβρυικά ερυθροκύτταρα ανευρίσκονται στη μητρική κυκλοφορία πολύ νωρίς, από τους 2 πρώτους μήνες της κύησης και συνεχίζουν να ανευρίσκονται κατά τη διάρκεια της κύησης.

Έστω και μικρή ποσότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου μπορεί να προκαλέσει ανοσοποίηση. Το Rh D είναι το πιο ισχυρό ανοσογόνο και μόλις 0,1 έως 1 ml D θετικών ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων [192,201].

Μελέτες έχουν δείξει ότι αιμορραγίες μικρότερες από 1 ml αίματος εμφανίζονται στο 96% όλων των κυήσεων και ότι μεγαλύτερες απώλειες περίπου 30 ml εμφανίζονται σε ποσοστό έως και 0,3% όλων των κυήσεων [202]. Η ανοσοποίηση της εγκύου απαντάται πιο συχνά σε περιπτώσεις εκλαμψίας, καισαρικής τομής, διαγνωστικές εξετάσεις κατά την κύηση και σε αφαίρεση του πλακούντα με διάφορους χειρισμούς.

Φυσιολογικά η τάση του μητρικού αίματος στα μεσολάχνια είναι μικρότερη από την τάση των τριχοειδών του εμβρύου. Απεναντίας, κατά τη σύσπαση της μήτρας παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο, που φέρνει διαταραχή της αιμοδυναμικής κυκλοφορίας του πλακούντα. Αυτό εξηγεί το πώς αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου μπορεί να περνά μέσω της μεμβράνης στη κυκλοφορία της μητέρας. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια του εμβρύου διαφέρουν από εκείνα του ενήλικα, γιατί περιέχουν σε μεγάλη αναλογία εμβρυική αιμοσφαιρίνη [183] που διαφέρει όπως είναι γνωστό από την αιμοσφαιρίνη του ενήλικα ($HbF \rightarrow HbA$) [203].

Έχει διαπιστωθεί ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια του εμβρύου, που έχουν εισέλθει μέσω του πλακούντα στην κυκλοφορία της μητέρας δεν επιζούν όταν υπάρχει ασυμβατότητα ομάδων αίματος του συστήματος ABO, μεταξύ μητέρας και εμβρύου.

Η ABO ασυμβατότητα έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της αλλοανοσοποίησης για το RhD [180] και για τα υπόλοιπα εκτός των ABO αντιγόνων, πιθανότατα λόγω μητρικών ισοαιμοσυγκολλητινών που απομακρύνουν ταχέως τα εμβρυικά RBCs από την κυκλοφορία της μητέρας. Τα εμβρυικά κύτταρα που διαρρέουν στην κυκλοφορία της μητέρας καταστρέφονται ταχέως από τα ισχυρά μητρικά αντι-A και / ή το αντι-B αντισώματα μειώνοντας την πιθανότητα έκθεσης της RhD(-) μητέρας στο αντιγόνο D όταν κυοφορεί έμβρυο RhD(+) [181].

Αντίθετα, όταν υπάρχει συμβατότητα των ομάδων αίματος ABO, η πιθανότητα ευαισθητοποίησης έναντι του παράγοντα ρέζους, αυξάνεται σε σύγκριση με τις περιπτώσεις ομάδων αίματος ασύμβατου ως προς το σύστημα ABO [197]. Ο κίνδυνος της αλλοανοσοποίησης RhD μετά τον πρώτο τοκετό είναι 16% εάν το έμβρυο είναι συμβατό με τη μητέρα ως προς ABO και 2% αν δεν είναι συμβατό ως προς ABO [180].

Η είσοδος των αντι-D αντισωμάτων στην κυκλοφορία του εμβρύου θα προκαλέσει την αιμολυτική νόσο.

Η ανοσολογική προφύλαξη του νεογνού εξασφαλίζεται τους πρώτους μήνες μετά τον τοκετό από τα αντισώματα της μητέρας που είχαν εισέλθει στην κυκλοφορία του εμβρύου

πριν από τον τοκετό. Ο μηχανισμός αυτός δηλαδή η απόκτηση των αντισωμάτων μέσω του νεογνικού υποδοχέα Fc (FcRn) είναι πολύτιμος, γιατί στο χρονικό αυτό διάστημα το νεογνό δεν έχει τους απαραίτητους αυτούς παράγοντες για την άμυνά του. Αντίθετα ο μηχανισμός αυτός είναι καταστρεπτικός, αν η μητέρα έχει ευαισθητοποιηθεί έναντι των αντιγόνων του εμβρύου. Ο νεογνικός υποδοχέας Fc (FcRn) δεσμεύει αντισώματα αποκλειστικά από την τάξη IgG [204]. Έχει αποδειχθεί ότι σε νεογνά με χαμηλό βάρος γέννησης, όλες οι υποκλάσεις IgG μεταφέρονται με μειωμένη αποτελεσματικότητα, αλλά οι υποκατηγορίες IgG1 και IgG2 μεταφέρονται με σημαντικά μικρότερη αποτελεσματικότητα από ότι οι IgG3 και IgG4. Η μεταφορά IgG από τη μητέρα στο έμβρυο αρχίζει ήδη από τη 13η εβδομάδα κύησης και η μεταφορά γίνεται ανοδικά με την πρόοδο της εγκυμοσύνης, με τη μεγαλύτερη ποσότητα να μεταφέρεται στο τρίτο τρίμηνο. Οι Malek και συν. [205] κατέδειξαν μια συνεχή αύξηση των επιπέδων της IgG στην εμβρυική κυκλοφορία μεταξύ 17ης και 41ης εβδομάδας κύησης. Οι συγκεντρώσεις IgG στο έμβρυο ήταν μόνο 5% -10% των μητρικών επιπέδων τις εβδομάδες 17η-22η αλλά έφθασαν το 50% των μητρικών συγκεντρώσεων τις εβδομάδες 28η-32η. Η πλειοψηφία της IgG αποκτάται από το έμβρυο κατά τη διάρκεια των τελευταίων 4 εβδομάδων της κύησης και οι συγκεντρώσεις IgG στο έμβρυο συνήθως υπερβαίνουν τις μητρικές κατά 20% -30% στο τέλος της κύησης [206]. Είναι ενδιαφέρον ότι μια απότομη αύξηση των επιπέδων των IgG εμφανίζεται μετά την 36η εβδομάδα της κύησης [167].

Οι συνολικές συγκεντρώσεις IgG στα νεογνά συνεπώς σχετίζονται άμεσα με την ηλικία της κύησης και τα βρέφη που γεννιούνται σε λιγότερο από 33 εβδομάδες κύησης έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα IgG από ό, τι τα τελειόμηνα νεογνά. Δεδομένου ότι η έκφραση του υποδοχέα FcRn εξαρτάται από την ηλικία κύησης και φαίνεται να εκφράζεται περισσότερο στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, παρατηρείται μειωμένη μεταφορά αντισωμάτων στα αρχικά στάδια της κύησης. Μειωμένη μεταφορά υποκλάσεων IgG, ιδιαίτερα IgG1 και IgG2, παρατηρείται σε πρόωρα, σε σύγκριση με τα τελειόμηνα νεογνά [207]. Το ποσό των εισερχόμενων αντι-D αντισωμάτων στην κυκλοφορία του εμβρύου καθορίζει και την βαρύτητα της νόσου. Η παρουσία των αντι-D αντισωμάτων γίνεται αντιληπτή στο τέλος της πρώτης εγκυμοσύνης. Ως εκ τούτου ο βραδύς ρυθμός εισόδου των αντισωμάτων προστατεύει το Rhesus(+) έμβρυο.

Αυτό μπορεί να είναι μία από τις αιτίες που το πρώτο παιδί δεν νοσεί όσο τα επόμενα παιδιά. Πράγματι, εφόσον στην πρώτη εγκυμοσύνη τα περισσότερα από τα αντισώματα

εμφανίζονται μετά την 22^η εβδομάδα της κύησης, θεωρείται πολύ λογικό η βαρύτητα της νόσου του νεογνού να μην είναι του ίδιου βαθμού όσο κατά τις επόμενες κυήσεις, όπου τα αντισώματα εμφανίζονται ευθύς εξαρχής με την εγκυμοσύνη. Η αιμολυτική νόσος του νεογνού τείνει να είναι πιο βαριάς μορφής στη δεύτερη εγκυμοσύνη. Η HDFN σπάνια εμφανίζεται κατά τη διάρκεια μιας πρώτης εγκυμοσύνης, εκτός εάν η μητέρα έχει προηγουμένως ευαισθητοποιηθεί με μεταγγίσεις. Συνήθως, κατά τη διάρκεια της πρώτης εγκυμοσύνης προκύπτει η αρχική ανοσοποίηση. Αυτή η ανοσοποίηση χαρακτηρίζεται από την παραγωγή μίας μικρής ποσότητας IgM αντισωμάτων, που δεν διασχίζουν τον πλακούντα. Σε επόμενες εγκυμοσύνες και μετά από περαιτέρω έκθεση στο αντιγόνο, ως αποτέλεσμα της δευτερογενούς ανοσοποίησης, παράγονται αντισώματα IgG, τα οποία μπορούν να διασχίσουν τον πλακούντα και να προκαλέσουν αιμόλυση [96].

Η ανοσοαπόκριση εξαρτάται από την οντότητα της FMH, τον αριθμό των γεγονότων ανοσοποίησης και την ικανότητα αντίδρασης της γυναίκας.

Στη φυσική ιστορία της HDFN χωρίς παρεμβάσεις, στο 50% των περιπτώσεων το έμβρυο έχει μόνο ήπια σημάδια της νόσου και ανακάμπτει χωρίς καμία θεραπεία. Σε 25% των περιπτώσεων το έμβρυο αναπτύσσει αιμόλυση και πυρηνικό ίκτερο αν δεν αντιμετωπιστεί επαρκώς κατά τη γέννηση και στο υπόλοιπο 20-25% των περιπτώσεων η HDFN που οφείλεται σε αντι-D μπορεί να εμφανιστεί στην πιο σοβαρή μορφή της (εμβρυικός ύδρωπας και θάνατος) πριν από την 34^η εβδομάδα της κύησης [53].

Η ευαισθητοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου από τα μητρικά κύτταρα είναι το βασικό φαινόμενο, από το οποίο απορρέει η όλη συμπτωματολογία της αιμολυτικής νόσου του νεογνού. Η ανοσοποίηση αυτή θα προκαλέσει στο έμβρυο την υπέρμετρη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων του δηλαδή αιμόλυση.

Ο βαθμός αιμόλυσης εξαρτάται από την ποσότητα των αντισωμάτων που εισήλθαν στο έμβρυο. Η καταστροφή των ευαισθητοποιημένων ερυθρών αιμοσφαιρίων γίνεται κατ' αρχήν στο σπλήνα και αναφέρεται ως εξωαγγειακή καταστροφή [96]. Σε αυτή την περίπτωση, σε αντίθεση με την ενδοαγγειακή, για την αιμόλυση δεν χρειάζεται το συμπλήρωμα [111]. Ο βαθμός καταστροφής στο σπλήνα δεν είναι μεγάλος. Έτσι μετά τον κορεσμό αυτού του μηχανισμού η καταστροφή θα γίνει ενδοαγγειακά. Στο υγιές έμβρυο η παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων από το ήπαρ και το σπλήνα μειώνεται προοδευτικά από τον 5^ο μήνα.

Σε βαριές περιπτώσεις, εξαιτίας της παρουσίας μεγάλης ποσότητας μητρικών αντισωμάτων στο έμβρυο, ο βαθμός της αιμόλυσης υπερβαίνει το βαθμό παραγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αναιμία, που μπορεί να προκαλέσει ιστική ανοξία και καρδιακή ανεπάρκεια που προκαλεί γενικευμένο οίδημα (εμβρυικός ύδρωπας) [127].

Ωστόσο, με τη βελτίωση της παρακολούθησης της μητέρας και του εμβρύου και τη σημερινή δυνατότητα της ενδομήτριας μετάγγισης, η συχνότητα εμφάνισης σοβαρών περιπτώσεων (εμβρυικός ύδρωπας και θάνατος) έχει μειωθεί στο 10% περίπου [208].

Τελικά, ο βαθμός καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου εξαρτάται α) από την ποσότητα των αντι-Rhesus αντισωμάτων και από την δυνατότητα καταστροφής τους από το ΔΕΣ και β) από τη γονοτυπική σύνθεση του παράγοντα Rhesus που βρίσκεται στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου.

Πιο αναλυτικά: Η παρουσία δύο γόνων D (ομοζυγώτης) επηρεάζει δυσμενέστερα από την παρουσία ενός γόνου D (ετεροζυγώτης). Αυτό εξηγείται από τη διαφορά του αριθμού των θέσεων του αντιγόνου D στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ο ομοζυγώτης έχει πολύ περισσότερες θέσεις από τον ετεροζυγώτη).

Πρόβλεψη βαρύτητας της νόσου

Πρόβλεψη της βαρύτητας της νόσου μπορεί να υπάρξει όταν γνωρίζουμε:

- **Το ιστορικό.** Η βαρύτητα της αιμολυτικής νόσου εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από τις επανειλημμένες κυήσεις. Έτσι γυναίκα Rhesus D(-), που είχε στο παρελθόν παιδί με βαριά μορφή αιμολυτικής νόσου, υπάρχει πιθανότητα σε επόμενη κύηση να γεννήσει νεκρό έμβρυο. Το ιστορικό όμως από μόνο του έχει περιορισμένη αξία.
- **Τον τίτλο των μητρικών αντι-Rhesus αντισωμάτων.** Η βαρύτητα της αναιμίας του νεογνού εξαρτάται από το ποσό των μητρικών αντι-D αντισωμάτων που θα εισέλθουν στην κυκλοφορία του νεογνού.

Σε περίπτωση που ο σύζυγος είναι ετεροζυγώτης ως προς τον παράγοντα D, το έμβρυο μπορεί να είναι Rhesus D(-).

ΑΝΟΣΟΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ

Η εργαστηριακή εξέταση των εγκύων συμβάλλει στην ανίχνευση της ασυμβατότητας μεταξύ μητέρας και νεογνού. Παρέχεται η ευκαιρία να εφαρμοστεί η επαρκή πρόληψη της αλλοανοσοποίησης για το αντι-D που είναι και το πιο συχνό, η ανίχνευση και ταυτοποίηση άλλων εκτός RhD αντισωμάτων, η έγκαιρη διάγνωση και η εισαγωγή στη θεραπεία της αιμολυτικής νόσου στα νεογνά [210].

Σκοπός της προγεννητικής εξέτασης είναι:

- Ο προσδιορισμός του RhD γυναικών έτσι ώστε η RhDIG θεραπεία να εισάγεται κατά την κύηση για την πρόληψη αλλοανοσοποίησης στο αντίσωμα D, και για να προσδιοριστεί η ανάγκη για την απαιτούμενη δόση της RhDIG ανοσοσφαιρίνης κατά τον τοκετό [211,212].
- Να προσδιορίσει την παρακολούθηση (με τιτλοποίηση αντισώματος) των εγκύων με δυνητικά σημαντικά αλλοαντισώματα. Τα δεδομένα που λαμβάνονται χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί εάν και πότε πρέπει να υπάρξει παρακολούθηση για HDFN με άλλα μέσα, όπως η μέτρηση της ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας [51,135,213-215].
- Να βοηθήσει στη διαχείριση της HDFN όσον αφορά το ρόλο της αιμοδοσίας που είναι να παρέχει τη σωστή μετάγγιση (αν χρειαστεί) στο επηρεαζόμενο έμβρυο ή νεογνό. Όταν υπάρχει υποψία HDFN αλλά ο μητρικός ορός φαίνεται να στερείται μη-αναμενόμενων αντισωμάτων, το ανοσοαιματολογικό εργαστήριο πρέπει να αποκλείσει ή να προσδιορίσει μία ανοσολογική βάση για την κλινική κατάσταση του νεογνού. Τις περισσότερες φορές αυτό συνεπάγεται δοκιμασίες για ABO ασυμβατότητα μεταξύ μητέρας και παιδιού, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις θα βρεθεί ο μητρικός ορός να περιέχει αντίσωμα σε ένα πατρικής προέλευσης αντιγόνο το οποίο μπορεί να είναι χαμηλού επιπολασμού στο γενικό πληθυσμό.
- Για να προσδιοριστεί ο τύπος RhD των βρεφών που γεννήθηκαν από RhD αρνητικές μητέρες, και να λάβουμε υπόψη μας την πιθανότητα εμβρυομητρικής αιμορραγίας που απαιτεί θεραπεία με περισσότερες από μία δόσεις της RhDIG ανοσοσφαιρίνης.
- Η πιθανή ανάδειξη άλλων αντισωμάτων εκτός του αντι-D και η αντιμετώπιση πιθανής HDFN από αυτά.

1. ΕΞΕΤΑΣΗ RhD ΕΓΚΥΟΥ

Ο έλεγχος ρουτίνας περιλαμβάνει εκτός από το ABO και τον προσδιορισμό του RhD της μητέρας και γίνεται στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Για το RhD τα αποτελέσματα πρέπει να είναι σαφή ($\geq 2+$) για να χαρακτηριστεί η μητέρα RhD(+) [45]. Ο προσδιορισμός παραλλαγών D είναι σημαντικός για την πρόληψη αιμολυτικής νόσου του εμβρύου και του νεογνού που σχετίζεται με το αντι-D [196].

Η επικράτηση των ασθενών D φαινοτύπων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων εθνοτήτων.

Περιστασιακά, μερικά D RBCs έχουν μειωμένη έκφραση του αντιγόνου D και ανιχνεύονται ορολογικά ως D weak με τυποποίηση RhD ρουτίνας. Ένα τεστ με χρήση αντισφαιρινικού ορού για την ανίχνευση μερικών από τις ασθενέστερες μορφές φαινοτύπων παραλλαγής D δεν συνιστάται, αντιθέτως ενέχει τον κίνδυνο σε μεγάλη εμβρυομητρική αιμορραγία και παρουσία εμβρυικών D θετικών ερυθρών να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα και να μην γίνει ανοσοπροφύλαξη με RhDIG. Τα αντιδραστήρια για την ταυτοποίηση του RhD δεν πρέπει να ανιχνεύουν το DVI, που είναι η πιο συνηθισμένη παραλλαγή D στους Καυκάσιους και σχετίζεται με το σχηματισμό αντι-D [42,45]. Όσον αφορά την παραλλαγή DEL, οι έγκυες γυναίκες με πλήρη φαινότυπο DEL και με θετικό για RhD νεογνό δεν διατρέχουν κίνδυνο να σχηματίσουν αντι-D, αλλά οι έγκυες γυναίκες με ορισμένα μερικά ή υβριδικά αλληλόμορφα DEL διατρέχουν κίνδυνο σχηματισμού αντι-D. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον επιπολασμό των φαινοτύπων DEL και του αλληλόμορφου *RHD* (1227G> A) [216] μεταξύ των RhD αρνητικών ατόμων σε διαφορετικούς φυλετικούς και εθνικής προέλευσης πληθυσμούς.

Οριστική ταυτοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με μοριακές δοκιμές, είτε με kit είτε με συστοιχίες που έχουν σχεδιαστεί για να αναγνωρίσουν πολλές ή περισσότερες από τις γνωστές παραλλαγές, είτε με προσδιορισμό της αλληλουχίας του RHD, η οποία επίσης θα προσδιορίσει νέες παραλλαγές [201]. Μετά τον προσδιορισμό της παραλλαγής του D, πρέπει να υπάρχει πολιτική για τη μετάγγιση και την προφύλαξη από αλλοανοσοποίηση από αντι-D.

2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΤΕΡΑ

Εάν διαγνωστεί η αλλοανοσοποίηση της μητέρας και ο βιολογικός πατέρας του εμβρύου είναι γνωστός, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός του πατέρα είναι απαραίτητος για την ανίχνευση της παρουσίας αντιγόνου στην οποία εστιάζονται τα αντισώματα της μητέρας.

Εάν ο πατέρας είναι αρνητικός ως προς το αντιγόνο, δεν υπάρχει πιθανότητα το έμβρυο να είναι θετικό στο αντιγόνο και γι' αυτό δεν υπάρχει κίνδυνος για HDFN που θα μπορούσε να προκληθεί από τα αλλοαντισώματα της μητέρας [51].

Ο έλεγχος του φαινοτύπου των ερυθρών αιμοσφαιρίων του πατέρα είναι σωστή τακτική όταν υπάρχουν δυνητικά σημαντικά αντισώματα στον ορό της μητέρας. Με βάση τον πιθανό γονότυπο (πιθανότητα ομοζυγωτίας π.χ. για το D) είναι δυνατόν να προβλεφθεί η πιθανότητα το έμβρυο να φέρει το αντιγόνο στο οποίο η μητέρα έχει αναπτύξει αντισώματα. Ο μοριακός γονότυπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί εάν ο πατέρας είναι ετερόζυγος για το γονίδιο που κωδικοποιεί το αντιγόνο στο οποίο έχει αναπτύξει αντίσωμα η μητέρα [149].

Δεν προκαλούν HDFN όλα τα δυνητικά σημαντικά αντισώματα που παρατηρούνται κατά την εγκυμοσύνη, ειδικά όταν η απόκτηση αντισώματος δεν σχετίζεται με την τρέχουσα εγκυμοσύνη. Για παράδειγμα, τα αντισώματα μπορεί να έχουν προκληθεί μετά μετάγγιση, ή μπορεί να έχουν προκύψει από προηγούμενη εγκυμοσύνη από διαφορετικό σύντροφο, οπότε το σημερινό έμβρυο όντας αρνητικό στο αντιγόνο δεν διατρέχει κίνδυνο για HDFN.

Σε RhD αλλοανοσοποιημένες κυήσεις τα πατρικά ερυθρά κύτταρα θα πρέπει να εξετάζονται αρχικά για τα αντιγόνα D, C, c, E και e. Σε εγκυμοσύνες που περιλαμβάνουν δυνητικά σημαντικά αντισώματα εκτός Rh, θα πρέπει να διεξάγονται δοκιμασίες για το αντιγόνο στο οποίο έχει αναπτυχθεί αντίσωμα και το αντιθετικό του αντιγόνου. Εκτός από τις σπάνιες καταστάσεις που αφορούν μηδενικά γονίδια (null), υπάρχει συσχέτιση με τον φαινότυπο και τον γονότυπο. Τα έμβρυα με ομόζυγους (DD) πατέρες θα είναι D θετικά, αλλά μόνο το ήμισυ των ατόμων που γεννιούνται από ετερόζυγους (Dd) πατέρες θα είναι θετικά (για μητέρα dd) [183].

Εάν ένα πατρικό δείγμα δεν είναι διαθέσιμο, και σε παρακολούθηση του μητρικού τίτλου αντισώματος υπάρχει τετραπλάσια αύξηση του τίτλου, τότε είναι απίθανη η ύπαρξη αρνητικού αντιγόνου στο έμβρυο [217].

3. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ

Οι μοριακές δοκιμασίες είναι χρήσιμες για τον προσδιορισμό του γονότυπου των ομάδων αίματος και για τον έλεγχο του εμβρυϊκού υλικού που προέρχεται από αμνιακό υγρό [218,219]. Ο εμβρυϊκός γονότυπος είναι ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο όταν : α) μια έγκυος γυναίκα έχει ένα κλινικά σημαντικό αντίσωμα, β) όταν υπάρχει ιστορικό HDFN από προηγούμενη κύηση και γ) το αντιγονικό προφίλ του πατέρα είναι άγνωστο ή εκφράζει το αντίστοιχο αντιγόνο έναντι του οποίου έχει αναπτύξει αντίσωμα η έγκυος [149].

Ο προσδιορισμός του φαινοτύπου D του εμβρύου μπορεί να πραγματοποιηθεί με μοριακό έλεγχο εμβρυϊκού ελεύθερου DNA (ffDNA) στο αίμα εγκύων γυναικών [127,220,221]. Σε μελέτες που έχουν γίνει από την 11^η-30^η εβδομάδα κύησης η ανάλυση της διαγνωστικής ακρίβειας περιορίστηκε στην περίοδο της 24^{ης} -28^{ης} εβδομάδας κύησης. Σε ηλικία κύησης <23+6w η ευαισθησία και η ακρίβεια ήταν 99,6% και 95,5% αντίστοιχα [222]. Χρησιμοποιώντας τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, η κατάσταση RHD του εμβρύου μπορεί να ανιχνευθεί με μεγάλη ευαισθησία χρησιμοποιώντας ελεύθερο εμβρυϊκό DNA που εξάγεται από το μητρικό πλάσμα. Το εμβρυϊκό C, c, E, e και ο γονότυπος K μπορούν επίσης να ανιχνευθούν με τη χρήση αυτής της μεθόδου [223].

Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι ο γονότυπος μπορεί να πραγματοποιηθεί από την 16η εβδομάδα της κύησης στο τέλος του πρώτου τριμήνου και στις αρχές του δεύτερου [96]. Η γονιδιακή ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών RhD του εμβρύου είναι επί του παρόντος το πρότυπο διαχείρισης σε γυναίκες με αντι-D αλλοανοσοποίηση σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες. Ωστόσο, δεν είναι απαλλαγμένο από μειονεκτήματα ή / και σφάλματα. Η διαγνωστική ακρίβεια του μη επεμβατικού προσδιορισμού του εμβρυϊκού Rh χρησιμοποιώντας μητρικό περιφερικό αίμα είναι 94.8%. με χαμηλό ποσοστό ψευδών αρνητικών [224,225].

Ο έλεγχος εμβρυϊκού DNA έχει ήδη εφαρμοστεί σε επίπεδο ρουτίνας στην Ολλανδία και Δανία, και με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η άσκοπη χορήγηση της ανοσοπροφύλαξης με RhDIG στις περιπτώσεις D αρνητικών εγκύων που κυοφορούν D αρνητικό έμβρυο.

Το Rh D(-) μπορεί να προκύψει από πολλαπλά μοριακά υπόβαθρα και να διαφέρει μεταξύ των εθνοτήτων [186].

Ο μοριακός έλεγχος εμβρυικού DNA σε αλλοανοσοποιημένες γυναίκες αφορά και το μοριακό έλεγχο αντιγόνων εκτός του RhD όπως C, E, c, K, ανάλογα με τον τύπο της αλλοανοσοποίησης [223].

Συνιστάται ιδιαίτερα η μητέρα και ο πατέρας να υποβάλλονται σε μοριακή ανάλυση για τα RhE, Rhe, RhC, Rhc, Kell και Cellano (k) και το DNA των γονιών πρέπει να γίνεται ταυτόχρονα με του εμβρύου για να επιβεβαιωθεί ότι οι γνωστοί φαινότυποι των γονέων συμφωνούν με τους αντίστοιχους γονοτύπους τους [226]. Η ικανότητα να διακρίνεται το K από το k σε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) που μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα DNA που λαμβάνονται από αμνιακά εμβρυικά κύτταρα, αποδεικνύεται χρήσιμη στην πρόβλεψη της HDFN σε έγκυες γυναίκες που έχουν αναπτύξει αντι-K αντίσωμα [73]. Το αντιγόνο K μπορεί να ελεγχθεί από την 20η εβδομάδα, λόγω του κινδύνου παραποίησης των αποτελεσμάτων εάν πραγματοποιηθεί νωρίτερα κατά τη διάρκεια της κύησης [181].

Η ταξινόμηση χαμηλής ή υψηλής επικινδυνότητας για την εμβρυϊκή αναιμία με βάση τον τύπο του αντισώματος, τον πατρικό φαινότυπο και το εμβρυικό αντιγόνο επιτρέπει την επακόλουθη παρακολούθηση της εγκυμοσύνης αναλόγως με καλά περιγεννητικά αποτελέσματα εντάσσοντάς τη στην ομάδα χαμηλού κινδύνου [168].

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ**1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ**

Η δοκιμασία ταυτοποίησης αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων χρησιμεύει για να προσδιοριστεί η ανάγκη για πρόσθετες μελέτες για την παρακολούθηση του εμβρύου για ενδείξεις HDFN. Ένας ακριβής τίτλος σε σύγκριση με έναν προηγούμενο που πραγματοποιείται με την ίδια τεχνική, μπορεί να ανιχνεύσει μια αυξημένη παραγωγή μητρικού αντισώματος και να καθορίσει την ανάγκη παρακολούθησης της εγκυμοσύνης με πρόσθετες μεθόδους όπως το υπερηχογράφημα Doppler [51,135,214,215].

Εάν οι δοκιμασίες για μη αναμενόμενα αντισώματα είναι θετικές σε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης θα πρέπει να προσδιορίζεται η ειδικότητα του αντισώματος. Δεν πρέπει να θεωρηθεί ότι ένα αντίσωμα που υπάρχει σε μια Rhesus (-) γυναίκα είναι αντι D, ακόμα και μετά από θεραπεία με RhDIG.

Εάν ο έλεγχος για αντισώματα είναι θετικός, προκειμένου να εκτιμηθεί ο κίνδυνος HDFN, πρέπει να προσδιοριστεί η ειδικότητα, ο τίτλος και η προέλευση των αντισωμάτων, με προσεκτική λήψη μαιευτικού ιστορικού από τη γυναίκα. Σε αυτή τη φάση μπορεί επίσης να είναι χρήσιμο να προσδιοριστούν οι υπάρχουσες υποκλάσεις IgG για να εκτιμηθεί όσο το δυνατόν ακριβέστερα ο πραγματικός κίνδυνος αιμόλυσης [96].

Πίνακας 12. Συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας των αντισωμάτων αντι-D και των υποκατηγοριών IgG με τη σοβαρότητα της αιμολυτικής νόσου του εμβρύου και του νεογνού

	IgG1		IgG2		control	IgG
Dilution	1 : 1	1 : 100	1 : 1	1 : 100		1 : 10
Reaction	2+	/	/	/	/	3+
Interpretation	Mild risk (IgG1 low concentration)					
Reaction	3+	2+	/	/	/	3+
Interpretation	High risk (IgG high concentration)					
Reaction	3+	2+	2+	/	/	3+
Interpretation	High risk (IgG high concentration, IgG3 low concentration)					
Reaction	/	/	3+	2+	/	3+
Interpretation	High risk (IgG3 high concentration)					
Reaction	2+	/	3+	2+	/	3+
Interpretation	High risk (IgG1 low concentration, IgG3 high concentration)					

	IgG1		IgG2		control	IgG
Reaction	/	/	2+	/	/	3+
Interpretation	Mild risk (IgG3 low concentration)					
Reaction	3+	2+	3+	2+	/	3+
Interpretation	High risk (IgG1 I IgG3 high concentration)					

Η θετική αντίδραση με την πρώτη αραιώση ταιριάζει με επικαλυμμένα ερυθρά αιμοσφαίρια 1000 μορίων IgG1, δηλ. 125 μορίων IgG3 ανά ερυθρό κύτταρο αίματος. Τα θετικά αποτελέσματα με τη δεύτερη αραιώση επισημαίνουν υψηλή συγκέντρωση IgG1 και / ή IgG3 αντισωμάτων.

Velkova E. Correlation between the Amount of Anti-D Antibodies and IgG Subclasses with Severity of Haemolytic Disease of Foetus and Newborn. Open Access Maced J Med Sci 2015;3:293-297.

Οι οροί που περιέχουν αντισώματα αντι-D συχνά αποκαλύπτουν την υποκατηγορία IgG1 και IgG3, ή απλά IgG1 ή IgG3. Η λυτική ικανότητα του IgG3 είναι μεγαλύτερη από εκείνη του IgG1 [51,227].

Όταν συνυπάρχουν και οι δύο υποκατηγορίες IgG1 και IgG3, η HDFN έχει σοβαρότερη ένταση σε σύγκριση με την παρουσία μόνο IgG1 ή IgG3.

Παραδοσιακά, η τιτλοποίηση αντισωμάτων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της συνεχιζόμενης ευαισθητοποίησης, με όρια αύξησης της ισχύος του αντισώματος που δεν είναι σαφώς καθορισμένα, που χρησιμοποιείται για την ένδειξη της συνεχιζόμενης αύξησης της ανοσολογικής διέγερσης, πιθανώς λόγω της παρουσίας του αντιγόνου στα ερυθροκύτταρα του εμβρύου [229].

Η τιτλοποίηση είναι ένα τεστ διαλογής που παραδοσιακά χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει πότε θα παρακολουθηθεί για HDFN το έμβρυο με μη ορολογικές τεχνικές. Η τιτλοποίηση των δυνητικά σημαντικών αντισωμάτων που ανιχνεύει μια αυξημένη παραγωγή μητρικού αντισώματος μπορεί να καθορίσει την ανάγκη παρακολούθησης της εγκυμοσύνης με επιπρόσθετες μεθόδους για να προβλεφθεί η σοβαρότητα της HDFN. Σε συνδυασμό με προηγούμενο ιστορικό κυήσεων οι τίτλοι αντισώματος είναι 62% ακριβείς στην πρόβλεψη σοβαρής HDFN [69,230].

Τα αποτελέσματα της τιτλοποίησης πρέπει να συγκρίνονται με τα αποτελέσματα των δειγμάτων τιτλοποίησης που ελέγχθηκαν σε προηγούμενο χρόνο, και με τις ίδιες τεχνικές, με τη χρήση ερυθρών αιμοσφαιρίων με την ίδια έκφραση αντιγόνου.

Η τιτλοποίηση μη-IgG αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων στην κύηση είναι άσκοπη, καθώς αυτά δεν θα προκαλέσουν HDFN. Εκτός από την προστασία έναντι της πιθανότητας

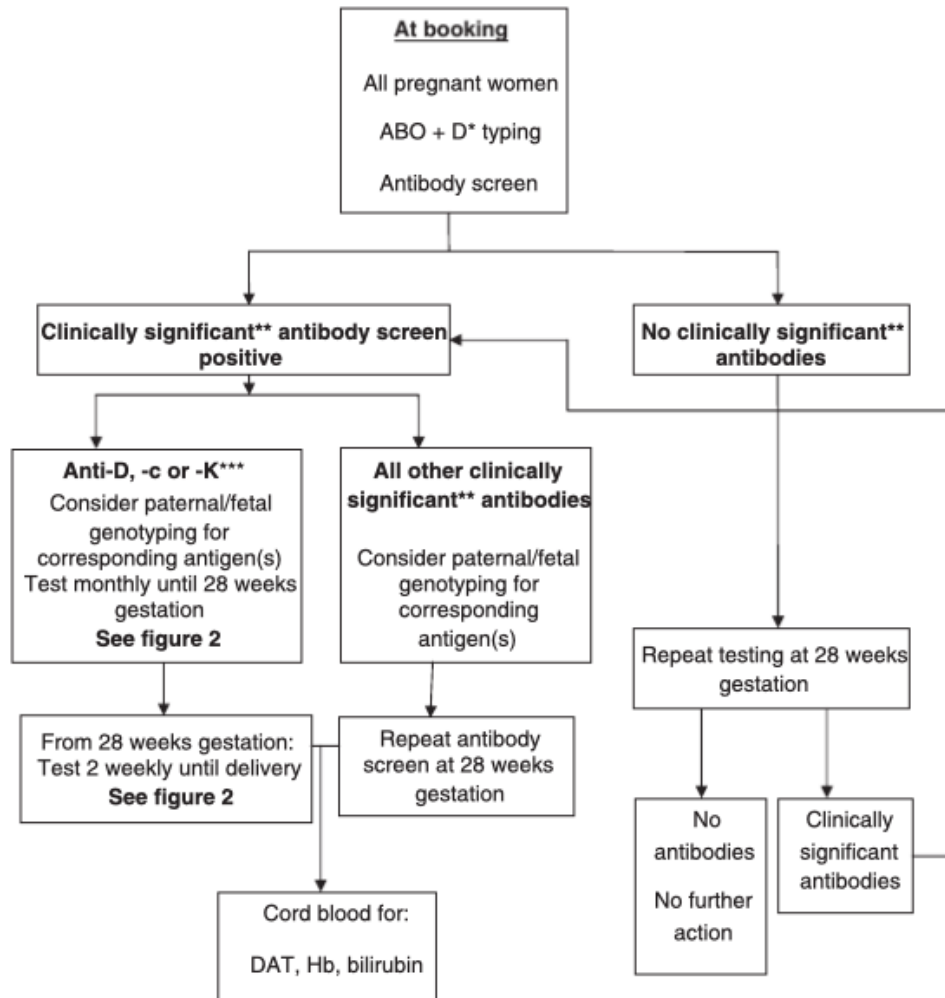
ψευδώς αρνητικών εμβρυϊκών αποτελεσμάτων γονότυπου Rh, οι μελέτες τιτλοποίησης δεν θα εκτελεστούν όταν επιτευχθεί ο κρίσιμος τίτλος ή εάν ληφθεί απόφαση για την παρακολούθηση της εγκυμοσύνης με μη ορολογικές μεθόδους.

2. ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

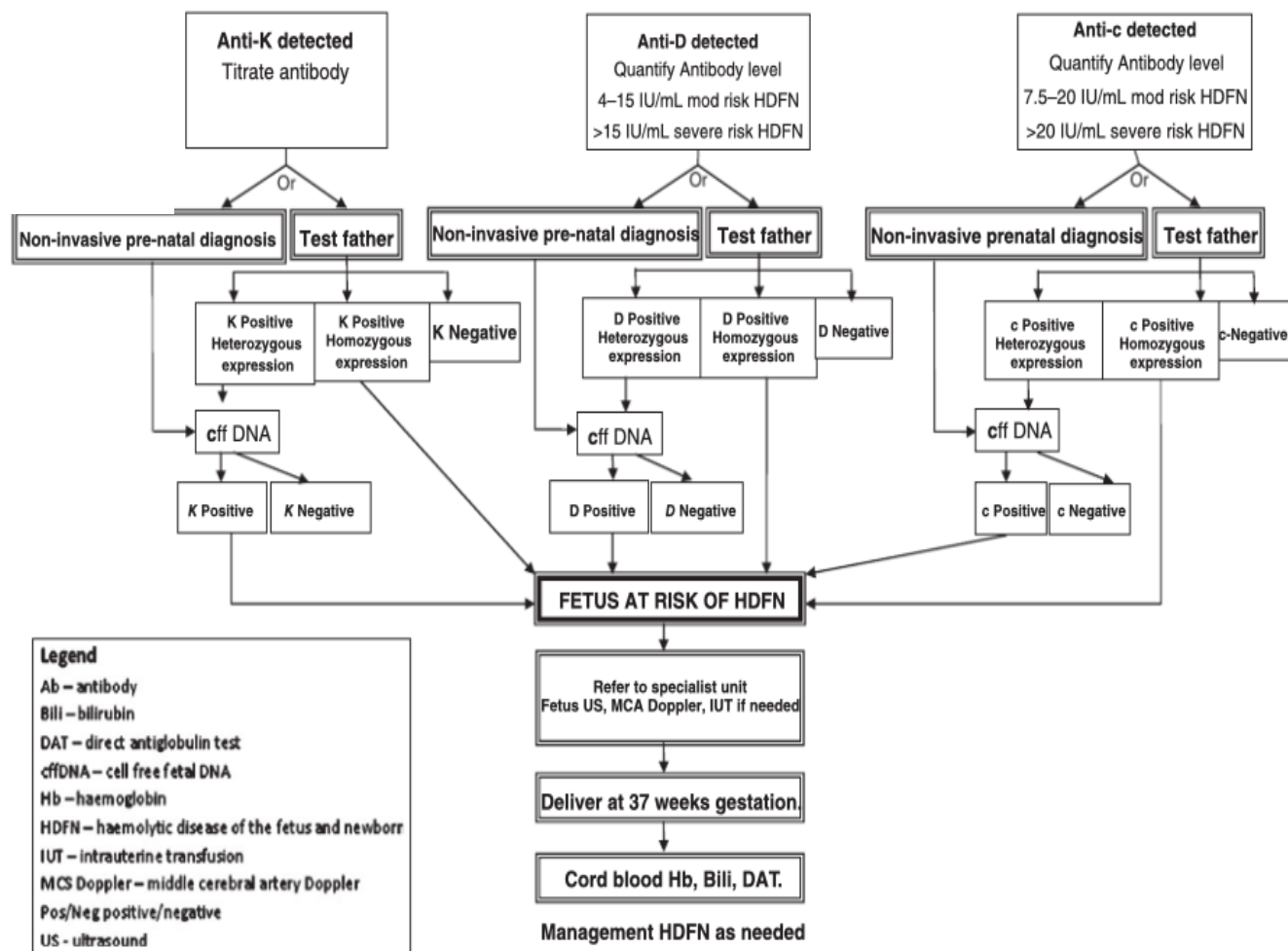
Οι κατευθυντήριες οδηγίες για την παρακολούθηση της αλλοανοσοποίησης των εγκύων βάση κοινής πρακτικής είναι οι εξής: Γίνεται έλεγχος τη 12^η εβδομάδα κύησης. Α) Επί αρνητικού αποτελέσματος η εξέταση θα πρέπει να επαναληφθεί την 28^η-32^η εβδομάδα [192] και στις RhD αρνητικές έγκυες πριν τη χορήγηση της RhD_{IG} την 28^η εβδομάδα. Β) Στις περιπτώσεις θετικού αρχικού ελέγχου (12^η εβδομάδα ΙΑΤ: θετική) ο έλεγχος ΙΑΤ, ταυτοποίηση και τιτλοποίηση επαναλαμβάνονται τη 18^η εβδομάδα, κάθε 4 εβδομάδες μέχρι την 28^η και κάθε 2 εβδομάδες μέχρι τη γέννηση με ταυτόχρονη παρακολούθηση του εμβρύου [212].

Οι αναζητήσεις για άλλα αντισώματα δεν πρέπει να διεξάγονται συστηματικά εάν το αποτέλεσμα της ΙΑΤ την 28^η εβδομάδα κύησης είναι αρνητικό [231]. Μη αναμενόμενα αντισώματα που ανιχνεύονται μόνο στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης συνήθως δεν προκαλούν HDFN [232].

Σε γυναίκες με αντισώματα που δεν είναι κλινικά σημαντικά, συνιστάται η ταυτοποίηση των αντισωμάτων να επαναλαμβάνεται ξανά την 24η και 34η εβδομάδα κύησης, εάν η γυναίκα είναι RhD αρνητική και την 34η εβδομάδα κύησης, εάν η γυναίκα είναι RhD θετική [199].



Εικόνα 2. Αλγόριθμος ανίχνευσης αντισωμάτων κατά την εγκυμοσύνη - προσαρμοσμένο από τις κατευθυντήριες οδηγίες του RCOG Greentop 65 2014 (Royal College of Obstetricians & Gynaecologists). White J. et al. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfusion Medicine* 2016;26:246-263.



Εικόνα 3. Αλγόριθμος διαχείρισης εγκυμοσύνης από αντι-D, αντι-K ή αντι-c αλλοανοσοποίηση - προσαρμοσμένο από την κατευθυντήρια οδηγία 65 2014 της RCOG Greentop (Royal College of Obstetricians & Gynaecologists)

White J, Qureshi H, Massey E et al. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfusion Medicine* 2016;26:246-263.

2α. Παρακολούθηση σε έγκυο / πρώτη αλλοανοσοποιημένη κύηση

Οι τίτλοι τείνουν να συσχετίζονται πιο αξιόπιστα με τη σοβαρότητα της εμβρυϊκής νόσου στην πρώτη ευαισθητοποιημένη εγκυμοσύνη σε σχέση με τις επόμενες εγκυμοσύνες [228]. Σε περίπτωση πρώτης εγκυμοσύνης εάν μια έγκυος έχει αντι-D αντίσωμα ή άλλα αντισώματα που είναι κλινικά σημαντικά σε σχέση με την HDFN το επίπεδο του αντισώματος αξιολογείται μέσω τιτλοποίησης κάθε 4 εβδομάδες μέχρι την 28η εβδομάδα και στη συνέχεια κάθε 2 εβδομάδες μέχρι τον τοκετό [96]. Οι τίτλοι αντι-K δεν συσχετίζονται καλά ούτε με την ανάπτυξη ούτε με τη σοβαρότητα της εμβρυϊκής αναιμίας [181].

Ένας τίτλος 16 είναι η κρίσιμη τιμή που μπορεί να αποδοθεί [69]. Εάν ο τίτλος είναι μεγαλύτερος από 16, μέσω υπερηχογραφήματος θα διαπιστωθεί αν το έμβρυο αναπτύσσει αναιμία με μέτρηση της ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας [228]. Οι μετρήσεις ξεκινούν περίπου τη 18η εβδομάδα και επαναλαμβάνονται κάθε 1 έως 2 εβδομάδες.

Εάν η ροή είναι ταχύτερη από την αναμενόμενη για την ηλικία του εμβρύου (1,5 μM), υπάρχει μεγάλη πιθανότητα σοβαρής αναιμίας, και είναι πολύ πιθανό να χρειαστεί ενδομήτρια μετάγγιση [53].

Συνιστάται η γέννηση την 37η έως 38η εβδομάδα. Οι κατευθυντήριες οδηγίες του BCSH αναφέρουν ότι οι γυναίκες που έχουν αναπτύξει αντι-c θα πρέπει να επανεξετάζονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο όπως σε περίπτωση αλλοανοσοποίησης από αντι-D [233].

Εάν ένα πατρικό δείγμα δεν είναι διαθέσιμο, και σε παρακολούθηση του μητρικού τίτλου αντισώματος υπάρχει μεγάλη αύξηση του τίτλου, τότε είναι απίθανη η ύπαρξη αρνητικού αντιγόνου στο έμβρυο [217].

2β. Παρακολούθηση σε έγκυο / δεύτερη αλλοανοσοποιημένη κύηση.

Όλες οι έγκυες γυναίκες που είχαν ιστορικό κυήσεων με HDFN θα πρέπει να παρακολουθούνται εκτενώς πριν από την 20η εβδομάδα κύησης για αξιολόγηση της κατάστασης, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση αντισωμάτων ή την ειδικότητα του αντισώματος [149].

Εάν υπάρχει ιστορικό μιας προηγούμενης εγκυμοσύνης με HDFN, μπορεί να χρειαστεί υπερηχογράφημα για να διαπιστωθεί εάν το έμβρυο αναπτύσσει αναιμία μετρώντας την ταχύτητα ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας ξεκινώντας από περίπου την 16 έως 18^η εβδομάδα. Οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται κάθε 1 έως 2 εβδομάδες. Εάν η ροή είναι ταχύτερη από την αναμενόμενη για την ηλικία του εμβρύου (1,5 μM), είναι πιθανό το ενδεχόμενο σοβαρής αναιμίας και μπορεί να χρειαστεί ενδομήτρια μετάγγιση [53] ή πρόωρος τοκετός λόγω εμβρυικής αναιμίας. Ο σκοπός της ενδομήτριας μετάγγισης είναι να διατηρηθεί η τιμή της αιμοσφαιρίνης του εμβρύου σε τιμή μεγαλύτερη από 9 g / dL [228]. Συνιστάται ο τοκετός την 37η έως 38η εβδομάδα.

Οι μητρικοί αντι-D τίτλοι κατά την πρώτη κύηση δεν βοηθούν στην παρακολούθηση του βαθμού αναιμίας του δεύτερου εμβρύου [234].

Στην περίπτωση ετεροζυγωτικού πατρικού φαινοτύπου, πρέπει να διαπιστωθεί το RhD του εμβρύου. Εάν το έμβρυο είναι RhD θετικό, η παρακολούθηση για HDFN θα πρέπει να γίνει

με μέτρηση της ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας με υπερήχους Doppler [213] τη 18^η εβδομάδα κύησης και να επαναλαμβάνεται ανά διαστήματα 2-4 εβδομάδων.

3. ΚΡΙΣΙΜΟΙ ΤΙΤΛΟΙ

Ι. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ RHESUS

Το επίπεδο αντισωμάτων που είναι πιθανό να εξελιχθεί σε σοβαρή αναιμία ονομάζεται «κρίσιμος τίτλος» και σε μερικά κέντρα ο κρίσιμος τίτλος κυμαίνεται μεταξύ 8 και 32 [235] τίτλοι που αντιπροσωπεύουν τις περισσότερες περιπτώσεις με ασθενή και ήπια μορφή HDFN [51] ενώ σε κάποια άλλα θεωρούν ότι η ισχύς του αντισώματος που έχει φθάσει σε επίπεδο που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική εμβρυική αναιμία είναι 16-32 [229].

Σε πολλά κέντρα ο κρίσιμος τίτλος για το αντι-D θεωρείται το 16 [69,237]. Αναφέρεται ότι ο τίτλος κάτω του 16 σπανίως συνοδεύεται με νεκρό έμβρυο [151].

Για το αντι-D αντίσωμα, εάν η τιτλοποίηση πραγματοποιείται με ΙΑΤ σε φυσιολογικό ορό, με την κλασική μέθοδο σωληναρίου, χρησιμοποιώντας αντι-IgG, ο κρίσιμος τίτλος είναι 32 [53,96].

Γενικά ένας τίτλος με τιμή 16-32 και διαφορά >2 αραιώσεις θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην πρόκληση HDFN [167].

Οι τίτλοι συνήθως εκτελούνται κάθε μήνα έως την 28^η εβδομάδα κύησης, ενώ μετά θα πρέπει να επαναλαμβάνονται κάθε 2 εβδομάδες μέχρι τη γέννηση. Εάν παραμείνουν κάτω από τον κρίσιμο τίτλο, δεν χρειάζονται άλλες παρεμβατικές διαδικασίες. Γενικά, οι γυναίκες με τίτλους υψηλότερους από 4 θα πρέπει να θεωρούνται αλλοανοσοποιημένες [228].

Εάν ο αρχικός τίτλος είναι 4 και σταθερός αλλά αυξάνεται την 26^η εβδομάδα κύησης σε 8, η αξιολόγηση με υπερηχογράφημα Doppler για τη μέτρηση της ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή είναι λογική, ωστόσο αν η εγκυμονούσα παρουσιάσει στο πρώτο τρίμηνο ένα τίτλο 8, και παραμένει σταθερός στο 8 καθ' όλη τη διάρκεια του δεύτερου τριμήνου, οι επαναλαμβανόμενες τιτλοποιήσεις είναι κατάλληλος τρόπος παρακολούθησης του εμβρύου.

Όταν ο τίτλος είναι 16 τότε επαναλαμβάνεται η τιτλοποίηση κάθε 2 έως 4 εβδομάδες, αρχίζοντας από τη 18^η εβδομάδα της κύησης. Πολλά κέντρα επιλέγουν να προβούν σε έλεγχο παρακολούθησης του εμβρύου με συμπληρωματικές μεθόδους εάν ο τίτλος αντι-Rh φθάσει την τιμή του τίτλου 16 ή υψηλότερου [228] και ο έλεγχος αυτός ξεκινάει αν

υπάρχει διπλάσια ή μεγαλύτερη αύξηση του τίτλου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ή αν ο τίτλος ισούται ή υπερβαίνει το κρίσιμο επίπεδο [69]. Ένας κρίσιμος τίτλος ορίζεται ως ο τίτλος που συσχετίζεται με σημαντικό κίνδυνο για εμβρυικό ύδρωπα. Συνήθως, οι εγκυμοσύνες στις οποίες οι τίτλοι αντισωμάτων είναι 8 ή χαμηλότεροι μπορούν να αντιμετωπιστούν με διαδοχική παρακολούθηση των μητρικών τίτλων αντισωμάτων [236]. Αντίθετα, εάν ο τίτλος είναι μεγαλύτερος από 16, η εκτίμηση της εμβρυικής νόσου είναι υποχρεωτική με υπερηχογράφημα για την αξιολόγηση της ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας.

Αντι-C+G: Όταν υπάρχουν G αντισώματα (αλλά όχι αντι- D) ο τίτλος με χρήση C+D-ερυθροκυττάρων είναι κατά κανόνα υψηλότερος από ότι ο τίτλος στον οποίο χρησιμοποιήθηκαν C-D+ ερυθροκύτταρα, και αποτελεί προγνωστικό δείκτη για την αντιμετώπισή του [69,237].

Αντι-C: Η HDFN που προκαλείται από αντι-C είναι συνήθως ήπια καθώς το αντιγόνο C δεν είναι ισχυρά ανοσογόνο [167]. Παρόλα αυτά οι Hackney και συν [238] ανέφεραν ότι 8/46 εγκυμοσύνες που έχουν εμπλακεί με αντι-C υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ενδομήτρια μετάγγιση με συχνότητα που κυμαίνονταν μεταξύ 2-8 φορές.

Αντι-c: Σε μελέτη 46 περιπτώσεων διεγνωσμένου αντι-c στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, από τα προσβεβλημένα νεογνά 12 (26%) παρουσίασαν σοβαρή αιμολυτική νόσο του νεογνού. Από αυτά στα 8 χρειάστηκε εμβρυική μετάγγιση και τα υπόλοιπα 4 είχαν επίπεδα αιμοσφαιρίνης μικρότερα από 10g/dL κατά τον τοκετό. Ένας τίτλος 32 ή μεγαλύτερος ή η ένδειξη εμβρυικού ύδρωπα ταυτοποίησε όλα αυτά τα έμβρυα [238]. Ο συνολικός επιπολασμός της μη RhD ανοσοποίησης φαίνεται να κυμαίνεται μεταξύ 0,15% και 1,1% [192]. Το αντι-c απαντάται στο 0.07% των περιπτώσεων [239].

Αντι-Cw: Αν και δεν είναι ασυνήθιστο, το αντι-Cw σπάνια συσχετίζεται με κλινικά σημαντική αιμολυτική νόσο του νεογνού. Στην πλειοψηφία των κυήσεων θεωρείται ότι είναι ένα φυσικό αντίσωμα [59].

Αντι-E: Δεν υπάρχει κοινή συμφωνία για τον κρίσιμο τίτλο αντισώματος σε σχέση με το αντι-E.

Σε μια μελέτη από τους Joy και συν. [240] ένας τίτλος 32 αναγνωρίστηκε ως κρίσιμος τίτλος για αντι-E. Μόνο 11,3% των περιπτώσεων αναφέρθηκαν με αντι-E αλλοανοσοποίηση. Πέντε από τα 32 (15%) έμβρυα είχαν Hb <10 g / dL και ένα έμβρυο παρουσίασε αιμολυτική νόσο λόγω της αντι-E αλλοανοσοποίησης.

Οι Moran και συν. [241] όμως διαπίστωσαν έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των τίτλων αντι-E και τη σοβαρότητα της HDFN. Στη μελέτη τους καταγράφηκαν οι μεγαλύτεροι τίτλοι αντι-E σε 27 από τις 62 εγκυμοσύνες που επηρέασαν νεογνά DAT(+). Οι τίτλοι κυμαίνονταν από 1 έως 256 στις ήπιες περιπτώσεις HDN, από 1 έως 128 στις μέτριες περιπτώσεις HDN, από 1 έως 1600 στις σοβαρές περιπτώσεις HDN και τέλος τίτλο 1 εμφάνισε μία πολύ σοβαρή περίπτωση.

Η αντι-E αλλοανοσοποίηση γενικά συσχετίζεται με ήπια έως μέτρια αιμολυτική νόσο του εμβρύου ή του νεογνού [242].

Εκτός από το αντι-D, το αντι-E είναι το τρίτο σε συχνότητα αντίσωμα μετά το αντι-Kell και αντι-c που προκαλεί HDFN [191].

Αντι-e: Για το αντι-e έχει οριστεί ένας κρίσιμος τίτλος το 32 που προέκυψε με ταυτόχρονη παρακολούθηση του εμβρύου με τιτλοποίηση και ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) για ανάπτυξη HDFN [346].

II. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ RHDIg ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η διεξαγωγή μελετών τιτλοποίησης για διαφοροποίηση της παθητικής από την ενεργητική ανοσοποίηση μετά από προγεννητική ή μετά τον τοκετό θεραπεία RhDIg θα πρέπει να αποθαρρύνονται. Ένας χαμηλός τίτλος δεν αποκλείει την ενεργητική ανοσοποίηση και εάν ο τίτλος είναι υψηλός το βρέφος πιθανότατα θα εκδηλώσει κλινικά σημεία και συμπτώματα της HDFN. Προηγηθείσα χορήγηση αντι-D σφαιρίνης δημιουργεί ήπια (+) έμμεση Coombs (σε χαμηλό τίτλο) που συνήθως καταστέλλεται με τη χρήση επεξεργασμένων ερυθρών. Η χορήγηση RhDIg αντιπροσωπεύει τον χαμηλό τίτλο (4) αντι-D αντισώματος [236].

Στις γυναίκες που έχουν δεχθεί ανοσοπροφύλαξη αντι-D (πχ. στην 28η εβδομάδα), αυτό το παθητικά χορηγούμενο αντι-D (Rhesuman –Rhophylac) ανιχνεύεται στον ορό τους, από 2 [192] έως 6 μήνες [197] (ανάλογα με τη δόση της ανοσοσφαιρίνης) μετά την χορήγησή του με αποτέλεσμα να μπορούν να παρερμηνευτούν τα αποτελέσματα του περιγεννητικού ορολογικού ελέγχου, εάν δεν έχουμε γνώση αυτού του στοιχείου του ιστορικού τους.

Η ενεργητική ανοσοποίηση στο D θα πρέπει να ελέγχεται με τη διεξαγωγή δοκιμασιών ανίχνευσης αντισωμάτων 6 μήνες μετά τον τοκετό ή κατά την αρχική επίσκεψη για την επόμενη εγκυμοσύνη [69].

Πληροφοριακά αναφέρεται η διάκριση ενεργητικού από παθητικό αντι-D: Οι in-vitro ενδείξεις μπορούν να βοηθήσουν στη διάκριση του παθητικά χορηγούμενου RhDIG από το αντι-D που σχηματίστηκε ως αποτέλεσμα ενεργής αλλοανοσοποίησης.

Το αντι-D ως αποτέλεσμα παθητικής ανοσοποίησης είναι εξ ολοκλήρου IgG. Αν το αντι-D προκαλεί συγκόλληση ερυθρών σε φυσιολογικό ορό, ή αν μπορεί να αδρανοποιηθεί πλήρως ή μερικώς με επεξεργασία του ορού με 2-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, αυτό σημαίνει ότι το αντι-D είναι μερικώς τουλάχιστον IgM και συνεπώς αντιπροσωπεύει ενεργή ανοσοποίηση. Το αντι-D ως αποτέλεσμα παθητικής ανοσοποίησης σπάνια εμφανίζει τίτλο πάνω από 4, με χρήση αντισφαιρινικού ορού επομένως ένα αντίσωμα υψηλού τίτλου ή αυξανόμενος τίτλος αντισώματος είναι πιθανόν να υποδεικνύει ενεργή ανοσοποίηση [197]. Μετά τη χορήγηση Rh DIG, το αντι D μπορεί να ανιχνευθεί με την ΙΑΤ για περίπου οκτώ εβδομάδες (για δόση 500IU). Το αντι D που προκύπτει από ενεργή ανοσοποίηση γίνεται ανιχνεύσιμο περίπου τέσσερις εβδομάδες μετά την έκθεση σε D θετικά κύτταρα και κορυφώνεται μετά από έξι-οκτώ εβδομάδες [192]. Ενώ τα επίπεδα αντι-D από παθητική ανοσοποίηση μειώνονται με το χρόνο, τα επίπεδα αντι-D από ενεργητική ανοσοποίηση συνήθως παραμένουν σταθερά ή αυξάνονται εάν υπάρχει νέα διέγερση [149].

III. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΑΛΛΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Οι περιπτώσεις αιμολυτικής νόσου του νεογνού που οφείλονται στα υπόλοιπα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα εκτός Rhesus είναι πολύ πιο σπάνιες και παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία στην κλινική τους εικόνα από υποκλινικές μορφές μέχρι περιπτώσεις πολύ σοβαρής και θανατηφόρας αιμολυτικής νόσου.

Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τους κρίσιμους τίτλους για μη αντισώματα Rh που παρατηρούνται κατά την εγκυμοσύνη, διότι υπάρχει μικρότερο ποσοστό ευαισθητοποίησης. Οι κλινικές στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της αλλοανοσοποίησης του RhD έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικές στην παρακολούθηση της αλλοανοσοποίησης που προκύπτει από αντισώματα διαφορετικά από τα αντι-D όταν δεν υπάρχουν δεδομένα για τη διαχείριση τέτοιων περιπτώσεων [212,243].

Αντι – Kell

Τα αντιγόνα Kell εκφράζονται στα εμβρυικά RBCs ήδη από τη 10η-11η εβδομάδα κύησης. Ως εκ τούτου, η εμβρυική αναιμία μπορεί να εμφανιστεί πριν από την 20η εβδομάδα κύησης [76].

Οι τίτλοι αντισωμάτων και τα αποτελέσματα της ανάλυσης αμνιακού υγρού σε αλλοανοσοποιημένες εγκυμονούσες από αντι-Kell δεν συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της εμβρυικής αναιμίας. Ο Vughan και συν. [244] διαπίστωσαν ότι η IgG αντι Kell αναστέλλει την ανάπτυξη K - θετικών προγονικών κυττάρων in vitro. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η καταστολή της ερυθροποίησης στο επίπεδο των προγονικών κυττάρων επιδεινώνει την εμβρυική αναιμία. Η παρατηρούμενη αναστολή της ερυθροποίησης από αντι- Kell πιθανόν να σχετίζεται με την ενδομυελική αιμόλυση των προδρόμων κυττάρων της ερυθράς σειράς [245,246]. Το αντι-Kell εκτός από τη σοβαρή αναιμία συσχετίζεται, με εμβρυϊκό ύδρωπα και εμβρυϊκό θάνατο και μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αναιμία ανεξάρτητα από τον τίτλο του αντισώματος επειδή έχει την ικανότητα να προκαλεί καταστολή του μυελού των οστών μαζί με την καταστροφή των RBC [177,247].

Η αντιμετώπιση των κυήσεων που αφορούν την αλλοανοσοποίηση από αντι-Kell πρέπει να επικεντρωθεί στον K γονότυπο του εμβρυϊκού DNA όταν ο πατέρας είναι ετερόζυγος για Kell (ή μη διαθέσιμος για τη δοκιμασία) και να παρακολουθηθεί το Kell θετικό έμβρυο για την ανάπτυξη αναιμίας.

Σοβαρή εμβρυϊκή αιμόλυση με αντισώματα αντι-K εμφανίστηκαν στο πλαίσιο χαμηλών τίτλων όπως τίτλος 4.

Σε μια μελέτη που έγινε από τον Mc Kenna [248] αναφέρθηκε ποσοστό 9,3% με αλλοανοσοποίηση από αντι-K, από τα οποία τα 4/8 κατέληξαν σε θάνατο του εμβρύου, ένα από τα οποία πέθανε κατά τη διάρκεια ενδομήτριας μετάγγισης ενώ τα υπόλοιπα νεογνά απεβίωσαν δευτερευόντως από επιπλοκές αλλοανοσοποίησης. Στην ίδια μελέτη, τα 3/8 αναφέρθηκαν με εμβρυϊκό ύδρωπα ένα από αυτά πέθανε την 25η εβδομάδα κύησης, 1/8 γεννήθηκε με αιμοσφαιρίνη 11 g / dl και έγινε απλή μετάγγιση την πρώτη ημέρα της γέννησης. Στους τίτλους αντι-Kell ανοσοποίησης οι τίτλοι αντισώματος δεν συσχετίζονται απαραίτητα με εμβρυϊκή αναιμία [177].

Το αντι-Jsb ανήκει στο αντιγονικό σύστημα Kell και όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία αυτά τα αντισώματα έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν την ερυθροποίηση των προγονικών κυττάρων και να προκαλούν καταστροφή των RBC.

Όπου εντοπίζονται αντισώματα έναντι άλλων αντιγόνων που ανήκουν στο σύστημα Kell (π.χ. αντι-k, -Kra, -Krb, -Jsa, -Jsb) πρέπει να παρακολουθούνται με τον ίδιο τρόπο όπως το αντι-K καθώς και αυτά έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν HDFN [149,249]. Αναφέρεται περίπτωση εμβρύου την 21^η εβδομάδα κύησης που παρουσίασε σημεία εμβρυικής αναιμίας λόγω αντι-Jsb. Ο τίτλος ήταν 128, και έγινε ενδομήτρια μετάγγιση [249].

Αντι-Fy(a-b)

Από τους Goodrick και συν. [250] αξιολογήθηκαν 68 περιπτώσεις αλλοανοσοποιημένων γυναικών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στις οποίες ανιχνεύθηκε αντι-Fya και ο τίτλος συσχετιζόταν με τα κλινικά ευρήματα. Προτάθηκε ο τίτλος 64 ως το κρίσιμο επίπεδο στο οποίο η αξιολόγηση για HDFN πρέπει να διεξαχθεί μη ορολογικά.

Το αντίσωμα αντι-Fyb δεν σχετίζεται με HDFN, ενώ το αντι-Fya μπορεί να καταλήξει σε σοβαρή HDFN. Στη μελέτη του Moise [251] το 18% των 19 εγκυμοσύνων που περιπλέκονται με αλλοανοσοποίηση με αντι-Fya έληξε σε εμβρυικό θάνατο και τα δύο τρίτα των περιπτώσεων απαιτούσαν αφαιμαξομετάγγιση [177].

Αντι-Jk(a-b)

Αν και το αντι-Jkb είναι μια σοβαρή αιτία οξείας ή επιβραδυνόμενης αιμολυτικής αντίδρασης μετά μετάγγιση σπάνια συνδέεται με σοβαρή αιμολυτική νόσο του νεογνού ακόμη και σε παρουσία υψηλού τίτλου αντισώματος (από όσο γνωρίζουμε καταγεγραμμένες 13 περιπτώσεις) [252].

Ενώ η σχετιζόμενη με αντι-Jk(b) αιμολυτική νόσος του νεογνού είναι σχετικά κοινή η HDFN λόγω του αντι-Jk(a) είναι πολύ σπάνια, ενώ ο μέχρι τώρα γνωστός συνολικός αριθμός περιπτώσεων με πλήρη εργαστηριακά ευρήματα είναι μόλις 3. Επιπλέον οι αναφορές περιπτώσεων που συνέβησαν στην Ασία, είναι ακόμη πιο σπάνιες λόγω χαμηλής αλληλόμορφης συχνότητας Jk(a) [253]. Έχει αναφερθεί όμως και περίπτωση (1) που με τίτλο 32 υπήρξε αυξημένη ταχύτητα ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας στο έμβρυο και απαιτήθηκαν 4 ενδομήτριες μεταγγίσεις [243].

Αντι-M

Το αντίσωμα M, το οποίο μπορεί να είναι κατηγορίας IgG, προκαλεί σπάνια HDFN [96,195]. Περισσότερο αντιδρά με άμεση δοκιμασία συγκόλλησης υποδηλώνοντας ότι είναι IgM.

Ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις είναι IgG, και μπορεί να αντιδράσουν με άμεση δοκιμασία συγκόλλησης λόγω του μεγάλου αριθμού των αντιγονικών θέσεων M στα ερυθροκύτταρα, και συχνά ανιχνεύονται στη φάση του αντισφαιρινικού ορού [69].

Συνεπώς προτείνεται η ακόλουθη προσέγγιση για την αξιολόγηση για HDFN:

A) Εκτελείται δοκιμασία έμμεσης coombs. Αν η δοκιμασία είναι αρνητική, δεν ενδείκνυται παρακολούθηση με μελέτες τιτλοποίησης κατά τη διάρκεια της κύησης.

B) Εάν το αντι-M δρα στην διαδικασία της έμμεσης coombs ενδείκνυται παρακολούθηση με μελέτες τιτλοποίησης.

Εάν ο αρχικός τίτλος είναι ≥ 16 , η παρουσία και ο τίτλος των IgG αντι-M πρέπει να προσδιοριστεί μετά από περαιτέρω επεξεργασία του ορού με μερκαπτοαιθανόλη [254].

Παρακολούθηση με μη ορολογικές τεχνικές συνίσταται όταν ο τίτλος των IgG αντι-M είναι ≥ 16 [69].

Στους Καυκάσιους δεν αναφέρεται σοβαρή αιμολυτική νόσος του νεογνού από αντι-M. Σε μελέτη 15ετίας από τους Stetson και συν. [255] βρέθηκε ότι από τις 195 γυναίκες που κατά τη διάρκεια της κύησης ανιχνεύτηκε αντι-M οι 193 είχαν τίτλους ίσους ή κατώτερους του 4. Σε μία μόνο περίπτωση έγκυος με αρχικά χαμηλό τίτλο παρουσίασε αύξηση του τίτλου που έφτασε το 64. Τα 95 (73,6%) από τα 129 νεογνά που εξετάστηκαν βρέθηκαν θετικά στο αντιγόνο M, και 9 βρέφη χρειάστηκαν φωτοθεραπεία. Δεν υπήρξαν περιπτώσεις αιμολυτικής νόσου του εμβρύου ή του νεογνού ήπιες ή σοβαρές. Εν τούτοις στην Ιαπωνία έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις HDFN εξαιτίας του αντι-M. Σε 21 από 34 περιπτώσεις που καταγράφηκαν τα τελευταία χρόνια εκδηλώθηκε σοβαρή αιμολυτική νόσος. Ο μέσος όρος του μητρικού αντισώματος μετά την εγκυμοσύνη ήταν το 64 [256].

Επίσης από τους Crispin και συν. [257] αναφέρεται περίπτωση όπου δύο αδελφές παρουσίασαν αιμόλυση κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο εβδομάδων της ζωής τους λόγω μητρικού αντι-M, που είχε ως αποτέλεσμα σοβαρή αναιμία, και κρίθηκε αναγκαία η μετάγγιση αίματος. Η συγκόλληση των ερυθρών παρατηρήθηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος και των δύο νεογνών σε θερμοκρασία δωματίου. Το μητρικό αντι-M αντίσωμα που ανιχνεύτηκε ήταν χαμηλού τίτλου (16) και κατέδειξε μικρό θερμικό εύρος αντιδρώντας σε φυσιολογικό ορό στους 4°C αλλά δεν ανιχνεύτηκε στους 37°C . Το συμπέρασμά τους ήταν ότι το αντι-M μπορεί να προκαλέσει αιμολυτική νόσο του νεογνού με εργαστηριακά ευρήματα που μοιάζουν με τη νόσο των ψυχροσυγκολλητινών.

Αντι -s

Σύμφωνα με μια μελέτη που πραγματοποίησε ο Moise [251] στην περιοχή της Οξφόρδης στην Αγγλία, περίπου 22 / 175.000 κρούσματα αναφέρθηκαν με αντι-s και μόνο μία περίπτωση χρειάστηκε αφαιμαξομετάγγιση ενώ οι υπόλοιπες 21 / 175.000 περιπτώσεις εμφάνισαν ήπια αιμολυτική νόσο του νεογνού.

Αντι -U

Το αντι-U είναι ένα σπάνιο αλλοαντίσωμα που απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στη μαύρη φυλή. Αν και έχει οριστεί ένας κρίσιμος τίτλος για τα περισσότερα αντισώματα το 16, για το συγκεκριμένο αντίσωμα μελετώντας περίπτωση εγκύου με αντι-U κρίθηκε το 32. [258] Το νεογνό αντιμετωπίστηκε με 48ωρη φωτοθεραπεία εξαιτίας ήπιας αιμολυτικής νόσου. Σε άλλη μελέτη ο Smith και συν. [259] συνέστησαν ότι ο τίτλος αντι-U ≥ 128 την 17^η εβδομάδα κύησης είναι ένδειξη για την αξιολόγηση της κατάστασης του εμβρύου.

Αντι -Wright

Υπάρχουν αναφορές σοβαρών περιπτώσεων έως και θανατηφόρων αιμολυτικής νόσου του νεογνού από αντίσωμα αντι- Wra (αντιγόνο χαμηλής συχνότητας που ανήκει στο σύστημα Diego) χωρίς να υπάρχουν πληροφορίες για κρίσιμους τίτλους [260].

4. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΝΕΟΥ ΘΕΤΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ

Εάν πρόκειται να γίνει τιτλοποίηση αντισωμάτων σε προγεννητικό έλεγχο, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες επικύρωσης του προηγούμενου τίτλου πριν από την εφαρμογή του νέου για να καθοριστεί ένας νέος κρίσιμος τίτλος.

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης το προηγούμενο δείγμα στο οποίο έγινε τιτλοποίηση θα πρέπει να καταψύχεται και να επανεξετάζεται παράλληλα με το επόμενο δείγμα για να εξασφαλιστεί ότι η αλλαγή του τίτλου δεν οφείλεται σε διαφορές στις τεχνικές [192,211,212].

Η τιτλοποίηση των αντισωμάτων επαναλαμβάνεται σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν ήδη αναφερθεί, με την προϋπόθεση ότι τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για να υποδηλώσουν την ανάγκη εμβρυικής παρακολούθησης με μη ορολογικές τεχνικές.

5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ορισμένοι ερευνητές δεν συμφωνούν με τη χρήση ενός «κρίσιμου τίτλου». Πιθανόν να υπάρχει η λανθασμένη εντύπωση ότι οι τιτλοποιήσεις εκτελούνται για να προβλεφθεί η σοβαρότητα της HDFN. Οι τιτλοποιήσεις πραγματοποιούνται για να προσδιοριστεί πότε πρέπει να παρακολουθείται η εγκυμοσύνη για HDFN με επεμβατικά μέσα [261].

Μερικοί ευρωπαίοι ερευνητές πρότειναν ότι θα πρέπει να εκτελούνται λειτουργικές δοκιμασίες που μετρούν τη φαγοκυττάρωση ή την κυτταροτοξική λύση. Τέτοιες δοκιμασίες περιλαμβάνουν τη δοκιμασία μονοστοιβάδας μονοκυττάρων (monocyte monolayer assay - MMA), τη δοκιμασία χημειοφωταύγειας (chemiluminescence test - CLT) και τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) που εξαρτάται από αντισώματα [262].

Η CLT φαίνεται να είναι ένας καλύτερος προγνωστικός παράγοντας για τον παράγοντα Rh στην HDFN από τη MMA [263]. Ωστόσο, δεν είναι χρήσιμη στην πρόβλεψη της HDFN που προκαλείται από αντισώματα εκτός Rh [264]. Περαιτέρω, τα αποτελέσματα της CLT περιορίζουν μόνο μετρίως τον αριθμό των επεμβατικών διαδικασιών που απαιτούνται [265,266].

Αντίθετα, οι Oerkes και συν. [267] βρήκαν την ανάλυση ADCC σαν ένα καλύτερο δείκτη από τον τίτλο αντισώματος για την ανάγκη παρακολούθησης για HDFN με επεμβατικές διαδικασίες. Οι λειτουργικές δοκιμασίες δεν έχουν υιοθετηθεί ευρέως στη Βόρεια Αμερική κυρίως επειδή οι προγεννητικές δοκιμές στις Ηνωμένες Πολιτείες δεν είναι συγκεντρωτικές, όπως συμβαίνει στην Ευρώπη. Οι λειτουργικοί προσδιορισμοί είναι πιο πολύπλοκοι και επομένως τεχνικά δύσκολο να εκτελεστούν από ότι οι τιτλοποιήσεις.

Δοκιμασίες όπως η φασματοφωτομετρική ανάλυση του αμνιακού υγρού αντικαταστάθηκε από τη μέτρηση της αιματικής ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας του εμβρύου με τη χρήση υπερήχων Doppler (middle cerebral arteria-peak systolic velocity, MCA-PSV) για την παρακολούθηση για HDFN [213].

Σε ανάλυση αμνιακού υγρού, η ανώτατη τιμή που προσδίδεται στη χολερυθρίνη παρίσταται γραφικώς έναντι της ηλικίας κύησης και χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της αναιμίας του εμβρύου [268].

Η αμνιοπαρακέντηση είναι μια επεμβατική διαδικασία και μπορεί να οδηγήσει στην εισαγωγή εμβρυικών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία, επιτείνοντας την

αλλοανοσοποίηση και γι'αυτό δεν ενδείκνυται. Σε τέτοιες περιπτώσεις αυτό που αρχικά ήταν ασήμαντο χαμηλού τίτλου αντι- D μπορεί να διεγερθεί και να γίνει ένα αντίσωμα υψηλού τίτλου που να προκαλέσει σοβαρή HDFN. Αν κριθεί απαραίτητη η παρακολούθηση της HDFN με πρόσθετες μεθόδους, δεν απαιτούνται περαιτέρω τιτλοποιήσεις.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΟ ΝΕΟΓΝΟ

Ο εργαστηριακός έλεγχος στα νεογνά γίνεται για τη διάγνωση του νεογνικού ίκτερου και για να προσδιοριστεί αν στις RhD(-) μητέρες θα χορηγηθεί RhDIG. Εκτός από αυτές τις δύο ενδείξεις, δεν απαιτούνται περεταίρω δοκιμασίες, εκτός εάν η μητέρα δεν έχει ελεγχθεί για ABO, RhD και μη αναμενόμενα αντισώματα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ή υπάρχουν κλινικά σημεία και συμπτώματα αιμόλυσης. (Αυτή η θέση είναι σύμφωνη με τις κατευθυντήριες οδηγίες πρακτικής για τη διαχείριση του νεογνικού ίκτερου που δημοσιεύθηκε από την Αμερικάνικη Ακαδημία Παιδιατρικής) [269].

Γίνεται έλεγχος για τα αντιγόνα A/B/D. Εάν γίνει έλεγχος για αντισώματα στον ορό/πλάσμα για αντι-A/B αντισώματα αυτά θα είναι μητρικής προέλευσης. Σε αυτή την περίπτωση εάν διενεργηθεί DAT θα πρέπει να γίνει με αντιδραστήριο IgG.

Τα νεογνά που γεννιούνται από μητέρες RhD(-) πρέπει να εξεταστούν για RhD συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας για D weak. Εάν το βρέφος χαρακτηριστεί ως D weak, η μητέρα είναι υποψήφια για RhDIG [270].

Η εκτέλεση της δοκιμασίας για D weak μπορεί να αποβεί προβληματική όταν η DAT είναι θετική λόγω ασυμβατότητας ABO μεταξύ βρέφους και μητέρας [271]. Η δοκιμασία για D weak μπορεί να επαναληφθεί αφού τα ερυθρά καταστούν αρνητικά στην εξέταση DAT μετά από επεξεργασία με τη χρήση διαλύματος EDTA / γλυκίνης / οξέος [272].

Μέσω των εξετάσεων ABO, RhD και coombs (Direct antiglobulin test-DAT) στο νεογνό μετά τον τοκετό επιβεβαιώνεται η παρουσία των αντισωμάτων που συνδέονται με τα ερυθρά αιμοσφαίριά του [273]. Η αιμολυτική νόσος του νεογνού από ασυμβατότητα RhD ή ABO είναι ένας από τους συνηθισμένους λόγους που γίνεται DAT στα νεογνά [274]. Αυτή η δοκιμασία εκτελείται από αίμα ομφάλιου λώρου [275].

Με την παρουσία εργαστηριακών ενδείξεων (DAT+) ή κλινικών ενδείξεων (ίκτερος) νεογνικής αιμόλυσης όταν η μητέρα είναι ομάδα O προτείνεται να γίνει έλεγχος ABO/RhD σε ερυθρά ομφάλιου λώρου. Τα αντι-A και/ή αντι-B IgG ανιχνεύονται στο μητρικό ορό και τιτλοποιούνται. Σε περίπτωση θετικής DAT η IgG (αντι-A και/ή αντι-B) εκλούεται από τα ερυθροκύτταρα του νεογνού. Η καλύτερη τεχνική για την έκλουση αντι-A και αντι-B IgG είναι η μέθοδος της ψυχρής έκλουσης [96] (ταχεία κατάψυξη-απόψυξη) που πραγματοποιήθηκε από τον Lui και περιγράφεται από τους Feng και συν. [276]. Η αναζήτηση και η τιτλοποίηση των αντι-A και/ή αντι-B IgG αντισωμάτων πρέπει να

διεξάγεται με ΙΑΤ μετά από διάσπαση των αντι-A και / ή αντι-B που υπάρχουν στον μητρικό ορό με αναγωγικές ουσίες όπως 2-μερκαπτοαιθανόλη (2-ME) ή διθειοθρεϊτόλη (DTT), ή χρησιμοποιώντας άλλες εμπορικά διαθέσιμες ουσίες εξουδετέρωσης [96].

Η παρουσία ενός θετικού αποτελέσματος δεν οδηγεί αναγκαστικά σε υπερχολερυθριναιμία στο βρέφος. Η περίπτωση να χρειαστεί φωτοθεραπεία είναι σίγουρα μεγαλύτερη, αλλά υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα χολερυθρίνης και η αξιολόγηση όλων αυτών των στοιχείων είναι κρίσιμη για τη λήψη κατάλληλης απόφασης σχετικά με τη θεραπεία. Στην αιμολυτική νόσο από RhD, η DAT μπορεί να είναι έντονα θετική χωρίς κλινικά συμπτώματα της νόσου, ενώ στην αιμολυτική νόσο λόγω ABO, κλινικά συμπτώματα μπορεί να υπάρχουν με μία ασθενή/αρνητική DAT [192,277].

Η προβλεπτική τιμή μιας θετικής DAT είναι 9% όταν η ABO HDFN ορίζεται από την ανάγκη για μετάγγιση, 13% όταν ορίζεται από την ανάγκη για φωτοθεραπεία και 26% όταν ορίζεται από χολερυθρίνη μεγαλύτερη από 10mg / dl τις πρώτες 3 έως 4 ημέρες ζωής. Ο έλεγχος ABO / RhD και DAT σε βρέφη που γεννιούνται από μητέρες ομάδας O γίνεται για να προσδιοριστούν τα βρέφη που κινδυνεύουν από την ABO HDFN και να παρακολουθούνται επιλεκτικά για ενδείξεις πυρετού. Ωστόσο, η ABO HDFN δεν περιορίζεται στα νεογνά των γυναικών της ομάδας O, αν και είναι πιο συνηθισμένο σε αυτά. Σπάνιες περιπτώσεις ασυμβατότητας ABO έχουν αναφερθεί σε μητέρες ομάδας A2 με υψηλό τίτλο B [192,278].

1. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΑΛΛΟΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ

Έλεγχος ABO/RhD και DAT θα πρέπει να γίνεται σε όλα τα νεογνά που οι μητέρες τους έχουν αναπτύξει δυνητικά σημαντικά μη αναμενόμενα αντισώματα.

Μια θετική άμεση Coombs δεν αποτελεί από μόνη της διάγνωση για την HDFN [149].

Έλεγχος για να αποδειχτεί ότι τα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα φέρουν το αντιγόνο κατά του οποίου η μητέρα έχει αναπτύξει αντισώματα, δεν είναι απαραίτητος όταν η DAT είναι θετική διότι μπορεί να οδηγηθούμε σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Προκειμένου να αποδειχθεί σαφώς ότι η θετική DAT προκλήθηκε από το αντίσωμα της μητέρας, τα αντισώματα που προσκολλήθηκαν στα ερυθρά του νεογνού μπορούν να εκλουθούν και να επιβεβαιωθούν δευτερευόντως από τα πάνελ ταυτοποίησης αντισωμάτων [96,149].

Η δοκιμασία έκλουσης αντισωμάτων δεν ενδείκνυται όταν έχουν πραγματοποιηθεί επιβεβαιωτικές μελέτες προσδιορισμού αντισωμάτων στον μητρικό ορό κατά τη διάρκεια της εισαγωγής για τον τοκετό αλλά μπορεί να γίνει για εκπαιδευτικούς λόγους. Όταν ένα δείγμα μητέρας δεν είναι διαθέσιμο για έλεγχο συμβατότητας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το δείγμα του νεογνού.

Παρουσία αντι-D στο νεογνό: Όταν η μητέρα λαμβάνει RhD_{IG} κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το βρέφος μπορεί να γεννηθεί με θετική DAT, αλλά χωρίς σημεία αιμόλυσης [197]. Στα βρέφη που έχουν αποκτήσει με παθητική αλλοανοσοποίηση αντι-D ο τίτλος του αντισώματος μειώνεται σε 2-3 εβδομάδες. Λόγω της ανάπτυξης του νεογνού ο τίτλος μειώνεται ταχύτερα απ' ό,τι αναμενόταν. Όταν ο τίτλος κατά τη γέννηση είναι 128 το αντίσωμα θα είναι ακόμη ανιχνεύσιμο μετά από 100 ημέρες. Στα RhD(+) ευαισθητοποιημένα νεογνά που δεν έχουν κάνει αφαιμαξομετάγγιση η DAT μπορεί να παραμείνει θετική για τουλάχιστον τρεις μήνες [183].

Το φαινόμενο ότι τα νεογνά με HDFN μπορεί να έχουν παρατεταμένη αναιμία για αρκετές εβδομάδες μετά τον τοκετό μπορεί να αποδοθεί στη συνεχή αιμόλυση λόγω μητρικών αντισωμάτων και καταστολής της ερυθροποίησης. Μια πιθανή εξήγηση για την ανάπτυξη της αναιμίας μετά τη γέννηση, παρά την χορήγηση RhD_{IG}, μπορεί να σχετίζεται με τη μείωση της συγκέντρωσής της και συνεπώς την αποτελεσματικότητά της. Το ερώτημα που παραμένει να απαντηθεί είναι εάν ο χρόνος ημίσειας ζωής της RhD_{IG} είναι μικρότερος από εκείνον του μητρικού αλλοαντισώματος στα νεογνά. Αν συμβαίνει αυτό, αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τον κορεσμό του υποδοχέα FcRn, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ανακύκλωση αντισωμάτων από ενδοθηλιακά ή μυελοειδή κύτταρα, μειώνοντας έτσι τον καταβολισμό IgG. Ωστόσο, παραμένει η υπόθεση εάν η ανταγωνιστική δέσμευση εξωγενούς IVIG και ανοσοποιητικών μητρικών αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ημίσεια ζωή των προηγούμενων αντισωμάτων.

Τελικά, τα αλλοαντισώματα είναι, τουλάχιστον εν μέρει, προσκολλημένα σε εμβρυικά ερυθρά αιμοσφαίρια και μπορεί ο μηχανισμός κάθαρσής τους να αφορά έναν εναλλακτικό μηχανισμό από αυτόν των ελεύθερων αντισωμάτων της IVIG [76].

2. ΙΚΤΕΡΙΚΟ ΝΕΟΓΝΟ/ΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΑ ΜΗΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Πολύ συχνά, παρά την ασυμβατότητα ABO και την παρουσία IgG αντι-A και / ή αντι-B στον ορό της μητέρας, η DAT του νεογνού είναι αρνητική ή ασαφής [189,277].

Μία αρνητική DAT δεν αποκλείει την ABO HDN και τα αποτελέσματα των δοκιμασιών για την ανίχνευση IgG αντι-A / B προερχόμενα από μητρικά αντισώματα στον ορό του βρέφους επηρεάζουν σημαντικά την κλινική διαχείρισή του [69].

Σε έλλειψη εμβρυομητρικής ασυμβατότητας ABO αλλά με κλινικές ενδείξεις HDFN, θα πρέπει να υπάρχει υπόνοια για ένα αντίσωμα στον μητρικό ορό έναντι αντιγόνου χαμηλής συχνότητας (πατρικής προέλευσης). Η DAT του νεογνού συνήθως είναι έντονα θετική. Θα πρέπει να διενεργείται έμμεση coombs (IAT) με τη χρήση μητρικού ορού και πατρικών ερυθρών αιμοσφαιρίων. Όταν υπάρχει ασυμβατότητα ABO μεταξύ αυτών των δειγμάτων, ένα έκλουμα από τα ερυθροκύτταρα του νεογνού μπορεί να ελεγχθεί έναντι των πατρικών ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Όταν ένα νεογνό έχει θετική DAT σε απουσία ασυμβατότητας ομάδας ή των ευρέως ανιχνευόμενων αντισωμάτων, θα πρέπει να υπάρξει η υποψία παρουσίας αντισώματος σε αντιγόνο χαμηλής συχνότητας [279]. Αναφέρεται περίπτωση νεογνού 3 εβδομάδων που παρουσίασε αναιμία εξαιτίας του αντισώματος Diego(a). Ο προσδιορισμός της ειδικότητας του αντισώματος έγινε από τον ορό της μητέρας και από τα ερυθρά του νεογνού (μετά από έκλουση). Σε προσδιορισμό του αντιγόνου ο πατέρας και το νεογνό βρέθηκε ότι ήταν Dia(+) και η μητέρα Dia(-) στο αντιγόνο Di(a) το οποίο είναι χαμηλής συχνότητας [280].

Αντιστρόφως σε μερικές περιπτώσεις οι άμεσες coombs μπορεί να είναι αρνητικές, αλλά να υπάρχει ενεργή αιμόλυση και μπορεί να προκληθεί σοβαρή, ακόμη και θανατηφόρα HDFN. Οι παθολογικές καταστάσεις (κληρονομική σφαιροκυττάρρωση, έλλειψη G6PD κ.λπ.) μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε σοβαρή υπερχολερυθριναιμία, αλλά επειδή η διαδικασία αυτή δεν περιλαμβάνει αντισώματα, η διαδικασία Coombs θα είναι αρνητική. Όλα τα νεογνά θα πρέπει να παρακολουθούνται για ίκτερο κατά την πρώτη εβδομάδα ζωής [281].

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΤΟΚΕΤΟ

Η εξέταση της μητέρας κατά τον τοκετό μπορεί να βοηθήσει στη διερεύνηση του νεογνικού ίκτερου για την επιλογή του προς μετάγγιση αίματος αν ζητηθεί, και για τον προσδιορισμό του αριθμού των δόσεων της RhDIG ανοσοσφαιρίνης για χορήγηση στις Rh(-) μητέρες που έχουν τεκνοποιήσει Rh(+) βρέφη.

Σε γνωστές περιπτώσεις αλλοανοσοποίησης, είναι σκόπιμο να επιβεβαιωθούν τα προηγούμενα ταυτοποιημένα αντισώματα και να εξεταστεί η περίπτωση της παρουσίας επιπλέον δυνητικά σημαντικών αντισωμάτων. Η τιτλοποίηση αντισώματος κατά τον τοκετό δεν εξυπηρετεί κανένα χρήσιμο κλινικό σκοπό. Σε γυναίκες στις οποίες χορηγήθηκε RhDIG κατά την κύηση μπορούν να γίνουν δοκιμασίες με επιλεγμένα Rh(-) ερυθροκύτταρα για την ανίχνευση αντισωμάτων εκτός των αντι-D [282].

Εάν το βρέφος χαρακτηριστεί D (weak), η μητέρα είναι υποψήφια για RhDIG. Σε αυτό τον έλεγχο, δεν είναι σωστό να χρησιμοποιηθεί rosette test [283] (έλεγχος για την παρουσία εμβρυικών ερυθροκυττάρων στο μητρικό αίμα) ή οποιαδήποτε άλλη μέθοδος που βασίζεται σε αντι-D για να εκτιμηθεί η τιμή FMH (ο αριθμός των θέσεων D στα ερυθροκύτταρα του εμβρύου θα είναι χαμηλός, προκαλώντας ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα). Αντίθετα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι που ανιχνεύουν την αιμοσφαιρίνη F στα ερυθροκύτταρα του εμβρύου [284].

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΤΙ-D ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η πρόληψη της αλλοανοσοποίησης της μητέρας αφορά την μεταγγισιοθεραπευτική πρακτική σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και την Rh D ανοσοπροφύλαξη στην κύηση. Η RhDIG ανοσοσφαιρίνη χορηγείται σε έγκυες γυναίκες RhD(-) που δεν έχουν προηγουμένως αναπτύξει αντι-D αντίσωμα. Παρέχεται η πρόληψη της αλλοανοσοποίησης στο D μετά από οποιοδήποτε γεγονός που θα μπορούσε να επιτρέψει στα ερυθρά αιμοσφαίρια του νεογνού να εισέλθουν στη μητρική κυκλοφορία.

Η αντι-D σφαιρίνη (Rh immune globulin - RhDIG) είναι συμπυκνωμένο διάλυμα IgG αντι-D(Rh1) που προέρχεται από ανθρώπινο πλάσμα. Ο πραγματικός τρόπος δράσης της IVIG σε σχέση με την HDFN, είναι ασαφής. Μπορεί να εμπλέκονται οι ακόλουθοι μηχανισμοί: i) καθοδική ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης της μητέρας, π.χ. με την αύξηση της

λειτουργίας των κατασταλτικών κυττάρων T, με αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης μητρικών αντισωμάτων [76], ii) μείωση της μεταφοράς αντισώματος στον πλακούντα με ανταγωνιστικό αποκλεισμό των υποδοχέων Fc, iii) ανταγωνιστική παρεμπόδιση των υποδοχέων Fc στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, μειώνοντας έτσι τη φαγοκυττάρωση εμβρυϊκών RBCs επικαλυμμένων με αντίσωμα [285-288] και iv) η IVIG μπορεί να δεσμεύεται με μητρικά αντισώματα ή να ενισχύει την αποσύνδεσή τους από τα αντιγονικά συστατικά [289].

Το γεγονός ότι η ασυμβατότητα ABO μητέρας και παιδιού και η χορήγηση RhDIG, μειώνουν τον κίνδυνο όχι μόνο για το D, αλλά και για τις ανοσοποιήσεις εκτός Rh, αντισωμάτων δηλώνει ότι η ανοσοκαταστολή με τη μεσολάβηση αντισωμάτων σε αυτή την κατάσταση δεν είναι ειδική για το αντιγόνο [209].

Ανοσοπροφύλαξη μετά από συμβάντα που μπορεί να προκαλέσουν ανοσοποίηση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης

Χορηγείται ανοσοπροφύλαξη με αντι-D σφαιρίνη σε κάθε επεμβατική προγεννητική διάγνωση (λήψη τροφοβλάστη, λήψη ομφαλικού αίματος), ενδομήτρια μετάγγιση, άμεσο, έμμεσο, ανοικτό ή κλειστό κοιλιακό τραύμα, πτώση, προγεννητική αιμορραγία, ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου, θεραπευτικός τερματισμός της εγκυμοσύνης με χειρουργικές και / ή ιατρικές τεχνικές, πλήρης ή ατελής αυτόματη έκτρωση ανεξάρτητα από την ηλικία κύησης του εμβρύου, έκτοπη κύηση, και επιλεγμένη διακοπή κύησης [177,290].

Η RhDIG διατίθεται σε μειωμένη δόση, περίπου 50 μg, (250 IU) η οποία προστατεύει την έγκυο σε FMH έως και 2,5 mL D(+) εμβρυϊκών ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτή η δόση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις παραπάνω περιπτώσεις μέχρι τη 12^η εβδομάδα και χορηγείται όταν ο συνολικός όγκος αίματος του εμβρύου ικανού να ευαισθητοποιήσει τη μητέρα είναι μικρότερος από 2,5 mL [197].

Η ίδια δόση των 50 μg χορηγείται επίσης σε περίπτωση μετάγγισης RhD(+) αιμοπεταλίων σε D(-) γυναίκα αναπαραγωγικής ηλικίας η οποία την καλύπτει για 6 εβδομάδες [290].

Συστηματική προγεννητική ανοσοπροφύλαξη

Η δόση της IVIG που χρησιμοποιείται ποικίλλει σε διαφορετικές μελέτες [291]. Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού τοκετού καθώς και κατά την καισαρική τομή, στην μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων εμφανίζεται FMH μικρότερη των 5 ml (10 ml ολικού

αίματος) και επομένως για την πρόληψη της αλλοανοσοποίησης, επαρκεί μια δόση IgG αντι-D των 100 µg [292,293]. Εξαιτίας των φόβων ότι δεν θα υπολογίζεται σωστά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η FMH με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της κατάστασης συνήθως χορηγείται πλήρης δόση (300mg) RhDIG [197].

Χορήγηση 300 µg αντι-D την 28^η εβδομάδα της κύησης χορηγείται σε χώρες όπου 300 µg είναι η τυποποιημένη δόση που πρέπει να χορηγηθεί μετά τον τοκετό. Από την άλλη πλευρά, σε χώρες όπου η τυπική δόση μετά τον τοκετό είναι 100 µg, δίνονται δύο δόσεις των 100 µg κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, την 28η εβδομάδα και την 34η εβδομάδα αντίστοιχα [183].

Σε μελέτη που έγινε σε RhD(-) γυναίκες που γέννησαν RhD(+) έμβρυα και έλαβαν ανοσοπροφύλαξη την 28η εβδομάδα (είτε 300 µg i.m. είτε 240-300 µg i.v.), λιγότερο από το 0.1% ανέπτυξαν αντι-D. Σε μια άλλη μελέτη σε RhD(-) γυναίκες που κυοφόρησαν RhD(+) έμβρυα και τους είχε χορηγηθεί 100 µg αντι-D την 28η και 34η εβδομάδα, το 0.16% ανέπτυξε αντι-D μετά τον τοκετό [183]. Ο χρόνος ημίσειας ζωής μιας δόσης RhDIG, ελλείψει σημαντικής FMH, είναι περίπου 21 ημέρες. Κάποιοι θεράποντες θα διαχειριστούν μία άλλη δόση RhDIG εάν ο τοκετός καθυστερήσει πέραν των 40 εβδομάδων κύησης [197].

Ανοσοπροφύλαξη μετά τον τοκετό

Όλες οι μη-ανοσοποιημένες RhD αρνητικές γυναίκες που έχουν γεννήσει θετικό ή D weak νεογνό πρέπει να λάβουν δόση αντι-D Ig εντός 72 ωρών από τον τοκετό [200,294]. Εάν δεν υπάρξει ανοσοπροφύλαξη εντός 72 ωρών, μπορεί να γίνει μέχρι και 10 ημέρες μετά τον τοκετό [96,295]. Σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, RhDIG μπορεί να γίνει ακόμα και με καθυστέρηση έως και 28 ημερών μετά από συμβάν ευαισθητοποίησης [296].

Η RhDIG που χορηγείται σε κύηση 28 εβδομάδων σε όλες τις μη ευαισθητοποιημένες RhD(-) γυναίκες και εντός 72 ωρών από τη γέννηση μειώνει περαιτέρω τον ρυθμό ανοσοποίησης στο αντι-D σε ποσοστό 0,1% [294].

Σκευάσματα RhIG και οδός χορήγησης

Το 1 ml RhDIG περιέχει 300µg (1500 IU) και αποτελεί επαρκή δόση για να εξουδετερώσει 15 ml συμπυκνωμένων ερυθρών ή 30 ml ολικού αίματος [197].

Το RhIG διατίθεται σε δύο σκευάσματα: 1) για ενδομυϊκή (IM) χρήση και 2) για IM ή ενδοφλέβια (IV) χορήγηση. Η δόση του ενδοφλέβιου παρασκευάσματος εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες (5 IU είναι ισοδύναμα με 1 µg, και 1500 IU με 300 µg). Σε περίπτωση

διαταραχών αιμόστασης (για παράδειγμα, σοβαρής θρομβοκυτοπενίας ή άλλων διαθλαστικών αιμορραγιών), όταν οι ενδομυϊκές ενέσεις αντενδείκνυνται, συνιστάται η ενδοφλέβια χορήγηση της αντι-D Ig. Φαίνεται ότι και οι δύο οδοί χορήγησης είναι εξίσου αποτελεσματικές και ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο τρόπων χορήγησης [297].

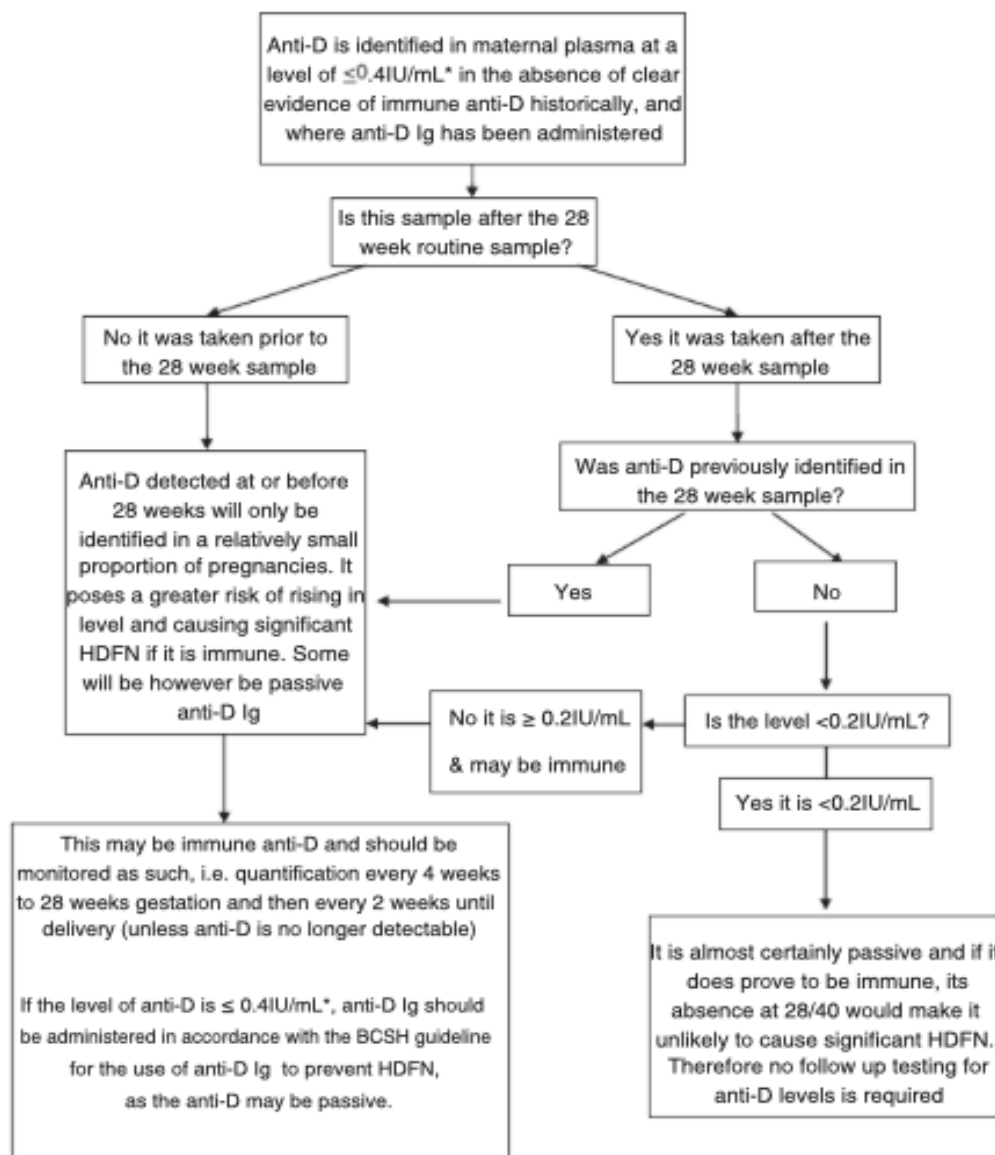
Αξιολόγηση μετά τον τοκετό

Η FMH κατά τη διάρκεια του τοκετού μπορεί, σε σπάνια περίπτωση (3/1000 γεννήσεις), να υπερβαίνει τα 30 mL εμβρυϊκού ολικού αίματος, απαιτώντας ακριβή ποσοτικοποίηση της FMH και περισσότερες από μία δόσεις RhDIG. RhD ευαισθητοποίηση μπορεί να συμβεί παρά τη χορήγηση RhDIG, εάν η ποσότητα του εμβρυϊκού αίματος που θα περάσει στη μητρική κυκλοφορία είναι >30 mL.

Πρέπει να λαμβάνεται δείγμα αίματος της μητέρας, κατά προτίμηση εντός μίας ώρας μετά τον τοκετό και να αξιολογείται για FMH ποσότητας μεγαλύτερης από εκείνη για την οποία 300 μg RhIG προκαλούν ανοσοκαταστολή. Εάν η συστηματική εξέταση καταδεικνύει την παρουσία εμβρυϊκών κυττάρων, η έκταση της FMH πρέπει να προσδιοριστεί έτσι ώστε να μπορεί να χορηγηθεί μια κατάλληλη δόση RhDIG [197].

Επιπλέον: Οι Hall και συν. [298] απέδειξαν ότι τα συνθετικά RhD πεπτίδια, που χορηγήθηκαν στον ρινικό βλεννογόνο διαγονιδιακών ποντικών πριν από την ανοσοποίηση με πρωτεΐνη RhD, ανέστειλαν την ενεργοποίηση των T- κυττάρων και παρεμπόδιζαν την αλλοανοσοποίηση στο D αντιγόνο.

Για να αποκλειστεί η παρουσία μη αντι-D αντισωμάτων μετά από χορήγηση RhDIG, συνιστάται η χρήση εμπορικά διαθέσιμων επιλεγμένων Rh-αρνητικών ερυθροκυττάρων ελέγχου (r 'r, r' 'και rr) για περαιτέρω έλεγχο [282].



Εικόνα 4. Διαχείριση της εγκυμοσύνης όταν έχει ανιχνευθεί αντι-D στο πλάσμα εγκύου για πρώτη φορά μετά από μια δόση αντι-D Ig. Τα επίπεδα αντι-D > 0,4 IU/mL θεωρείται ότι είναι ανοσολογικής προέλευσης και αντιμετωπίζονται ανάλογα, εκτός εάν έχει δοθεί μεγάλη δόση αντι-D Ig (> 3000 IU) ή το δείγμα λήφθηκε εντός ωρών μετά από ενδοφλέβια δόση της αντι-D ανοσοσφαιρίνης, στην οποία, στην περίπτωση που θα μπορούσε να είναι παθητική, η προφύλαξη αντι-D Ig πρέπει να συνεχιστεί.

White J, Qureshi et al. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfusion Medicine* 2016;26:246-263.

Η συγκέντρωση του παθητικού αντι-D Ig σε μητρικά δείγματα μετά την ανοσοπροφύλαξη σπάνια υπερβαίνει τα 0,4 IU/mL, εκτός αν έχει χορηγηθεί αντι-D Ig συνολικά πάνω από 1500 IU. Η μέγιστη συγκέντρωση αντι-D Ig που ανιχνεύθηκε μετά από 1500 IU ενδοφλέβιας αντι-D Ig σε μελέτη σε έγκυες γυναίκες ήταν ισοδύναμη με 0,4 IU/mL και η ενδομυϊκή χορήγηση αντι-D Ig ήταν ισοδύναμη με 0,2 IU/mL [299]. Αυτές οι τιμές είναι κατά

προσέγγιση μετατροπές με βάση τις συγκεντρώσεις που αναφέρονται σε σχετική δημοσίευση. Μετά τη χορήγηση ενδομυϊκής ένεσης αντι-D Ig, μια ορολογικά ανιχνεύσιμη συγκέντρωση αντι-D Ig ανιχνεύθηκε μέσα σε λίγα λεπτά και η μέγιστη συγκέντρωση επιτεύχθηκε εντός 3-7 ημερών. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της παθητικής αντι-D Ig είναι περίπου 3 εβδομάδες [300]. Η παθητική αντι-D Ig μπορεί να ανιχνευθεί με ορολογικές μεθόδους για αρκετές εβδομάδες: με δοκιμασία έμμεσης Coombs (IAT) σε 8 εβδομάδες [192] ή για περισσότερο από 12 εβδομάδες όπου χρησιμοποιούνται πιο ευαίσθητες τεχνικές ή μετά από υψηλότερες δόσεις αντι-D Ig. Το αντι-D ως αποτέλεσμα ενεργητικής ανοσοποίησης καθίσταται ανιχνεύσιμο περίπου 4 εβδομάδες μετά την έκθεση σε D-θετικά κύτταρα και φτάνει σε μέγιστη συγκέντρωση μετά από 6-8 εβδομάδες εάν δεν υπάρχει περαιτέρω έκθεση [301].

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τιτλοποίηση αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων αντιπροσωπεύει μια ημι-ποσοτική μέθοδο για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης του αντισώματος στο πλάσμα. Η τιτλοποίηση ABO αντισωμάτων υπήρξε ένα χρήσιμο εργαλείο για τον καθορισμό των θεραπευτικών στρατηγικών και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των ασθενών σε μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων και μυελού των οστών ασύμβατων ως προς ABO. Η τιτλοποίηση Rhesus D και άλλων μη-ABO αντισωμάτων συχνά εφαρμόζονται για την αξιολόγηση της μητρικής αλλοανοσοποίησης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ένας ακριβής τίτλος σε σύγκριση με έναν προηγούμενο που πραγματοποιείται με την ίδια τεχνική, μπορεί να καθορίσει την ανάγκη παρακολούθησης της εγκυμοσύνης με πρόσθετες μεθόδους όπως το υπερηχογράφημα Doppler [51,135,214,215].

Η τιτλοποίηση που εκτελείται με την κλασική μέθοδο σωληναρίου (CTT) είναι η μέθοδος που χρησιμοποιούν τα περισσότερα εργαστήρια και αυτή που συνιστάται για τον προσδιορισμό των τίτλων αντισωμάτων κατά την εγκυμοσύνη και είναι μια αξιόπιστη και οικονομική μέθοδος. Παρ' όλα αυτά, έχει αρκετούς περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένων των δυσκολιών της ανάγνωσης των αποτελεσμάτων, της αυτοματοποίησης και τυποποίησης [302,303]. Η τεχνική συγκόλλησης με χρήση καρτών gel (GMA – Gel microcolumn agglutination) έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για ποικίλες δοκιμασίες ανοσο-αιματολογίας όπως έμμεση δοκιμασία coombs, ταυτοποίηση ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων και δοκιμασίες διασταύρωσης. Η μέθοδος GMA είναι συμβατή με την αυτοματοποίηση, βελτιώνει την αντικειμενικότητα και επιτρέπει την αποθήκευση των αποτελεσμάτων των εξετάσεων στον τομέα της ανοσοαιματολογίας [304,305]. Παρόλο που η μέθοδος GMA έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των τίτλων αντισωμάτων ABO, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα όσον αφορά την τιτλοποίηση του αντι-D και άλλων μη-ABO αντισωμάτων.

Διεξήχθη μελέτη τιτλοποίησης αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων με σκοπό τη σύγκριση της κλασικής μεθόδου σωληναρίου με τη δοκιμασία συγκόλλησης με κάρτες γέλης δύο διαφορετικών εμπορικών διαθέσιμων συστημάτων GMA σε έγκυες γυναίκες και ασθενείς.

ΘΕΜΑΤΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

A. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ (AG-AB) ΣΤΗΝ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ

I. Ο ρόλος του pH

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια τους με $pH = 7$. Τα μόρια του αντισώματος έχουν ασθενώς θετικό φορτίο σε $pH \ 7-7.5$. Έτσι η προσέλκυση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος κατά το πρώτο στάδιο συγκόλλησης / ευαισθητοποίησης αυξάνεται σε αυτό το pH (μεταβάλλοντας το pH σε πλέον όξινο, επηρεάζεται η σταθερά ισορροπίας για ορισμένα αντισώματα και γίνεται ευκολότερη η ανίχνευσή τους π.χ. αντι-M). Για τα περισσότερα κλινικά σημαντικά αντισώματα των ομάδων αίματος το βέλτιστο pH θεωρείται ότι προσεγγίζει το εύρος του φυσιολογικού $pH(7.0 \text{ έως } 7.2)$ και για τις περισσότερες δοκιμασίες ρουτίνας το $pH \ 7.0 -7.5$ είναι ιδανικό [306].

Το χαμηλότερο pH προκαλεί την αποσύνδεση του αντισώματος από το αντιγόνο, έτσι ώστε το προηγούμενα δεσμευμένο αντίσωμα να δεσμευτεί στο έκλουμα.

Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι διαλύματα απροσδόκητα χαμηλού pH θα μπορούσαν να διακυβεύσουν σοβαρά την ευαισθησία της δοκιμασίας του αντισφαιρινικού ορού όταν χρησιμοποιούνται ως διαλύματα έκπλυσης.

Σε μελέτες που έγιναν όταν χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με χαμηλό pH π.χ. 4.8 ως διάλυμα πλύσης σε δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού, το αντίσωμα υπέστη έκλυση και απλώς εκπλύθηκε, με αποτέλεσμα τη μείωση του τίτλου των αντισωμάτων ή την πλήρη αποτυχία ανίχνευσης της παρουσίας αντισωμάτων [306]. Η απώλεια ευαισθησίας φάνηκε από τη μείωση του τίτλου αντισωμάτων στην ανίχνευση κλινικά σημαντικών αντισωμάτων όπως σε μερικά παραδείγματα αντι-D, αντι-S αντι- s, αντι- Fya, αντι- Jka, και αντι- Vw, που απέτυχαν να αντιδράσουν ή αντέδρασαν ασθενώς όταν πραγματοποιήθηκε δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού χρησιμοποιώντας διάλυμα με pH μικρότερο από 6.5 [307].

II. Ενίσχυση της συγκόλλησης με LISS (Low-ionic-strength-solution) [157]

Το LISS είναι διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος το οποίο επιταχύνει την πρόσληψη του αντισώματος από τα ερυθρά [308] και είναι κατάλληλο για ανίχνευση IgG αντισωμάτων μετά από επώαση στους $37^{\circ}C$ για 5-15'.

Με τη χρήση LISS μειώνεται η ιοντική ισχύς από 0,17M (φυσιολογικός ορός) σε 0,03M (LISS) και αυξάνεται κατά 1000 φορές η αρχική ταχύτητα σύνδεσης του αντισώματος με τα ερυθροκύτταρα (π.χ. αντι-D με D θετικά κύτταρα). Το διάλυμα liss περιέχει 0,2% NaCl σε γλυκόζη 7% αντί για φυσιολογικό ορό [113].

Για την αποτροπή της λύσης των ερυθροκυττάρων σε μια τόσο χαμηλή ιοντική ισχύ είναι ενσωματωμένη στο LISS μια μη ιοντική ουσία όπως είναι η γλυκίνη. Το LISS είναι ενσωματωμένο από κατασκευής στις μικροστήλες γέλης. Φαίνεται ότι ο τίτλος αλλοαντισωμάτων διαφόρων ειδικοτήτων αυξάνεται με Liss.

III. Αντισφαιρινικός ορός [157]

Αρκετά ατελή αντισώματα τύπου IgG βρίσκονται προσκολλημένα επάνω στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών προκαλώντας τους ευαισθητοποίηση αλλά λόγω της μικρής απόστασης των Fab τμημάτων του IgG αντισώματος που είναι μικρότερη από την απόσταση δύο γειτονικών ερυθρών αδυνατούν να τα συγκολλήσουν και να προκαλέσουν ορατή συγκόλληση. Εξετάζοντας λοιπόν *in vitro* την παρουσία ατελών αντισωμάτων προσκολλημένων στα ερυθρά, υπάρχει η δυνατότητα στο σωληνάριο (σε κάρτες γέλης είναι ενσωματωμένος) που περιέχει το εναιώρημα των ερυθρών να προστεθούν αντι-αντισώματα (αντισφαιρινικός ορός- AHG). Τα τελευταία αναγνωρίζουν τα IgG αντισώματα που είναι ήδη συνδεδεμένα στα ερυθρά θα συνδεθούν μαζί τους σχηματίζοντας γέφυρα μεταξύ των ερυθρών και συνεπώς θα υπάρξει ορατή συγκόλληση. Ο πολυδύναμος αντισφαιρινικός ορός (AHG) περιέχει αντισώματα έναντι του Fc τμήματος των IgG ανοσοσφαιρινών και έναντι του C3d παράγοντα του ανθρώπινου συμπληρώματος.

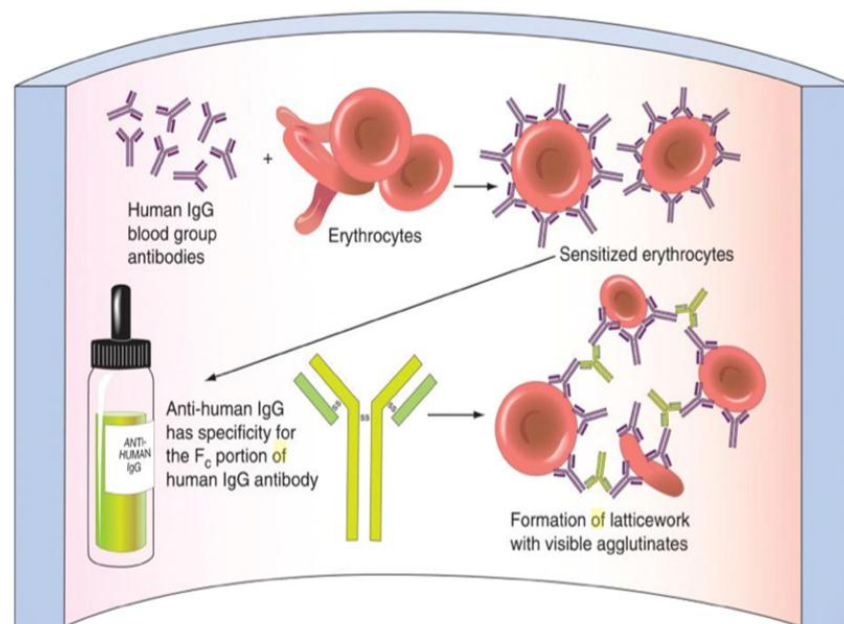


Figure 35-20 Antihuman globulin antibodies form a bridge between adjacent erythrocytes sensitized with human immunoglobulin (Ig)G or complement components.

Εικόνα 5. Τα αντισώματα έναντι της ανθρώπινης σφαιρίνης σχηματίζουν γέφυρα μεταξύ γειτονικών ευαισθητοποιημένων ερυθροκυττάρων με ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη (Ig) G ή τα συστατικά του συμπληρώματος

Richard A. Mc Pherson et al. *Immunohematology tests and procedures. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 2017;4: 715-717

Με την προσθήκη πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού ανιχνεύονται αντισώματα των συστημάτων Rhesus, Kell, Duffy, Ss, Kidd, Lutheran και άλλα IgG αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα [165].

IV. Επεξεργασία με ένζυμο [157]

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται συχνότερα στα εργαστήρια ανοσοαιματολογίας είναι η θρυψίνη, φυσίνη,[56] βρωμελαΐνη και παπαΐνη. Δρουν απομακρύνοντας το σιαλικό οξύ, μειώνοντας έτσι το καθαρό αρνητικό φορτίο των κυττάρων, επιτρέποντάς τους να συνδεθούν με τα μόρια του αντισώματος. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα μειώνουν το επιφανειακό φορτίο των ερυθροκυττάρων με την αποκοπή πολυπεπτιδίων που περιέχουν αρνητικά φορτισμένα μόρια σιαλικού οξέος από αλυσίδες πολυσακχαριτών. Με τη χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων προκύπτουν μεταβολές στην κατανομή των αντιγονικών θέσεων στην επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που ποικίλλει κατά αντιγόνο π.χ. καλύτερη προσπέλαση του αντιγόνου στα

συστήματα ABO,Rh, Kell, Kidd, Lewis και καταστολή του αντιγόνου στα συστήματα MNSs, Duffy, Xga, Chido, Rg, JMH [165].

V. Χρόνος επώασης [157]

Ο συνήθης χρόνος επώασης είναι 30' για την κλασική μέθοδο σωληναρίου [309]. Για μερικά αντισώματα που δρουν ασθενώς, ο παρατεταμένος χρόνος επώασης μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της αντίδρασης.

Για τις κάρτες γέλης με προσθήκη LISS ο χρόνος επώασης είναι 15 λεπτά [129]. Παράταση του χρόνου επώασης με χρήση LISS μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της ευαισθησίας της αντίδρασης.

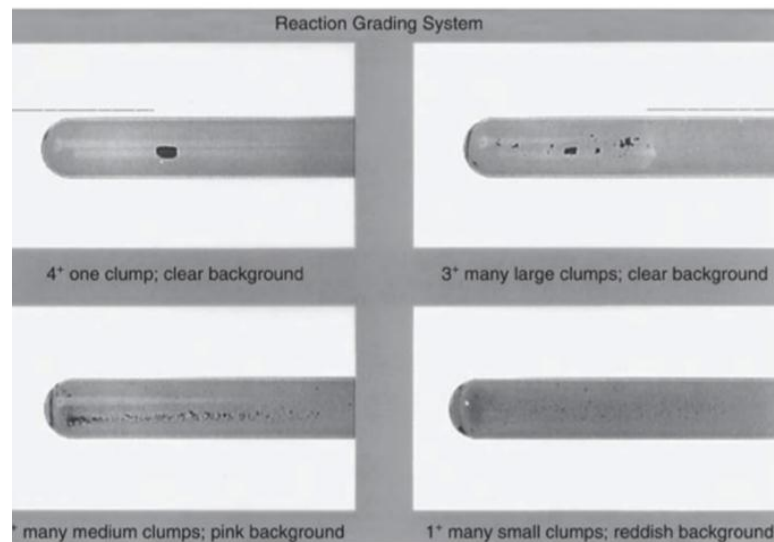
VI. Φυγοκέντρωση

Η φυγοκέντρωση μέσω των δυνάμεων που αναπτύσσονται, επιτρέπει τη μείωση των απωθητικών δυνάμεων μεταξύ των ευαισθητοποιημένων με αντίσωμα ερυθροκυττάρων και την επακόλουθη συγκόλληση αυτών.

VII. Τεχνικές αιμοσυγκόλλησης

ο Κλασική μέθοδος σωληναρίου [310,311]

Τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάκια ο προς εξέταση ορός με ερυθρά ελέγχου γνωστής αντιγονικής σύνθεσης (αφού έχουν προηγηθεί οι αραιώσεις που γίνονται για την τιτλοποίηση), και γίνεται επώαση στους 37 °C. Ακολουθεί πλύσιμο των ερυθρών με φυσιολογικό ορό και προσθήκη αντισφαιρινικού ορού. Μετά τη φυγοκέντρωση (συνθήκες ταχύτητας και χρόνου είναι καθορισμένες) ακολουθεί παρατήρηση για ύπαρξη συγκόλλησης, και σε παρουσία της, εκτίμηση της θετικότητας.



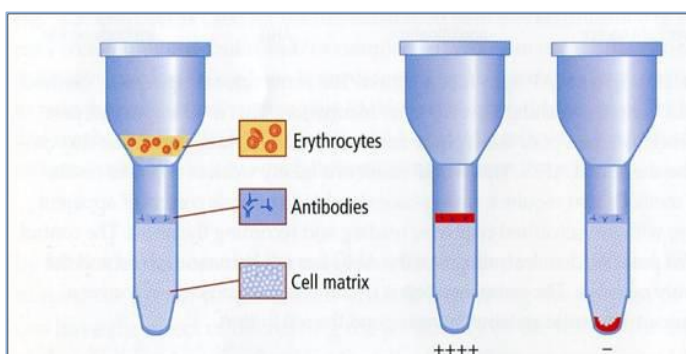
Εικόνα 6. Βαθμολόγηση αντιδράσεων συγκόλλησης με κλασική μέθοδο σωληναρίου
Richard A. Mc Pherson et al. Immunohematology tests and procedures. Henry's Clinical Diagnosis and Managment by Laboratory Methods. 2017;4:715-717

ο Μικροστήλες γέλης

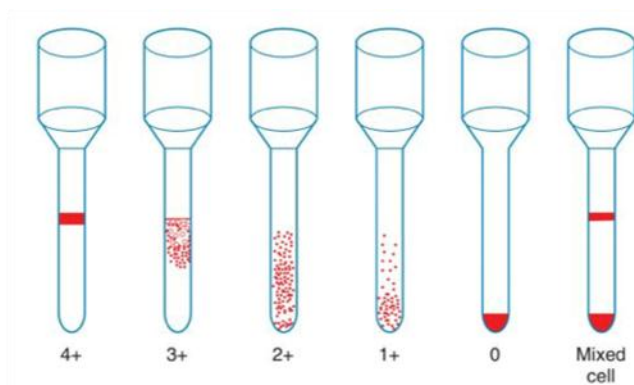
Σε αυτή την τεχνική, ο ορός και τα ερυθρά ελέγχου τα οποία εναιωρούνται σε διάλυμα LISS, τοποθετούνται σε ειδικά βυθίσματα σε κάρτες οι οποίες περιέχουν μικροσωληνάρια γέλης. Οι μικροσωληνίσκοι γέλης περιέχουν AHG πολυειδική αντι-ανθρώπινη σφαιρίνη και ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος (liss).

Ακολουθεί επώαση στους 37°C και φυγοκέντρηση. Οι συνθήκες ταχύτητας και χρόνου είναι καθορισμένες [129]. Δεν απαιτείται πλύσιμο των ερυθροκυττάρων.

Σε αρνητική αντίδραση τα ερυθροκύτταρα διαπερνούν ελεύθερα τη γέλη και συγκεντρώνονται στον πυθμένα των μικροστηλών ενώ σε θετική αντίδραση παραμένουν στην κορυφή και «παγιδεύονται» μέσα στη γέλη [157] (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Μικροσωληνίσκοι γέλης AHG(θετική και αρνητική αντίδραση)
G. Daniels et al. Techniques used in blood grouping Essential Guide to Blood Groups. 2011;2:15-17.



Εικόνα 8. Εμφάνιση προτύπων αντίδρασης και βαθμολόγηση για τεχνική συγκόλλησης γέλης ή στήλης
Richard A. Mc Pherson et al. Immunohematology tests and procedures. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 2017;4: 715-717

Για την ερμηνεία των συγκολλητινοαντιδράσεων χρησιμοποιείται κλίμακα μέτρησης που επιτρέπει την κατά προσέγγιση μέτρηση της έντασης της συγκολλητινοαντίδρασης.

Macroscopically Observed Findings	Designation	Score
One solid agglutinate	4+	12
Several large agglutinates	3+	10
Medium-size agglutinates, clear background	2+	8
Small agglutinates, turbid background	1+	5
Very small agglutinates, turbid background	1 ^w	4
Barely visible agglutination, turbid background	w+ or +/-	2
No agglutination	0	0
Mixtures of agglutinated and unagglutinated red cells (mixed field)	mf	
Complete hemolysis	H	
Partial hemolysis, some red cells remain	PH	

Used with permission from Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. Technical manual. 17th ed. Bethesda, MD: AABB, 2011:874.

Εικόνα 9. Ερμηνεία των αντιδράσεων αιμοσυγκόλλησης
Antibody Identification: Art or Science? A Case Study Approach AABB 2013

B. ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ο έλεγχος των αντιδραστηρίων συνιστάται στη διαπίστωση ότι αυτά λειτουργούν όπως αναμένεται. Σε κάθε αντιδραστήριο θα πρέπει να αναφέρεται με σαφήνεια η ειδικότητά του, ο αριθμός της σειράς παραγωγής, η διάρκεια χρήσης με βάση την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης, η θερμοκρασία συντήρησης, και οι γενικές οδηγίες χρήσης του. Κάποια αντιδραστήρια πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές.

Ειδικότερα:

Ο αντισφαιρινικός ορός κατά τη χρήση του στη διαδικασία τιτλοποίησης θα πρέπει:

- Να είναι μείγμα (blend), πολυκλωνικός αντι-IgG (ευαισθητοποίηση κονίκλου), μονοκλωνικός αντι-C3d (ευαισθητοποίηση ποντικού, με το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που διατίθεται στο εμπόριο) [310].
- Τα ερυθρά ελέγχου κατά τη χρήση τους στη διαδικασία τιτλοποίησης θα πρέπει σύμφωνα με τις οδηγίες της Βρετανικής επιτροπής (BCSH- British Committee for Standards in Haematology) αλλά και του FDA (Food and Drug Administration) να πληρούν τα εξής:
- Θα πρέπει να εκφράζονται τουλάχιστον τα αντιγόνα: C, c, D, E, e, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s, M, N, και Lea [129,142].
- Θα πρέπει να εκφράζονται οι φαινότυποι CDe/CDe και cDE / cDE.
- Μερικά αντισώματα είναι δοσοεξαρτώμενα και είναι δυνατόν να αντιδρούν μόνο με ερυθρά δοτών ομόζυγων για το αντίστοιχο αντιγόνο και για το λόγο αυτό προτείνεται να εκφράζονται στα ερυθρά ελέγχου οι φαινότυποι Jka(a+b-), Jka(a-b+), S+s-, S-s+, Fy(a+b-), Fy(a-b+) [128,137-139,140,141].

Γ. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Απώτερος σκοπός όσον αφορά τον έλεγχο των τεχνικών που χρησιμοποιούνται, είναι να εξασφαλίζεται μια σταθερή εκτέλεση υψηλού επιπέδου εκείνων των τεχνικών που αναγνωρίζουν αντισώματα κλινικώς σημαντικά. Με δεδομένη την ποιότητα των συσκευών και των αντιδραστηρίων, τα εσφαλμένα αποτελέσματα οφείλονται είτε σε χρήση μη καθιερωμένων τεχνικών, είτε συχνότερα σε εκτελεστικά σφάλματα ή και λανθασμένη ερμηνεία. Σε ότι αφορά το πρώτο, κάθε εργαστήριο πρέπει να διαθέτει πρωτόκολλο για τις

τεχνικές που χρησιμοποιεί. Σε ότι αφορά τα εκτελεστικά σφάλματα αυτά μπορεί να οδηγήσουν είτε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, είτε σε ψευδώς αρνητικά.

Η τιτλοποίηση που εκτελείται με την κλασική μέθοδο σωληναρίου (CTT) είναι η μέθοδος που χρησιμοποιούν τα περισσότερα εργαστήρια και αυτή που συνιστάται για τον προσδιορισμό των τίτλων αντισωμάτων κατά την εγκυμοσύνη και είναι μια αξιόπιστη και οικονομική μέθοδος. Παρ' όλα αυτά, έχει αρκετούς περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένων της δυσκολίας ανάγνωσης των αποτελεσμάτων καθώς και των δυσκολιών αυτοματοποίησης, και τυποποίησης [302,303]. Η τεχνική συγκόλλησης με χρήση καρτών gel (GMA) έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για ποικίλες δοκιμασίες ανοσο-αιματολογίας όπως έμμεση δοκιμασία coombs, ταυτοποίηση ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων και δοκιμασίες διασταύρωσης. Η μέθοδος GMA είναι συμβατή με την αυτοματοποίηση, βελτιώνει την αντικειμενικότητα, προσφέρει τον καλύτερο χρόνο διεκπεραίωσης του τίτλου εξαλείφοντας τον επιπλέον χρόνο που χρειάζεται στην κλασική μέθοδο σωληναρίου [312] και επιτρέπει την αποθήκευση των αποτελεσμάτων των εξετάσεων και την επανεκτίμηση τους σε δεύτερο χρόνο ή/και από άλλον ειδικό του εργαστηρίου [304,305]. Σύμφωνα με τη Βρετανική επιτροπή (BCSH-British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force), καταλληλότερη τεχνική για την ανίχνευση κλινικά σημαντικών αντισωμάτων είναι η έμμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού με τη χρήση ερυθρών σε διάλυμα LISS (Low Ionic Strength Solution), ενώ οι μέθοδοι συγκόλλησης σε στήλες είναι απλές και αξιόπιστες [313].

Οι τιτλοποιήσεις αντισωμάτων είναι δύσκολο να “τυποποιηθούν” στο εργαστήριο [314]. Υπάρχει η μακροχρόνια πρακτική της επανάληψης της τιτλοποίησης αντισώματος (ειδικά σε περιπτώσεις αλλοανοσοποιημένων εγκύων γυναικών) σε ένα προηγούμενα ελεγμένο δείγμα παράλληλα με το επόμενο δείγμα. Αυτή η πρακτική καθιερώθηκε για να μειώσει τις ασυνέπειες της τεχνικής και της ερμηνείας μεταξύ των διενεργούντων των εξετάσεων τιτλοποίησης [192,211,212].

Επειδή οι τεχνικές μεταβλητές μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα, θα πρέπει να τονιστεί η σπουδαιότητα της τήρησης του πρωτοκόλλου των τεχνικών στο εργαστήριο.

Συνήθη σφάλματα κατά την τιτλοποίηση αντισωμάτων είναι:

1. Δείγματα που δεν αποψύχθηκαν καλά.
2. Λανθασμένη σήμανση των σωληναρίων-καρτών.

3. Χρήση ίδιας πιπέτας κατά τη διάρκεια της διαδοχικής αραίωσης του ορού.
4. Λανθασμένη αναλογία ελαιωρήματος ερυθρών και ορού.
5. Ακατάλληλη πυκνότητα ελαιωρήματος ερυθρών.
6. Χαμηλό pH διαλύματος πλύσης.
7. Ανεπαρκές πλύσιμο με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του αντισφαιρινικού ορού από προσμίξεις ορού [277].
8. Πρόωρη διακοπή ή καθυστέρηση της δοκιμασίας.
9. Μη προσθήκη αντισφαιρινικού ορού ή απώλεια της δραστηριότητάς του λόγω ανεπαρκούς συντήρησης.
10. Ακατάλληλη φυγοκέντρηση [277]
 - ο Η υπερβολική φυγοκέντρηση προκαλεί τη συγκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα έτσι ώστε να χρειαστεί ισχυρή ανάδευση πριν τη επαναιώρηση τους (CTT). Κατά τη διάρκεια τέτοιας ισχυρής ανάδευσης, η ασθενής συγκόλληση μπορεί να εξασθενήσει τόσο ώστε να προκληθεί απώλεια θετικής αντίδρασης.
 - ο Η υποφυγοκέντρηση, δηλαδή η αποτυχία εφαρμογής ισχυρής δύναμης για την πρόκληση συγκόλλησης των κυττάρων και τη δημιουργία «κουμπιού» και διαυγούς και υπερκείμενου υγρού, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα εξασθενημένη ή αρνητική αντίδραση.
11. Εσφαλμένη ανάδευση του δείγματος κατά τη στιγμή της ερμηνείας των αποτελεσμάτων [277].
12. Ανεπαρκής τεχνική εκπαίδευση του προσωπικού στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αυτή η μελέτη συγκρίνει την τιτλοποίηση αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων (εκτός των ABO) με τρεις μεθόδους: την κλασική μέθοδο τιτλοποίησης σε σωληνάριο (CTT) και τις μεθόδους μικροστηλών γέλης (GMA) από δύο διαφορετικούς κατασκευαστές για τιτλοποίηση αλλοαντισώματος RBC με σκοπό την εκτίμηση της πιθανότητας της ευρύτερης χρήσης της συμβατής με την αυτοματοποίηση μεθόδου μικροστηλών γέλης GMA στην τιτλοποίηση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ & ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ RBC

Στη μελέτη αξιολογήθηκαν τα δείγματα ορού με θετική έμμεση coombs (IAT) που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία του προ-μεταγγισιακού ελέγχου (Autovue & Bionvue Ortho Clinical Diagnostics Bridgend – United Kingdom) και περιείχαν κλινικά σημαντικά αντιερυθροκυτταρικά αλλοαντισώματα IgG.

Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν (1500 g, 10 λεπτά) και αποθηκεύτηκαν (ορός) άμεσα στους -25 °C. Η τιτλοποίηση πραγματοποιήθηκε εντός 15 ημερών μετά τη συλλογή. Η μελέτη διεξήχθη από τον Μάρτιο του 2012 μέχρι τον Ιούλιο του 2014.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου Αρεταίειο και του Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Νίκαιας, Πειραιά.

Τα δείγματα ορού αποψύχθηκαν αμέσως πριν από τη δοκιμασία.

Έγιναν έντεκα υποδιπλάσιες αραιώσεις δειγμάτων ορού (δηλ. 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, ... 1024) με φυσιολογικό ορό [311].

Κάθε αραιώση ελέγχθηκε με CTT και με δύο διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα συστήματα GMA ταυτόχρονα. Κάθε δείγμα τιτλοποιήθηκε συγχρόνως με κλασική μέθοδο CTT, κάρτες γέλης ID-DiaMed-GmbH, Cressier, Switzerland (GMA1) και επίσης με κάρτες γέλης DG Gel Coombs Diagnostic Grifols, Passeig Fluvial, Spain (GMA2). Για την τιτλοποίηση με τη μέθοδο CTT, χρησιμοποιήθηκε πολυδύναμος αντισφαιρινικός ορός AHG (Millipore, Livingston, UK & Immundiagnostika GmbH, Dietzenbach, Germany).

Τα ερυθροκύτταρα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία CTT ήταν τα εμπορικά διαθέσιμα $3 \pm 1\%$ αντιδραστήρια RBCs (Ortho Clinical Diagnostics, Bridgend - United Kingdom), τα οποία επίσης χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των RBCs αντιδραστηρίων 0,8% για την τιτλοποίηση με την τεχνική GMA όπως αναφέρθηκε προηγουμένως [315,316]. Η επιλογή των RBCs για την τιτλοποίηση κάθε αντισώματος έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε τα RBC να εκφράζουν εάν είναι εφικτό, μια διπλή δόση του αντίστοιχου αντιγόνου δηλαδή από δότες ομόζυγους για το αλληλόμορφο που κωδικοποιεί το σχετικό αντιγόνο RBC.

Για τον έλεγχο αντι-D αντισωμάτων, προτιμήθηκαν τα ερυθρά ελέγχου R2 R2 (DcE/DcE), διότι όλοι οι δότες έχουν την ίδια έκφραση του αντιγόνου στα ερυθρά τους, και είναι τα κύτταρα που φέρουν μια υποτιθέμενη διπλή δόση του αντιγόνου που αντιστοιχεί στο

αντίσωμα που αφορά τα δείγματα που επιλέχθηκαν για την τιτλοποίηση. Τα ερυθροκύτταρα R2 R2 είναι επίσης κατάλληλος δείκτης ερυθρών ελέγχου που απαιτείται για τις τεχνικές προγεννητικής τιτλοποίησης σε περιπτώσεις αντι-c, αντι-E, αντι-cE ή συνδυασμοί αυτών [69].

Δοσολογική επίδραση (Dosage effect): Η έκφραση του D φαίνεται να ποικίλλει με τα συνοδευτικά αλληλόμορφα του γονότυπου. Τα ερυθρά κύτταρα ατόμου DcE/DcE φέρουν περισσότερα D αντιγόνα από τα ερυθρά ενός ατόμου DCe/Dce και μπορεί σε τιτλοποίηση αντι-D να προκύψει μεγαλύτερος τίτλος. Οι δοσολογικές επιδράσεις μπορεί μερικές φορές να αποδειχθούν με ορισμένα αντισώματα που απευθύνονται στα αντιγόνα E, c, και e, και περιστασιακά στο αντιγόνο C [317].

Με εξαίρεση το αντι-C+D(αντι-G) στα οποία γίνεται πρόσμιξη των γνωστών ερυθρών ελέγχου, προσδιορίστηκαν ξεχωριστοί τίτλοι για κάθε αντίσωμα του συστήματος Rhesus που βρίσκονται σε συνδυασμό, γιατί η συνδυαστική δράση του αντισώματος μπορεί να προσδιορίσει τη βαρύτητα της αιμολυτικής νόσου [69]. Για τον προσδιορισμό ξεχωριστών τίτλων στις περιπτώσεις διπλών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε το ομόζυγο κύτταρο που εκφράζει το κάθε αντίσωμα όπου αυτό ήταν δυνατό.

Στις τεχνικές τιτλοποίησης δεν χρησιμοποιήθηκαν Bg(+) ερυθροκύτταρα διότι μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς υψηλές τιμές, ειδικά σε ορούς πολύτοκων γυναικών.

Αντι-C+G: [69] Όταν υπάρχουν G αντισώματα (αλλά όχι αντι- D) ο τίτλος με χρήση C+D- ερυθροκυττάρων είναι κατά κανόνα υψηλότερος από ότι ο τίτλος στον οποίο χρησιμοποιήθηκαν C-D+ ερυθροκύτταρα.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για την τιτλοποίηση με τη μέθοδο σωληναρίου CTT, 100 μl κάθε δείγματος αραιωμένου ορού (εκτός από το πρώτο που περιείχε μόνο ορό) μεταφέρθηκαν σε 10 σωληνάρια μαζί με 50 μl ενός εναιωρήματος RBC $3\pm 1\%$. Κάθε σωληνάριο επώαστηκε για 30 λεπτά στους 37 °C και μετά πλύθηκε τρεις φορές σε αυτόματη φυγόκεντρο πλύσης. Μετά την προσθήκη 100 μl πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού AHG (Millipore, Livingston, UK & Immundiagnostika GmbH, Dietzenbach, Germany), τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν στα 1.000 g για 15 δευτερόλεπτα (στη φυγόκεντρο Lavofuge 24- Germany) και επαναιωρήθηκαν με ήπια ανάδευση. Η συγκόλληση βαθμολογήθηκε από 0 έως 4+ σύμφωνα με το τεχνικό εγχειρίδιο

AABB [311]. Η τιτλοποίηση σε κάρτες έγινε με τη χρήση καρτών γέλης : ID-DiaMed-GmbH, Cressier, Switzerland για GMA1 και DG Gel Coombs Diagnostic Grifols, Passeig Fluvial, Spain για GMA2 ακολουθώντας τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για ανίχνευση και ταυτοποίηση αντισωμάτων, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Αναλυτικότερα για την GMA1 μετά την παρασκευή των κύριων αραιώσεων του δείγματος, σε κάθε στήλη καρτών γέλης (ID-Liss/Coombs – DiaMed -GmbH, Cressier, Switzerland) προστέθηκαν 50 μl εναιωρήματος ειδικά επιλεγμένων RBC 0,8% (Surgiscreen ή Resolve panel C, Ortho Clinical Diagnostics, Bridgend – United Kingdom) και 25 μl αραιωμένου δείγματος ορού. Αντίστοιχα για την GMA2 μετά την παρασκευή των κύριων αραιώσεων του δείγματος, και με χρήση καρτών γέλης (DG Gel Coombs/AHG Poly Diagnostic Grifols, Passeig Fluvial, Spain) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη χρήση ίδιων ερυθρών με τη μέθοδο GMA1. Η επώαση έγινε στους 37 ° C για 15' και στη συνέχεια οι κάρτες γέλης φυγοκεντρήθηκαν σε αντίστοιχη για κάθε εταιρεία φυγόκεντρο, (ID-Centrifuge 24 S Diamed-ID για GMA1 & Grifols DG SPIN για GMA2), τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν οπτικά και βαθμολογήθηκαν [129].

Ο αναφερόμενος τίτλος και με τις δύο μεθόδους αντιστοιχεί στο αντίστροφο της μέγιστης αραιώσης ορού που έδειξε βαθμό συγκόλλησης (1+) [311,318-321]. Στη μελέτη αυτή τουλάχιστον δύο αρνητικά δείγματα ορού με μετέπειτα υψηλότερη αραιώση επιβεβαίωσαν το τελικό θετικό αποτέλεσμα.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από το πρόγραμμα SAS 9.4 για Windows (SAS Institute Inc. NC, ΗΠΑ) [322].

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα μεταξύ των δοκιμασιών. Η πρώτη μέθοδος είναι η μέση απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο μεθόδων. Αρχικά υπολογίστηκε η μέση διαφορά μεταξύ του λογαρίθμου βάσης 2 ($\log_2$) της αραιώσεως που δείχνει ότι η δοκιμασία ήταν θετική. Δεδομένου ότι ένα αρνητικό αποτέλεσμα αποδίδεται στον αριθμό μηδέν (0) που δεν έχει λογάριθμο, προσθέσαμε 1 για κάθε αριθμό αραιώσεως, οπότε για την αραιώση 4 το $\log_2(4) + 1$ ήταν $2 + 1 = 3$ κ.λπ. Οι διαφορές των λογαρίθμων για το αποτέλεσμα των δύο δοκιμασιών μπορεί να είναι ένας θετικός ή αρνητικός αριθμός και ως εκ τούτου η τελική μέση τιμή μπορεί να μην αντικατοπτρίζει την πραγματική ασυμφωνία μεταξύ των δοκιμασιών; έτσι η μέση τιμή υπολογίστηκε επί της απόλυτης διαφοράς. Για παράδειγμα, εάν για τρία αποτελέσματα η διαφορά είναι -1, 0 και 1 τότε η μέση τιμή είναι 0, ενώ η μέση τιμή των απόλυτων διαφορών είναι $2/3 = 0,67$, αποτέλεσμα ενδεικτικό ότι οι δύο δοκιμασίες διαφέρουν (κάτι που δεν αντανακλάται εάν δεν χρησιμοποιείται η απόλυτη τιμή).

Ο δεύτερος τρόπος αξιολόγησης για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ήταν η μέθοδος Kendall που λαμβάνει υπόψη πληροφορίες που σχετίζονται με την εγγύτητα των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών [323] και εισάγει μια μέτρηση (W) που κυμαίνεται από καμία συμφωνία ($W \leq 0$) σε περιπτώσεις που τα αποτελέσματα θεωρούνται ως τυχαία, ως την πλήρη ταύτιση των αποτελεσμάτων $W = 1$. Η μέθοδος του Kendall είναι πιο αντιπροσωπευτική της συμφωνίας των τεχνικών, καθώς λαμβάνει υπόψη την «απόσταση» μεταξύ των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 13. Σύγκριση GMA1, GMA2 & CTT (ΚΜΣ) με τη μέθοδο kappa και Kendall

Category (Dilutions?)	GMA1, GMA2 & CTT		GMA1 vs GMA2		GMA1 vs CTT		GMA2 vs CTT	
	Kappa	p-value	Kappa	p-value	Kappa	p-value	Kappa	p-value
0 (NEGATIVE)	-0.03244	0.7446	-0.05792	0.7511	-0.0494	0.7184	-0.18486	0.9848
1 (1)	0.05226	0.1447	0.49577	<.0001	-0.16015	0.9696	-0.24545	0.998
2 (2)	0.10945	0.0132	0.4775	<.0001	-0.09991	0.8789	-0.14167	0.9514
3 (4)	0.19148	<.0001	0.38288	<.0001	0.05009	0.2788	0.05009	0.2788
4 (8)	0.0943	0.028	0.38372	<.0001	-0.07451	0.8084	-0.096	0.8694
5 (16)	0.19517	<.0001	0.35276	<.0001	0.05928	0.2439	0.1517	0.0379
6(32)	0.24725	<.0001	0.60174	<.0001	0.1476	0.042	-0.05792	0.7511

7(64)	0.34614	<.0001	0.79242	<.0001	-0.02622	0.6205	-0.01859	0.5861
8(128)	0.33447	<.0001	0.6989	<.0001	-0.02622	0.6205	-0.02622	0.6205
9(256)	-0.01232	0.5986	-0.01107	0.5515	-0.01107	0.5515	-0.01481	0.5688
10(512)	0.49509	<.0001	1	<.0001	-0.00735	0.5343	-0.00735	0.5343
11(1024)	0.49756	<.0001	1	<.0001	-0.00366	0.5171	-0.00366	0.5171
Overall (kappa)	0.11694	<.0001	0.45282	<.0001	-0.04745	0.9037	-0.10389	0.9983
Kendal's W	0.90135	<.0001	0.9467	<.0001	0.90859	<.0001	0.92154	<.0001

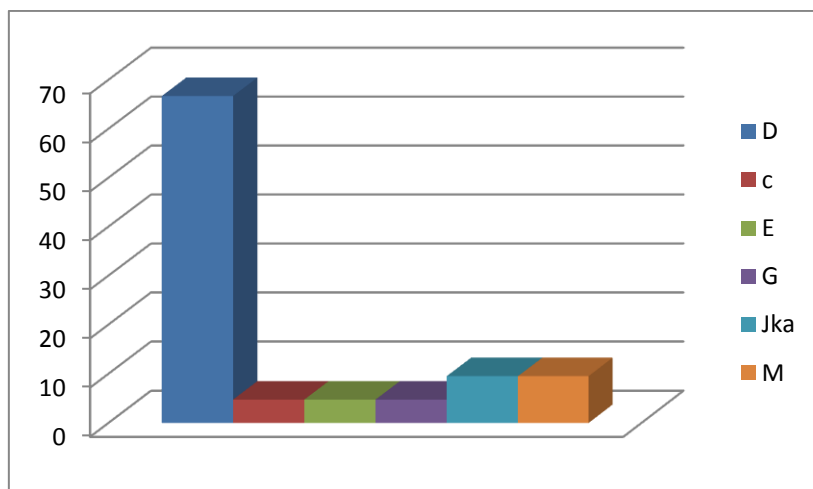
Σύγκριση και των τριών μεθόδων μέσω της μεθόδου Kendall, καθώς και σε βάση ζεύγους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συλλογικά. Τα αποτελέσματα σύγκρισης παρουσιάζονται για κάθε αραίωση / κατηγορία, για την κλασική μέθοδο kappa και για τη μέθοδο Kendall (που λαμβάνει υπόψη την εγγύτητα των κατηγοριών).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ & ΚΥΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκαν 43 τιτλοποιήσεις σε 21 γυναίκες που ελέγχθηκαν κατά τη διάρκεια της κύησης και σε 2 νεογνά και αφορούσαν τα αντισώματα αντι-D(15), αντι- c (1), αντι- G(1) αντι-E(1), αντι- Jka(2), αντι- M(3). Ο αριθμός των τιτλοποιήσεων που έγινε ανάλογα με την ειδικότητα του αντισώματος είναι: αντι-D:30, αντι-G:3, αντι-c:1, αντι-E:1, αντι-Jka:2, και αντι-M:6. Οι τιτλοποιήσεις που έγιναν κατ' άτομο είναι: σε 17 περιπτώσεις 1 τιτλοποίηση, σε 1 περίπτωση 2 τιτλοποιήσεις, σε 2: 3, σε 2:4, και σε 1:10 τιτλοποιήσεις που αφορούσαν δύο κυήσεις για το ίδιο άτομο. Πέντε (5) από αυτές τις έγκυες ήταν αλλοδαπές (αντι-D:2, αντι-Jka:2, αντι-M:1). Η ευαισθητοποίηση που σχετίστηκε με την κύηση για τις 21 έγκυες αφορούσε τα αντισώματα Rh: 80.95% (αντι-D:66.7%, αντι-c:4.76%, αντι-E:4.76%, αντι-G:4.76%), αντι-Jka:9.52%, αντι-M:9.52%.

Γράφημα 1. Αντισώματα εγκύων γυναικών



Στις περιπτώσεις αντι-D(4), αντι- G(1) και αντι-M(1) έγιναν τιτλοποιήσεις κατά μέσο όρο από την 12^η εβδομάδα της κύησης έως την 38^η σε σύγκριση με έναν προηγούμενο τίτλο που εκτελέσθηκε με την ίδια τεχνική και την ίδια χρονική στιγμή, για την ανίχνευση αυξημένης παραγωγής μητρικού αντισώματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις η ταυτοποίηση και η τιτλοποίηση του αντισώματος έγινε την 38^η – 40^η εβδομάδα της κύησης.

Όσον αφορά το ιστορικό των γυναικών αναφέρονται: προηγούμενες κυήσεις: 9, χορήγηση RhD_{IG}: 9, μετάγγιση: 2 και μετάγγιση + κύηση:1.

Από τα 22 νεογνά που γεννήθηκαν τα 7/22 είχαν άμεση Coombs (DAT) αρνητική. Τα 9/22 είχαν DAT θετική με τη διαβάθμιση της θετικότητας να παρουσιάζεται ως εξής: 5:1+, 1:2+, 2:3+, και σε 1:4+. Τα αποτελέσματα της ΙΑΤ ήταν: σε 12/22 αρνητική, και σε 4/22 θετική. Σε 6/22 δεν υπάρχουν πληροφορίες για το νεογνό.

Αναλυτικά

Τα νεογνά για τα οποία είχαμε αποτελέσματα ως προς ABO RhD (10/22) και η μητέρα τους είχε αναπτύξει αντι-D χαρακτηρίστηκαν όλα RhD(+).

Τα 6/10 είχαν ασυμβατότητα ως προς ABO με τη μητέρα. Σε 3/6 η μητέρα ήταν Ο και το νεογνό Α, 1/6 Μ:ΑΒ & Ν:Α, 1/6 Μ:Α & Ν:Ο, και 1/6 Μ:Β & Ν: Ο. Από αυτά 3/6 παρουσίασαν DAT(-) & ΙΑΤ(-) και οι τίτλοι των μητέρων ήταν 1, 4 και 8 την 38^η έως την 40^η εβδομάδα κύησης, 2/6 παρουσίασαν DAT(1+), και ΙΑΤ(-), και οι μητέρες παρουσίασαν τίτλο 2 η πρώτη την 28^η και η δεύτερη την 38^η εβδομάδα της κύησης, ενώ ο αρχικός τίτλος και των δύο ήταν 8. Το 1/6 παρουσίασε DAT(4+) & ΙΑΤ(+), ο τίτλος αντισώματος της μητέρας ήταν 128/256/32 και του νεογνού 16/32/2 με τις μεθόδους GMA1/GMA2/CTT αντίστοιχα, και το νεογνό μεταγγίστηκε.

Τα 4/10 είχαν ταυτόσημο ABO με τη μητέρα. Το 1/4 είχε DAT(-) & ΙΑΤ(-) και η μητέρα παρουσίασε τίτλο 2 την 40^η εβδομάδα κύησης. Τα 2/4 παρουσίασαν DAT(1+) & ΙΑΤ(-) και γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα που και στις δύο εγκυμοσύνες παρουσίασε χαμηλούς τίτλους (1,4, και 2 στην πρώτη, και 1 και 2 στη δεύτερη κύηση) με τον τελευταίο τίτλο να έχει γίνει την 36^η και 35^η εβδομάδα αντίστοιχα. Το 1/4 παρουσίασε DAT(3+) & ΙΑΤ(+) ο τίτλος της μητέρας ήταν την 38^η εβδομάδα 128/128/32 με τις μεθόδους GMA1/GMA2/CTT αντίστοιχα, και το νεογνό μεταγγίστηκε.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα αντισώματα που ελέγχθηκαν την 38^η – 40^η εβδομάδα κύησης στην περίπτωση αντι-c, με τίτλο 8 ο φαινότυπος Rhesus ήταν CC_{ee} για τη μητέρα και το νεογνό με το δεύτερο να εμφανίζει DAT(-), ΙΑΤ(+). Στην 1^η περίπτωση με αντίσωμα J_{ka} και τίτλο της μητέρας 16 το νεογνό είχε DAT(2+) & ΙΑΤ(-) και σε έλεγχο ερυθροκυτταρικού αντιγόνου προέκυψε ότι ήταν J_{ka}(+++). Στη 2^η περίπτωση με αντίσωμα J_{ka} και τίτλο της

μητέρας 4 το νεογνό είχε DAT(3+) & IAT(-) και το αντισώμα εκλούθηκε από τα ερυθρά του. Το νεογνό παρουσίασε ίκτερο 9,9mg/dl την 3^η μέρα της γέννησης. Το αντι-Jka συνήθως προκαλεί μόνο θετική DAT στο νεογνό και η θεραπεία, εάν είναι απαραίτητη σχεδόν πάντα περιορίζεται σε φωτοθεραπεία [96] η οποία όμως δεν χρειάστηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση. Στην 1^η περίπτωση αντι-M το νεογνό είχε DAT(-)& IAT(+) και σε προσδιορισμό ερυθροκυτταρικού αντιγόνου προέκυψε ότι ήταν M(-). Σε τιτλοποίηση που έγινε από τον ορό του βρέθηκε τίτλος ταυτόσημος με της μητέρας 32/32/8 με τις μεθόδους GMA1/GMA2/KMΣ αντίστοιχα. Στην 2^η περίπτωση μητέρας με αντι-M το νεογνό είχε DAT(-) & IAT(-). Οι 4 τιτλοποιήσεις που έγιναν (12^η – 35^η εβδομάδα) παρουσίασαν τίτλο 1. Δεν έχουμε πληροφορίες για τα νεογνά που γεννήθηκαν από μητέρες που είχαν αναπτύξει τα αντισώματα αντι-D:5, αντι-G:1, και αντι-E:1.

Τα αντισώματα που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη και αφορούν τον παράγοντα κύηση (αντι-D, αντι-G, αντι-c, αντι-E, αντι-Jka, αντι-M), είναι αντισώματα που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [177,190,191,324-327] απαντώνται συχνότερα (εκτός από το αντι-G) στον προγεννητικό έλεγχο εγκύων γυναικών.

Από τις 43 τιτλοποιήσεις το 83,7% αφορούσε τίτλους με τιμή έως 16, η οποία σύμφωνα με βιβλιογραφίες είναι η κρίσιμη τιμή που μπορεί να αποδοθεί στην ανάγκη για παρακολούθηση του εμβρύου με άλλες συμπληρωματικές μεθόδους για να διαπιστωθεί αν αναπτύσσει αναιμία [69,228], ενώ το 16,3% υπερέβαινε την τιμή αυτή.

Πίνακας 14. Τιτλοποιήσεις που αφορούν κύηση

A/A	ΑΝΤΙ ΣΩΜΑ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΚΥΗΣΗΣ	ΙΣΤΟΡΙΚΟ	ΟΜΑΔΑ ΜΗΤΕΡΑΣ	ΤΙΤΛΟΣ	ΟΜΑΔΑ ΝΕΟΓΝΟΥ	DAT	IAT	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ
1	ΑΝΤΙ D	37	13 ^η	4 τοκετοί	A(-)ccceK-	32	*	*	*	*
			18 ^η			16				
2		29	21	1 κύηση 1 αποβολή	O(-)ccceK-	8	A(+)	+	-	ΟΧΙ
			24 ^η			4				
			28 ^η			2				
3		31	12 ^η	ΑΦΜ με ερυθρά της μητέρας	A(-)ccceK-	1	A(+)	+	-	ΟΧΙ
			18 ^η			4				
			22 ^η			4				
			28 ^η			4				
			32 ^η			2				
			36 ^η			2				
			13 ^η			1	A(+)	+	-	ΟΧΙ
			18 ^η			1				
			22 ^η			2				
			35 ^η			2				
		33	33 ^η	Μετά από πλήρη δόση RhDIG την 33η εβδομάδα	O(-)ccceK-	8	A(+)	+	-	ΟΧΙ
			35 ^η			4				
			37 ^η			2				
			38 ^η			2				
5		32	38 ^η	κύηση	O(-)ccceK-	128	O(+)CceK-	+++	+	NAI
6		31	38 ^η	RhDIG	B(-)ccceK-	1	*	*	*	*
7		34	40 ^η	Κύηση	O(-)ccceK+	8	A(+)CceK-	-	-	ΟΧΙ
8		30	40 ^η	Κύηση	AB(-)ccceK-	256	A(+)ccEeK-	++++	+	NAI
9		1 HM		ΝΕΟΓΝΟ		32				
10		25	39 ^η	RhDIG	A(-)ccceK-	4	O(+)CceK-	-	-	ΟΧΙ
11		35	39 ^η	RhDIG	AB(-)CceK-	1	*	*	*	*
12		26	40 ^η	RhDIG	A(-)ccceK-	2	*	*	*	*
13		32	40 ^η	RhDIG	O(-)CceK-	2	O(+)CCeK-	-	-	ΟΧΙ
14		31	40 ^η	RhDIG	B(-)ccceK-	1	O(+CceK-)	-	-	ΟΧΙ
15		31	39 ^η	RhDIG	O(-)ccceK-	8	*	*	*	*
16	ΑΝΤΙ- c	35	40 ^η	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	O(+)CCeK-	8	A(+)CCeK-	-	+	ΟΧΙ

17	ANTI-G	33	12 ^η	Αυτόματη αποβολή & χορήγηση RhDIG προ εξαμήνου	O(-)CceeK-	4	*	*	*	*
			16 ^η			4				
			24 ^η			4				
18	ANTI-E	19	39 ^η	ΚΥΗΣΗ	O(+)CceeK-	32	*	*	*	*
19	ANTI-Jka	34	40 ^η	ΚΥΗΣΗ	B(+) CcEeK-	4	B(+) CceeK-	+++	-	OXI
20		21	40 ^η	ΚΥΗΣΗ	A(+) CcEeK-	16	A(+) CceeK-	++	-	OXI
21	ANTI-M	29	12 ^η	ΚΥΗΣΗ	A(+)CCeeK-	1	A(+)	-	-	OXI
			20 ^η			1				
			25 ^η			1				
			35 ^η			1				
22		31	39 ^η	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ + 6 ΑΜΒΛΩΣΕΙΣ	O(+)CcEeK-	32				
23		1 HM		ΝΕΟΓΝΟ		32				
							A(+) CceeK-	-	+	OXI

* Δεν υπάρχουν πληροφορίες για το νεογνό

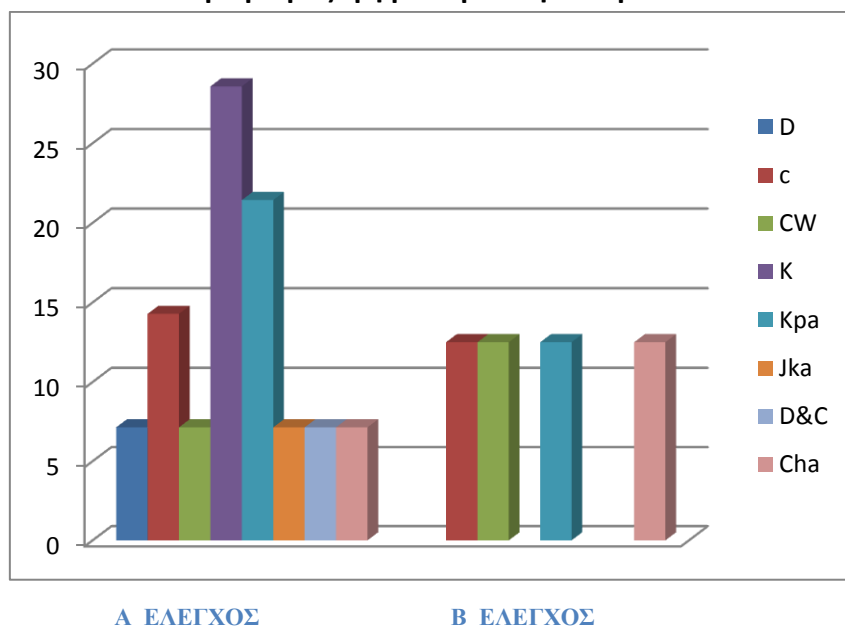
Στον πίνακα 14 αναφέρονται τα αντισώματα με τον υψηλότερο τίτλο εκ των τριών μεθόδων.

Με τις παρούσες τιμές του τίτλου της μητέρας τα νεογνά που γεννήθηκαν (αν και δεν έχουμε επαρκή εργαστηριακά δεδομένα) από όσο γνωρίζουμε στην πλειοψηφία τους παρουσίασαν ίκτερο με ήπια κλινική εικόνα, μερικά από αυτά υποβλήθηκαν σε φωτοθεραπεία και δύο νεογνά μεταγγίστηκαν.

2. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ Β ΟΜΟΖΥΓΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ

Έγιναν τιτλοποιήσεις σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με β ομόζυγη μεσογειακή αναιμία. Πρόκειται για 14 ασθενείς (5 άνδρες και 9 γυναίκες) που ανέπτυξαν τα εξής αντισώματα: (αντι-K:4, αντι-Kpa:3, αντι-Jka:1, αντι-c:2, αντι-Cw:1, αντι-Cha:1, αντι-D:1 και αντι-D&C:1). Από αυτούς έγινε επανέλεγχος στους 8 (αντι-K:2, αντι-Kpa:2, αντι-c:1, αντι-Cw:1, αντι-Jka:1, και αντι-Cha:1) στα πλαίσια ελέγχου για πιθανή επανέκθεση σε αντιγόνο έναντι του οποίου είχαν αναπτύξει αντίσωμα. Ο δεύτερος έλεγχος έγινε σε διάστημα 2,5 ετών από τον πρώτο. Η ευαισθητοποίηση αφορούσε τα αντιγονικά συστήματα Rh:35.71% (D:7.14%, D&C:7.14%, c:14.28%, CW:7.14%), Kell:50% (K:28.57%, Kpa:21.43%), Jka:7.14% και Cha:7.14%).

Γράφημα 2. Αντισώματα πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με β ομόζυγη μεσογειακή αναιμία



Πίνακας 15. Τίτλοποιήσεις σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με β ομόζυγη μεσογειακή αναιμία

Α/Α	ΦΥΛΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΟΜΑΔΑ	ΑΝΤΙΣΩΜΑ	Α' ΕΛΕΓΧΟΣ			Β' ΕΛΕΓΧΟΣ		
					GMA1	GMA2	CTT	GMA1	GMA2	CTT
1	Θ	42	A(+)-CcEeK-	Αντι-Kell	1	1	APN	APN	APN	APN
2	Θ	50	A(-)ccEeK-	Αντι-Kell	2	1	APN	APN	APN	APN
3	Θ	46	O(+)-CcEeK-	Αντι-Kpa	1	1	APN	APN	APN	APN
4	Θ	57	O(+)-CcEeK-	Αντι-Kpa	16	32	1	2	4	APN
5	Θ	38	AB(+)-CCeEeK-	Αντι-c	8	8	1	4	4	APN
6	Θ	43	B(+)-CcEeK-	Αντι-Cw	4	4	1	1	1	APN
7	Θ	58	O(-)ccEeK-	Αντι-Cha	128	128	16	128	128	16
8	A	40	B(+)-CcEeK-	Αντι-Jka	APN	1	APN	APN	APN	APN
9	A	46	A(+)-CcEeK-	Αντι-Kell	4	4	1	-	-	-
10	A	45	A(+)-CcEeK-	Αντι-Kell	1	APN	APN	-	-	-
11	Θ	39	O(+)-CcEeK-	Αντι-Kpa	4	8	2	-	-	-
12	A	41	A(+)-CCeEeK-	Αντι-c	32	128	32	-	-	-
13	Θ	50	O(-)ccEeK-	Αντι-D	64	16	16	-	-	-
14	A	38	O(-)ccEeK-	Αντι-D	APN	1	APN	-	-	-
				Αντι-C	1	1	APN	-	-	-

Παρατηρούμε αισθητή μείωση του τίτλου των αντισωμάτων (από 1 έως 4 τίτλους). Οι τίτλοι των αντισωμάτων που ήταν στον πρώτο έλεγχο 1 και 2, στο δεύτερο έλεγχο δεν ανιχνεύονται. Τη διαφορά κάνει το αντι-Cha στον έλεγχο του οποίου δεν

διαφοροποιήθηκαν καθόλου τα αποτελέσματα παρά την επανειλημμένη έκθεση του ασθενούς στο αντιγόνο έναντι του οποίου έχει αναπτύξει αντίσωμα. Το αντίσωμα Cha στη συγκεκριμένη πολυμεταγγιζόμενη ασθενή συνυπάρχει με τα αντι-D, αντι-C, και αντι-Kra επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι τα αντισώματα που ανήκουν στην ομάδα των HTLA συνυπάρχουν με άλλα αντισώματα [104-106,328].

Η χρονική διάρκεια που παραμένουν τα αντιερυθροκυτταρικά αλλοαντισώματα στην κυκλοφορία του δέκτη δεν μπορεί να προσδιοριστεί και εξαρτάται από τη φύση του αλλοαντισώματος [79].

Για τις δύο περιπτώσεις αντι-D στις οποίες δεν έγινε δεύτερος έλεγχος έχουμε τις εξής πληροφορίες: Η πρώτη περίπτωση με τίτλο 64 μας είναι γνωστό προ 10ετίας ότι έχει αναπτύξει αντι-D χωρίς να γνωρίζουμε πότε ακριβώς ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά. Άρχισε να μεταγγίζεται περιοδικά από τότε που ήταν ενός έτους, και τα τελευταία 29 χρόνια μεταγγίζεται περίπου μία φορά το μήνα.

Στη δεύτερη περίπτωση αντι-D με τίτλο 1 το αντίσωμα ταυτοποιήθηκε πριν 22 χρόνια και ανιχνεύεται ως σήμερα με τεχνική ΙΑΤ. Και στις δύο περιπτώσεις το αντίσωμα είναι ανιχνεύσιμο μετά από πολλά χρόνια όπως γνωρίζουμε με τις μέχρι τώρα μελέτες που έχουν γίνει [50,51].

Από τις 3 περιπτώσεις αντι-Kra σε 2/3 περιπτώσεις το αντίσωμα ταυτοποιήθηκε πριν 8 χρόνια αλλά μόνο στη μία περίπτωση ανιχνεύθηκε με το β' έλεγχο. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι υπήρχε μεγάλη διαφορά των αποτελεσμάτων όσον αφορά την τιτλοποίηση αντισώματος των δύο ασθενών (1/1/APN στην 1^η περίπτωση και 16/32/1 στη 2^η περίπτωση). Σε 1/3 περίπτωση αντι-Kra το αντίσωμα ταυτοποιήθηκε πριν 6 χρόνια, δεν έγινε επανέλεγχος αλλά το αντίσωμα ανιχνεύεται με ΙΑΤ μέχρι σήμερα.

Όσον αφορά τις 2/4 περιπτώσεις αντι-Kell το αντίσωμα ταυτοποιήθηκε πριν 11 χρόνια στην πρώτη και πριν 9 χρόνια στη δεύτερη και δεν ανιχνεύτηκε στην τιτλοποίηση με το β' έλεγχο, δηλαδή ήταν ανιχνεύσιμο για 9 χρόνια στην πρώτη και για 7 χρόνια στη δεύτερη περίπτωση. Στην 1/3 περίπτωση αντι-Kell το αντίσωμα ταυτοποιήθηκε πριν 7 χρόνια, δεν έγινε επανέλεγχος, αλλά το αντίσωμα ανιχνεύεται μέχρι σήμερα με διαδικασία ελέγχου ΙΑΤ.

Σε όλες τις περιπτώσεις αντι-Kell τα αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε διάστημα μεγαλύτερο των 5 ετών και τα αποτελέσματα συμφωνούν απόλυτα με τις έως τώρα βιβλιογραφικές αναφορές [79].

Η μοναδική περίπτωση αντι-Jka δεν ανιχνεύθηκε με το β έλεγχο τιτλοποίησης όπως ήταν αναμενόμενο στις περιπτώσεις που αφορούν το συγκεκριμένο αντίσωμα λόγω του ότι τα αντι-Jka & αντι-Jkb αντισώματα ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο σε ασθενείς που εξετάζονται σε διάστημα εντός 3 μηνών από την ευαισθητοποίηση για τα συγκεκριμένα αντιγόνα [79].

Στο δεύτερο έλεγχο οι 4 από τους 8(50%) ήταν αρνητικοί και με τις τρεις μεθόδους.

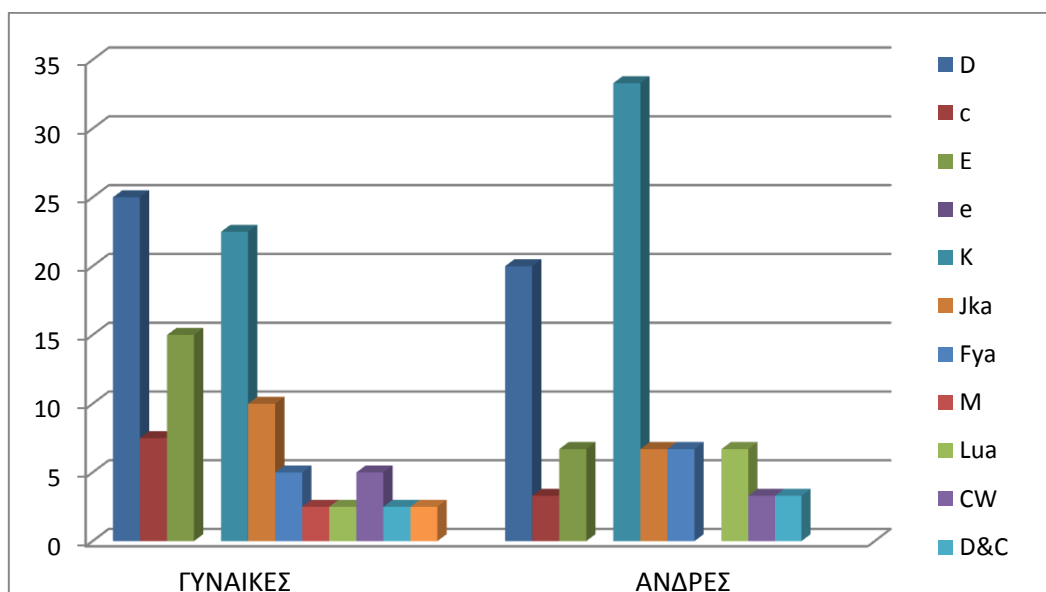
Τα αρνητικά αποτελέσματα (και με τις 3 μεθόδους) που προέκυψαν από το δεύτερο έλεγχο δεν συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

3. ΛΟΙΠΕΣ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Όλες οι υπόλοιπες τιτλοποιήσεις αφορούν παθολογικούς και χειρουργικούς ασθενείς όλων των ηλικιών που μπορεί να έχουν μεταγγιστεί στο παρελθόν μία ή και περισσότερες φορές και που ο έλεγχός τους έγινε για την εκπλήρωση αποκλειστικά του σκοπού της παρούσης εργασίας δηλαδή την σύγκριση των τριών μεθόδων τιτλοποίησης. Από τους 70 ασθενείς οι 40 είναι γυναίκες και οι 30 άνδρες. Για τις γυναίκες η ευαισθητοποίηση αφορούσε τα αντισώματα Rh:55% (D:25%, c:7.5%, E:15%, CW:5%, D&C:2.5%), Kell:22.5%, Jka:10%, Fya:5%, M:2.5%, Lua:2.5% και E&Fya:2.5%.

Για τους άνδρες η ευαισθητοποίηση αφορούσε τα αντισώματα Rh:40% (D:20%, c:3.3%, CW:3.3%, E:6.7%, e:3.3% D&C:3.3%), Kell:40% (K:33.3%, K&Kpa:6.7%), Jka:6.7%, Fya:6.7% και Lua:6.7%.

Γράφημα 3. Αντισώματα παθολογικών και χειρουργικών ασθενών



Από τις 40 γυναίκες οι 19 είναι παθολογικοί ασθενείς και οι 21 χειρουργικοί. 20/40 είχαν ιστορικό μετάγγισης (αντι-D:1, αντι-c:3, αντι-E:3, αντι-K:5, αντι-Jka:4, αντι-Fya:2, αντι-M:1, αντι-Lua:1), 10/40 είχαν ιστορικό κύησης (αντι-D:6, αντι-Cw:2, αντι-E:1, αντι-K:1) και 10/40 είχαν ιστορικό μετάγγισης και κύησης (αντι-D:3, αντι-E:2, αντι-K:3, αντι-D&C:1, αντι-E&Fya:1).

Παρατηρούμε ότι στις γυναίκες που είχαν ιστορικό κύησης τα αντισώματα αφορούσαν την ειδικότητα Rhesus και Kell, που είναι από τα συχνότερα αντισώματα που αναπτύσσονται στην κύηση [177,324,329-331].

Το ίδιο συνέβη και στις γυναίκες που είχαν ιστορικό μετάγγισης και κύησης συμπεριλαμβανομένου του μοναδικού αντι-E&Fya. Και στις δύο περιπτώσεις (ιστορικό κύησης & ιστορικό μετάγγισης + κύησης) υπερτερούσε αριθμητικά το αντι-D.

Από τους 30 άνδρες οι 19/30 είναι παθολογικοί ασθενείς και οι 11/30 χειρουργικοί και ανέπτυξαν τα εξής αντισώματα: αντι-D:6, αντι-c:1, αντι-Cw:1, αντι-E:2, αντι-e:1, αντι-K:10, αντι-Jka:2, αντι-Fya:2, αντι-Lua:2, αντι-D&C:1, και αντι-K&Kra:2.

Πίνακας 16. Τιτλοποιήσεις σε παθολογικούς και χειρουργικούς ασθενείς

A/A	ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΦΥΛΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ABO RH-KELL	ΙΣΤΟΡΙΚΟ	GMA1	GMA2	CTT
1	ANTI-D	Θ	31	ΟΡΘ/ΚΗ	ΚΑΤΑΓΜΑ ΙΣΧΙΟΥ	B - ccee K-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	1	APN
2		A	64	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΟΣΧΕΟΒΟΥΒΟΝΟΚΛΗ	A - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	4	1
3		Θ	85	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	O - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΕΙΣ	2	2	APN
4		Θ	72	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΧΟΛΟΚΥΣΤΙΤΙΔΑ	O - cceeK-	ΚΥΗΣΕΙΣ	16	32	APN
5		A	87	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΙΣΧΙΟΥ	A - ccee K-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	8	16	1
6		A	64	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	O - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	16	32	4
7		Θ	82	ΟΡΘ/ΚΗ	ΟΛΙΚΗ ΑΡΘ/ΣΤΙΚΗ ΑΡΘ/ΣΤΙΚΗ	O - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΗ	1	1	APN
8		Θ	74	ΓΥΝ/ΚΗ	ΠΡΟΠΤΩΣΗ ΜΗΤΡΑΣ	O - cceeK-	ΚΥΗΣΕΙΣ	64	64	16
9		Θ	81	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΙΣΧΙΟΥ	O - cceeK-	ΚΥΗΣΗ	1	4	APN
10		A	84	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΙΜΑΤΟΥΡΙΑ	B - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	1	APN
11		A	63	ΠΑΘ/ΚΗ	ΚΙΡ.ΗΠΑΤΟΣ	O - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	8	1
12		Θ	83	ΠΑΘ/ΚΗ	ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ	B - cceeK-	ΚΥΗΣΕΙΣ	2	2	1
13		A	67	ΠΑΘ/ΚΗ	ΠΑΡΑΤΑΣΗ ΧΡ. ΠΝΕΥΜ	O - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1024	1024	256
14		Θ	83	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΙΣΧΙΟΥ	A - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΗ	8	8	4
15		Θ	86	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A - CceeK-	ΚΥΗΣΕΙΣ	4	2	APN

Μελέτη αλλοανοσοποίησης ασθενών από μετάγγιση και κύηση

16		Θ	73	ΟΡΘ/ΚΗ	ΑΡΘΡ. ΙΣΧΙΟΥ	A - cceeK-	ΚΥΗΣΕΙΣ	4	4	1
17	ANTI-c	Θ	65	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	O + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	8	8	1
18		Θ	76	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	2	APN
19		Θ	58	ΚΑΡΔ/ΚΗ	Χ.Ν.Α.	O + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	64	64	8
20		A	80	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	16	8	4
21	ANTI-Cw	A	66	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΧΟΛΟΛΙΘΙΑΣΗ	A+ ccEEK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	APN	2	APN
22		Θ	92	ΠΝΕΥ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A+ CceeK-	ΚΥΗΣΗ	1	1	APN
23		Θ	30	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΟΞΕΙΑ ΧΟΛΟΚ/ΤΙΔΑ	A+ CCeeK-	ΚΥΗΣΗ	APN	1	APN
24	ANTI-E	A	58	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A+ Ccee K-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	16	16	8
25		Θ	82	ΟΥΡ/ΚΗ	ΑΙΜΑΤΟΥΡΙΑ	A+ CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	APN	4	APN
26		Θ	80	ΚΑΡΔ/ΚΗ	ΟΕΜ	B+ CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	16	16	4
27		Θ	65	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	B+ CCeeK-	ΚΥΗΣΕΙΣ	4	4	2
28		Θ	83	ΠΑΘ/ΚΗ	ΠΑΡΑΤΑΣΗ ΧΡ.ΠΗΞΗΣ	B+ CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	8	8	4
29		A	75	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΒΟΥΒΟΝΟΚΗΛΗ	A+ CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	2	2	APN
30		Θ	89	ΟΡΘ/ΚΗ	ΟΛΙΚΗ ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗ	A+ CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΗ	1	1	APN
31		Θ	96	ΟΥΡ/ΚΗ	CA ΚΥΣΤΕΩΣ	A+CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΗ	2	2	APN
32	ANTI-e	A	81	ΟΥΡ/ΚΗ	ΚΥΣΤΕΟΚΗΛΗ	O + ccEEK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	128	128	16
33	ANTI-K	A	58	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΠΤΩΣΗ ΕΞ ΥΨΟΥΣ	A + CcEeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	8	1
34		A	86	ΠΑΘ/ΚΗ	CA	A - cceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	8	4
35		Θ	85	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΗ	2	2	1
36		A	85	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	4	APN
37		A	79	N/Φ	Χ.Ν.Α.	O + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	8	16	2
38		Θ	78	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΧΟΛΟΛΙΘΙΑΣΗ	O + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	2	APN
39		Θ	89	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΠΟΛΥΠΟΔΑΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	O + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΗ	1	1	APN
40		A	92	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΙΣΧΙΟΥ	O + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	2	4	1
41		Θ	45	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΧΟΛΟΛΙΘΙΑΣΗ	O + CceeK-	ΚΥΗΣΗ	1	2	APN
42		Θ	59	N/Φ	Χ.Ν.Α.	O + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	2	2	APN
43		A	87	N/Φ	ΧΝΑ/ΕΙΛΕΟΣ	O + CcEeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	16	16	16
44		A	69	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	4	4
45		Θ	66	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	O + CcEeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	1	APN
46		Θ	73	N/Φ	Χ.Ν.Α.	O + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	4	2
47		Θ	92	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	4	APN
48		Θ	55	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΕΚΟΛΠΩΜΑ ZENKER	A + CcEeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΚΥΗΣΗ	2	4	2
49		A	91	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	APN	1	APN
50		A	87	N/Φ	Χ.Ν.Α.	A + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	8	1
51		A	87	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	O + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	2	APN
52	ANTI- Jka	Θ	72	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΚΟΤΥΛΗΣ	A + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	128	256	32
53		Θ	53	ΠΑΘ/ΚΗ	ΕΝΤΕΡ/ΡΑΓΙΑ	A + CcEeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	16	1
54		A	86	ΜΑΦ	ΠΟΛΥΤΡΑΥΜΑΤΙΑΣ	A + CCeeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	8	16	2
55		Θ	72	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΙΣΧΙΟΥ	A + CceeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	64	64	16
56		Θ	85	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΙΣΧΙΟΥ	A + Cceek+	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	2	2	APN
57		A	63	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	A + ccEeK-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	8	16	APN

58	ANTI-Fya	A	80	ΠΑΘ/ΚΗ	Β.ΑΝΑΙΜΙΑ	O - cceek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	2	2	APN
59		A	40	Μ.Τ.Ν.	Χ.Ν.Α.	A + Cceek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	8	2
60		Θ	45	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	B + ccEek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	512	512	64
61		Θ	74	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΧΟΛΟΛΙΘΙΑΣΗ	O + Cceek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	2	4	APN
62	ANTI-M	Θ	67	ΜΕΘ	ΧΝΑ	O +CCeek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	2	2	APN
63	ANTI-Lua	Θ	76	ΟΡΘ/ΚΗ	# ΙΣΧΙΟΥ	O +CCeek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	APN	1	APN
64		A	59	ΠΑΘ/ΚΗ	CA ΠΝΕΥΜΟΝΑ	A + CCeek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	1	APN
65		A	80	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΧΟΛΟΛΙΘΙΑΣΗ	A + CCeek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	1	APN
66	ANTI-D	A	79	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	B - cceek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	512	512	256
	ANTI-C							256	128	8
67	ANTI-D	Θ	62	ΠΑΘ/ΚΗ	MDS	O - cceek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	64	32	8
	ANTI-C						ΚΥΗΣΗ	128	128	32
68	ANTI-K	A	65	ΜΑΦ	A.E.E.	O +CcEek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	1	1	APN
	ANTI-Kpa				ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ			1	1	APN
69	ANTI-K	A	80	ΧΕΙΡ/ΚΗ	ΔΥΣΚΑΤΑΠΟΣΙΑ	O - cceek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	4	4	4
	ANTI-Kpa							64	64	8
70	ANTI-E	Θ	74	ΠΑΘ/ΚΗ	ΑΝΑΙΜΙΑ	B +CCeek-	ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ	32	32	8
	ANTI-Fya						ΚΥΗΣΗ	8	8	2

Στις περιπτώσεις αντι-C, το αντι-C συνυπήρχε με το αντι-D όπως πολύ συχνά συμβαίνει σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές [35]. Επίσης σε 2 περιπτώσεις το αντι-Kpa συνυπήρχε με αντι-K.

Πίνακας 17. Οι υψηλότεροι τίτλοι που παρατηρήθηκαν για κάθε αντίσωμα και με τις τρεις μεθόδους στο σύνολο της μελέτης.

Υψηλότεροι τίτλοι

Αντίσωμα	Τίτλοι	GMA 1	GMA 2	CTT
Αντι-D	50	1024	1024	256
Αντι-C	3	256	128	32
Αντι-c	8	64	128	32
Αντι-Cw	5	4	4	1
Αντι-E	10	32	32	16
Αντι-G	3	4	8	2
Αντι-e	1	128	128	16
Αντι-Kell	25	16	16	16
Αντι-Kpa	6	64	64	8
Αντι-Jka	9	128	256	32
Αντι-Fya	5	512	512	64
Αντι-M	7	32	32	8
Αντι-Lua	3	1	1	APN

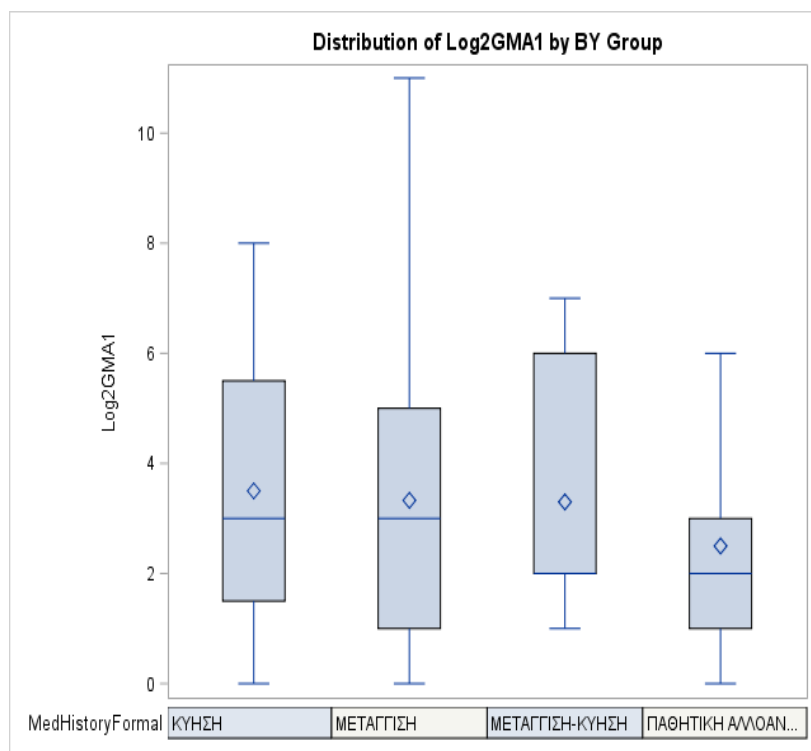
Αντι-Cha	2	128	128	16
<u>Σύνολο</u>	<u>Σύνολο</u>			
107	137			

4. ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

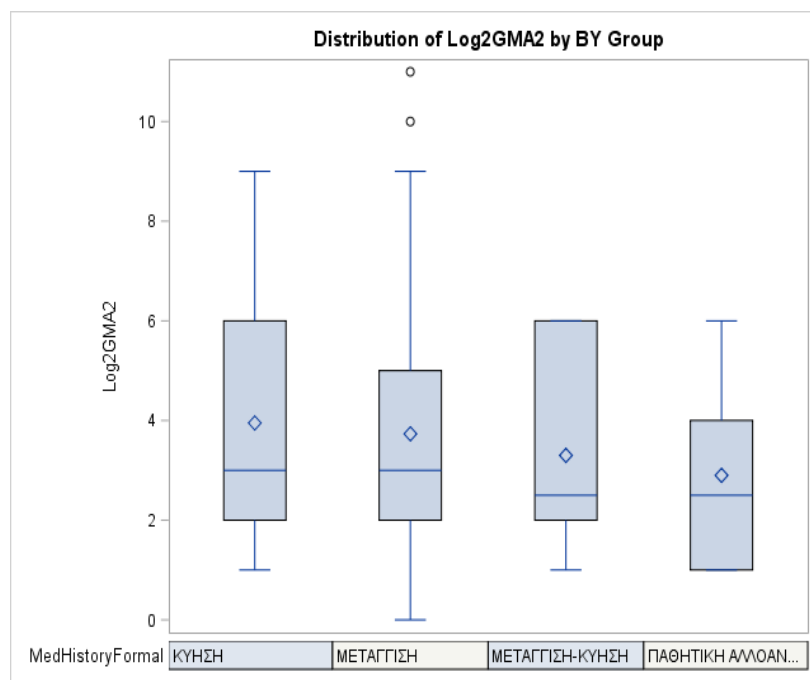
Συνολικά 137 δείγματα ορού από 107 αλλοανοσοποιημένους ασθενείς εξετάστηκαν στη μελέτη μας. Σε αυτό το σύνολο η αλλοανοσοποίηση προέκυψε από προηγούμενη μετάγγιση (67/107, 62.62%), από προηγούμενη κύηση (20/107, 18.69%), συνδυασμός των δύο (10/107, 9.35%) και από παθητική αλλοανοσοποίηση (10/107, 9.35%).

Στα γραφήματα 4,5,6 φαίνεται η σύγκριση GMA1, GMA2 ΚΑΙ CTT (ΚΜΣ) με βάση το ιατρικό ιστορικό και στον πίνακα 18 φαίνεται η κατανομή των ασθενών σε σχέση με το ιστορικό τους.

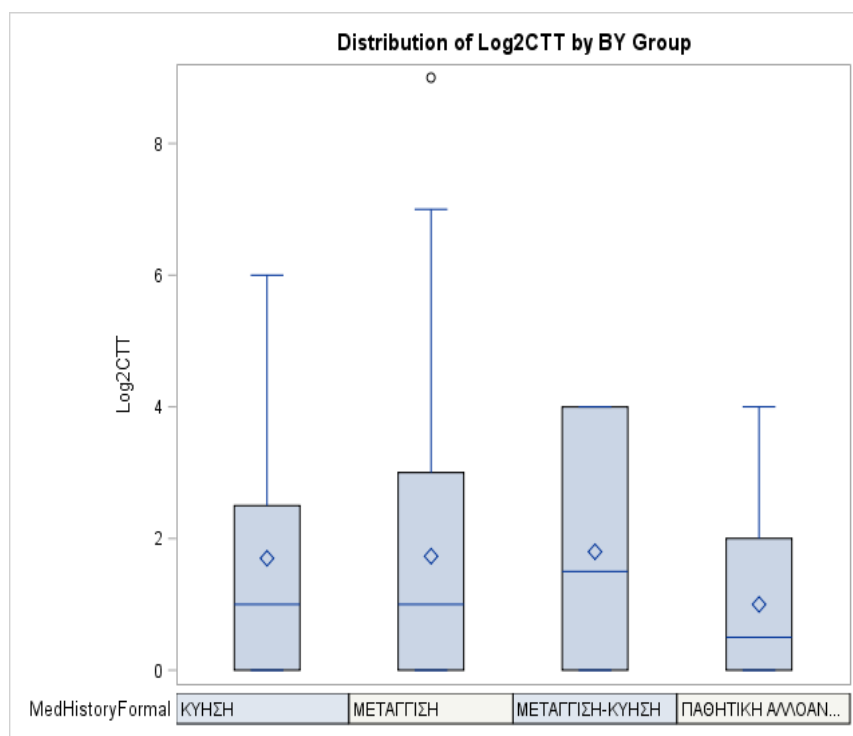
Γράφημα 4. Κατανομή της μεθόδου GMA1 με βάση το ιατρικό ιστορικό



Γράφημα 5. Κατανομή της μεθόδου GMA2 με βάση το ιατρικό ιστορικό



Γράφημα 6. Κατανομή της μεθόδου CTT με βάση το ιατρικό ιστορικό



Πίνακας 18. Η κατανομή των ασθενών σε σχέση με το ιστορικό τους

Disease	Gender		Total	Disease	Gender		Total
	F	M			F	M	
CA		1	1	ΕΠΙΤΟΚΟΣ	7		7
CA ΚΥΣΤΕΩΣ	1		1	ΚΑΤΑΓΜΑ	7	2	9
CA ΠΝΕΥΜΟΝΑ		1	1	ΚΙ. ΗΠΑΤΟΣ		1	1
MDS	1		1	ΚΥΗΣΗ	14		14
ΑΓΝΩΣΤΟ	1		1	ΚΥΣΤΕΟΚΗΛΗ		1	1
ΑΕΕ ΠΝΕΥΜΟΝΑ		1	1	ΟΕΜ	1		1
ΑΙΜΑΤΟΥΡΙΑ	1	1	2	ΟΛΙΚΗ ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗ	1		1
ΑΝΑΙΜΙΑ	10	9	19	ΟΣΧΕΟΒΟΥΒΟΝΟΚΗΛΗ		1	1
ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗ	2		2	ΠΑΡΑΤΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ		1	1
ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ RHESUS	1		1	ΠΑΡΑΤΑΣΗ ΧΡ. ΠΗΞΗΣ	1		1
B. ΑΝΑΙΜΙΑ		1	1	ΠΟΛΥΠΟΔΑΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	1		1
B.OM. ΜΕΣ. ΑΝΑΙΜΙΑ	9	5	14	ΠΟΛΥΤΡΑΥΜΑΤΙΑΣ		1	1
ΒΟΥΒΟΝΟΚΗΛΗ		1	1	ΠΡΟΠΤΩΣΗ ΜΗΤΡΑΣ	1		1
ΔΥΣΚΑΤΑΠΟΣΙΑ		1	1	ΠΤΩΣΗ ΕΞ ΥΨΟΥΣ		1	1
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΟΣΧΑΙΜΙΑ	1		1	ΧΝΑ	4	4	8
ΕΓΚΟΛΠΩΜΑ ZENKER	1		1	ΧΟΛΟΚΥΣΤΙΤΙΔΑ	2		2
ΕΜΠΥΡΕΤΟ ΑΝΑΙΜΙΑ	1		1	ΧΟΛΟΛΙΘΙΑΣΗ	3	2	5
ENTER/ΡΑΓΙΑ	1		1	Total	72	35	107

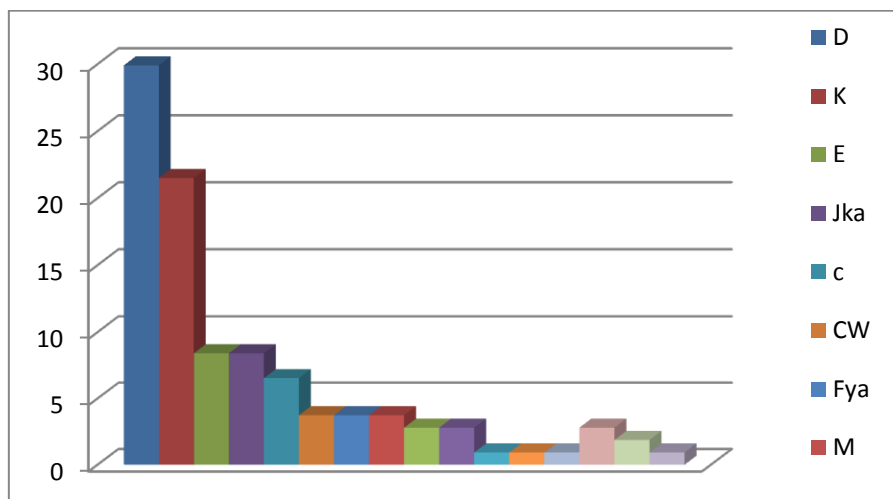
Από τους 107 ασθενείς, 21/107 (19.62%) ήταν έγκυες ή είχαν νεογέννητα παιδιά. Οι δοκιμασίες τιτλοποίησης 41/137 (29.93%) αφορούσαν τη συγκεκριμένη ομάδα εγκύων γυναικών (η συγκεκριμένη ομάδα ασθενών περιλαμβάνει περιπτώσεις παθητικής αλλοανοσοποίησης που αφορούσε το αντι-D σε 10 περιπτώσεις εγκύων γυναικών, και αντιστοιχούσαν σε 12 περιπτώσεις τιτλοποίησης).

Σε 91 ασθενείς ελέγχθηκε ένα δείγμα ορού: αντι-D (28), αντι-Kell (23), αντι-E (9), αντι-c (6), αντι-Jka (9), αντι-Kra (2), αντι-Fya (4), αντι-M (3), αντι-Cw (3), αντι-Lua (3), αντι-e (1). Πολλά δείγματα εγκύων γυναικών εξετάστηκαν σε διαφορετική χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή υπήρξαν τιτλοποιήσεις που διεξήχθησαν για περισσότερα από ένα αλλοαντισώματα στον ίδιο ασθενή. Ειδικότερα σε 5 ασθενείς εξετάστηκαν 2 δείγματα: αντι-D (1), αντι-c (1), αντι-Cha (1), αντι-Cw(1), αντι-Kra(1), σε 2 ασθενείς εξετάστηκαν 3 δείγματα (αντι-D, αντι -G), σε 2 ασθενείς 4 δείγματα (αντι-D, αντι-M) και σε 1 ασθενή 10 δείγματα (αντι-D). Σε 6 ασθενείς έγιναν τιτλοποιήσεις σε δύο διαφορετικά αντισώματα αντι-D & C (3), αντι-Kell & Kra (2), αντι-E & Fya (1).

Οι ειδικότητες αντισωμάτων κατανέμονται ως εξής αντι-D: 32/107 (29.91%) ασθενείς, αντι-Kell: 23/107 (21.50%), αντι-E: 9/107 (8.41%), αντι-Jka: 9/ 107 (8.41%), αντι-c: 7/107 (6.54%), αντι-Cw: 4/107 (3.74%), αντι-Fya: 4/107 (3.74%), αντι-M: 4/107(3.74%), αντι-Kra: 3/107

(2.80%), αντι-Lua: 3/107 (2.80%), αντι-e: 1/107(0.93%) αντι-G: 1/107 (0.93%), αντι-Cha: 1/107 (0.93%), ενώ 6/107 (5.61%) ασθενείς είχαν διπλή αλλοανοσοποίηση, αντι-C & αντι-D: 3/107 (2.80%), αντι-Kell & αντι-Kpa: 2/107 (1.87%), αντι-E & αντι-Fya: 1/107 (0.93%). (Πίνακας 19)

Γράφημα 7. Κατανομή των ειδικοτήτων των αντισωμάτων (συνολικά)



Πίνακας 19. Κατανομή των ασθενών ανάλογα με τον τύπο αλλοανοσοποίησης

Antibody	Number of patients	Percentage	Number of Antibodies counted
Anti-C	No case with only Anti-C was in the study see (Anti-C & Anti-D)	NA	NA
Anti-c	7	6.54%	8
Anti-Cw	4	3.74%	5
Anti-D	32	29.91%	47
Anti-E	9	8.41%	9
Anti-e	1	0.93%	1
Anti-Cha	1	0.93%	2
Anti-Fya	4	3.74%	4
Anti-Jka	9	8.41%	9
Anti-G	1	0.93%	3
Anti-KELL	23	21.50%	23
Anti-Kpa	3	2.80%	4
Anti-Lua	3	2.80%	3
Anti-M	4	3.74%	7
Anti-C & Anti-D	3	2.80%	3 Anti-C and 3

			Anti-D
Anti-E & Anti-Fya	1	0.93%	1 Anti-E and 1 Anti-Fya
Anti-KELL & Anti-Kpa	2	1.87%	2 Anti-KELL and 2 Anti-Kpa
Total	107	100.00%	137

Όσον αφορά τη σύγκριση της μεθόδου τιτλοποίησης CTT vs GMA1 (με Diamed), διαπιστώθηκε ότι οι τίτλοι ήταν ταυτόσημοι σε 18 περιπτώσεις (13.14%) και με τις δύο μεθόδους, σε 118 περιπτώσεις (86.13%) ήταν υψηλότερες με GMA1, (διαφορά 1 τίτλου σε 48 περιπτώσεις, 2 τίτλων σε 45, 3 τίτλων σε 17, 4 τίτλων σε 6, 5 τίτλων σε 2) και σε 1 περίπτωση (0.73%) ήταν χαμηλότερη (κατά ένα τίτλο) με GMA1 όπως απεικονίζεται στον πίνακα 20α. Η συσχέτιση των τιτλοποιήσεων με CTT έναντι GMA1 που αφορά την ειδικότητα του αντισώματος παρουσιάζεται στον πίνακα 20β. Η τεχνική CTT σε σύγκριση με τη GMA1 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Kendal έδειξε καλή / ικανοποιητική συμφωνία $W = 0.91$, $p < 0.0001$.

Πίνακας 20α. Τιτλοποίηση αντισώματος με CTT vs GMA1 (Diamed)

CTT	GMA1												Total
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
0	10	31	18	6	3	1							69
1		2	5	10	3	2							22
2			1	7	3	1	1						13
4				1	3	2	3						9
8						1	3	3		1			8
16							1	1	3	3			8
32								1		4			5
64											1		1
128													0
256												1	2
Total	10	33	25	26	11	9	6	6	7	1	2	1	137

Πίνακας 20β. Συσχέτιση αποτελεσμάτων με CTT vs GMA1 (Diamed) με βάση την ειδικότητα αντισώματος.

Antibody	Number (% of total titrations)	Identical (% for antibody)	Higher by CTT (% for antibody)	Higher by GMA1 (% for antibody)	Mean difference in titers (GMA1-CTT)*	Mean absolute difference in titers (GMA1-CTT)**
Anti-D	50 (36.5)	4 (8)	0 (0)	46 (92)	1.80	1.80
Anti-KELL	25 (18.25)	6 (24)	0 (0)	19 (76)	1.16	1.16
Anti-E	10 (7.3)	1 (10)	0 (0)	9 (90)	1.30	1.30
Anti-Jka	9 (6.57)	1 (11.11)	1 (11.11)	7 (77.78)	1.67	1.89
Anti-c	8 (5.84)	1 (12.5)	0 (0)	7 (87.5)	2.00	2.00
Anti-M	7 (5.11)	2 (28.57)	0 (0)	5 (71.43)	1.14	1.14
Anti-Kpa	6 (4.38)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	2.00	2.00
Anti-Cw	5 (3.65)	2 (40)	0 (0)	3 (60)	0.80	0.80
Anti-Fya	5 (3.65)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	2.00	2.00
Anti-C	3 (2.19)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	2.67	2.67
Anti-G	3 (2.19)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	2.00	2.00
Anti-Lua	3 (2.19)	1 (33.33)	0 (0)	2 (66.67)	0.67	0.67
Anti-Cha	2 (1.46)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	3.00	3.00
Anti-e	1 (0.73)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	3.00	3.00
Total	137	18 (13.14)	1 (0.73)	118 (86.13)	1.62	1.64

*Εκφράζεται σε λογαριθμική κλίμακα στη βάση 2 + 1. Οι αρνητικές τιτλοποιήσεις αποδόθηκαν στον αριθμό 0.

** Εκφράζεται από την απόλυτη τιμή της λογαριθμικής κλίμακας στη βάση 2 + 1. Οι αρνητικές τιτλοποιήσεις αποδίδονται στον αριθμό 0.

Όσον αφορά τη μέθοδο CTT vs GMA2 (με Griffols), οι τίτλοι ήταν ταυτόσημοι σε 10 περιπτώσεις (7.3%), σε 127 περιπτώσεις (92.7%) υψηλότερες με GMA2 (διαφορά 1 τίτλου σε 45 περιπτώσεις, 2 τίτλων σε 44, 3 τίτλων σε 27, 4 τίτλων σε 8, 5 τίτλων σε 2 και 6 τίτλων σε 1) ενώ δεν υπήρχε καμία περίπτωση τιτλοποίησης υψηλότερη με τη μέθοδο CTT όπως φαίνεται στον πίνακα 21α. Η συσχέτιση των τιτλοποιήσεων μεταξύ CTT και GMA2 που αφορά την ειδικότητα του αντισώματος παρουσιάζεται στον πίνακα 21β. Η σύγκριση των τεχνικών CTT και GMA2 με τη μέθοδο του Kendal έδειξε και πάλι μια καλή/ ικανοποιητική συμφωνία $W = 0.92$, ($p < 0.0001$).

Πίνακας 21α. Τιτλοποίηση αντισώματος με CTT vs GMA2 (Grifols)

CTT	GMA2												Total
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
0	5	32	18	11	1	1	1						69
1			3	9	5	4	1						22
2				3	6	2	2						13
4				3	4	1	1						9
8						1	4	2	1				8
16						2	1	2	3				8
32									3	2			5
64											1		1
128													0
256											1	1	2
Total	5	32	21	26	16	11	10	4	7	2	2	1	137

Πίνακας 21β. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων με CTT vs GMA2 (Grifols) με βάση την ειδικότητα αντισώματος

Antibody	Number (% of total titrations)	Identical (% for antibody)	Higher by CTT (% for antibody)	Higher by GMA2 (% for antibody)	Mean difference in titers (GMA2- CTT)*	Mean absolute difference in titers (GMA2- CTT)**
Anti-D	50 (36.5)	5 (10)	0 (0)	45 (90)	1.92	1.92
Anti-KELL	25 (18.25)	4 (16)	0 (0)	21 (84)	1.48	1.48
Anti-E	10 (7.3)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	1.60	1.60
Anti-Jka	9 (6.57)	1 (11.11)	0 (0)	8 (88.89)	2.67	2.67
Anti-c	8 (5.84)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	2.38	2.38
Anti-M	7 (5.11)	0 (0)	0 (0)	7 (100)	1.43	1.43
Anti-Kpa	6 (4.38)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	2.50	2.50
Anti-Cw	5 (3.65)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	1.40	1.40
Anti-Fya	5 (3.65)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	2.40	2.40
Anti-C	3 (2.19)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	2.33	2.33
Anti-G	3 (2.19)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	2.33	2.33
Anti-Lua	3 (2.19)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	1.00	1.00
Anti-Cha	2 (1.46)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	3.00	3.00
Anti-e	1 (0.73)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	3.00	3.00
Total	137	10 (7.3)	0 (0)	127 (92.7)	1.91	1.91

* Εκφράζεται σε λογαριθμική κλίμακα στη βάση 2 + 1. Οι αρνητικές τιτλοποιήσεις αποδόθηκαν στον αριθμό 0.

** Εκφράζεται από την απόλυτη τιμή της λογαριθμικής κλίμακας στη βάση 2 + 1. Οι αρνητικές τιτλοποιήσεις αποδίδονται στον αριθμό 0.

Κατά τη σύγκριση των δύο μεθόδων τιτλοποίησης με μικροστήλες γέλης (GMA1 vs GMA2) διαπιστώθηκε ότι οι τίτλοι ήταν ταυτόσημοι σε 73 περιπτώσεις (53.28%), σε 49 περιπτώσεις (35.77%) ήταν υψηλότερες με την GMA2 (διαφορά 1 τίτλου σε 40 περιπτώσεις, 2 τίτλων σε 8, και 3 τίτλων σε 1) και σε 15 περιπτώσεις (10.95%) ήταν υψηλότερη με τη GMA1, (διαφορά 1 τίτλου σε 12 περιπτώσεις, 2 τίτλων σε 2 και 3 τίτλων σε 1) Πίνακας 22α. Η συσχέτιση των τιτλοποιήσεων με GMA1 έναντι GMA2 που αφορά την ειδικότητα του αντισώματος παρουσιάζεται στον πίνακα 22β. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο διαφορετικές τεχνικές μικροστηλών (GMA1 και GMA2) είχαν σχεδόν τέλεια συμφωνία με $W = 0.95$, $p < 0.0001$.

Πίνακας 22α. Τιτλοποίηση αντισώματος με GMA1 (Diamed) vs GMA2 (Grifols)

GMA1	GMA 2												Total
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
0		8	1	1									10
1	3	20	6	4									33
2	1	4	13	7									25
4	1		1	13	9	2							26
8				1	6	4							11
16					1	4	4						9
32							5		1				6
64						1	1	4					6
128									5	2			7
256									1				1
512											2		2
1024												1	1
Total	5	32	21	26	16	11	10	4	7	2	2	1	137

Πίνακας 22β. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων GMA1 (Diamed) vs GMA2 (Grifols) με βάση την ειδικότητα αντισώματος

Antibody	Number (% of total titrations)	Identical (% for antibody)	Higher by GMA1 (% for antibody)	Higher by GMA2 (% for antibody)	Mean difference in titers (GMA1-GMA2)*	Mean absolute difference in titers (GMA1-GMA2)**
Anti-D	50 (36.5)	22 (44)	11 (22)	17 (34)	-0.12	0.72
Anti-KELL	25 (18.25)	13 (52)	2 (8)	10 (40)	-0.32	0.48
Anti-E	10 (7.3)	9 (90)	0 (0)	1 (10)	-0.30	0.30
Anti-Jka	9 (6.57)	2 (22.22)	0 (0)	7 (77.78)	-1.00	1.00
Anti-c	8 (5.84)	4 (50)	1 (12.5)	3 (37.5)	-0.38	0.63
Anti-M	7 (5.11)	5 (71.43)	0 (0)	2 (28.57)	-0.29	0.29
Anti-Kpa	6 (4.38)	3 (50)	0 (0)	3 (50)	-0.50	0.50
Anti-Cw	5 (3.65)	3 (60)	0 (0)	2 (40)	-0.60	0.60
Anti-Fya	5 (3.65)	3 (60)	0 (0)	2 (40)	-0.40	0.40
Anti-C	3 (2.19)	2 (66.67)	1 (33.33)	0 (0)	0.33	0.33
Anti-G	3 (2.19)	2 (66.67)	0 (0)	1 (33.33)	-0.33	0.33
Anti-Lua	3 (2.19)	2 (66.67)	0 (0)	1 (33.33)	-0.33	0.33
Anti-Cha	2 (1.46)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0.00	0.00
Anti-e	1 (0.73)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0.00	0.00
Total	137	73 (53.28)	15 (10.95)	49 (35.77)	-0.29	0.57

* Εκφράζεται σε λογαριθμική κλίμακα στη βάση 2 + 1. Οι αρνητικές τιτλοποιήσεις αποδόθηκαν στον αριθμό 0.

** Εκφράζεται από την απόλυτη τιμή της λογαριθμικής κλίμακας στη βάση 2 + 1. Οι αρνητικές τιτλοποιήσεις αποδίδονται στον αριθμό 0.

Συνολικά, η σύγκριση των τριών μεθόδων έδειξε μια καλή συμφωνία ($W = 0.90$ $p < 0.0001$) σύμφωνα με τη μέθοδο του Kendal.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τιτλοποίηση των ABO ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων είναι μια μέθοδος που έχει καθιερωθεί και γίνεται σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης ABO ασύμβατων συμπαγών οργάνων και αιμοποιητικών κυττάρων [332]. Η τιτλοποίηση του RhD και άλλων κλινικά σημαντικών αντισωμάτων έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της αλλοανοσοποίησης της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και το χρονικό προσδιορισμό για την αξιολόγηση της εμβρυϊκής αναιμίας με μη ορολογικά μέσα. Παραδοσιακά, η κλασική μέθοδος σωληναρίου χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό σε δοκιμασίες συγκόλλησης ερυθροκυττάρων λόγω της απλότητάς της [333]. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν εφαρμοστεί νέες μέθοδοι αυτοματοποιημένου ή ημι-αυτοματοποιημένου ελέγχου ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων με τη χρήση καρτών γέλης. Η μέθοδος είναι λιγότερο χρονοβόρα, χρησιμοποιεί μικρότερους όγκους ορού και RBC και είναι πιο ποιοτική για τη βαθμολόγηση της αντοχής της αντίδρασης συγκόλλησης [332]. Έχει αποδειχθεί ότι είναι αξιόπιστη και υψηλής ακρίβειας με ευαισθησία > 97,58% και ειδικότητα > 99,93% στην ταυτοποίηση αντισωμάτων [334-336]. Παρομοίως, ενισχύει την ταυτοποίηση αντισωμάτων και η τεχνική έχει βρεθεί ότι είναι πιο αξιόπιστη από την δοκιμασία σε σωληνάριο με προσθήκη διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος (LISS) σε δοκιμασία έμμεσης coombs (IAT) (σωληνάριο LISS-IAT) για την ανίχνευση κλινικά σημαντικών αλλοαντισωμάτων των ερυθρών αιμοσφαιρίων [336,337].

Αν και οι αναφερόμενες τιμές τιτλοποίησης ABO αντισωμάτων υποδηλώνουν ότι οι τίτλοι αντισωμάτων με GMA θα ωφελήσουν κλινικά τη διαχείριση ασθενών με ασύμβατο ABO σε μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων [338], τα δεδομένα σχετικά με τη μεθοδολογία μικροστηλών γέλης στην αξιολόγηση της τιτλοποίησης αντισωμάτων (για RhD και άλλα μη-ABO αντισώματα) είναι περιορισμένα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα επίπεδα τιτλοποίησης αξιολογούνται συχνά σύμφωνα με τα κρίσιμα επίπεδα αντισωμάτων και ότι τα κρίσιμα επίπεδα αντισωμάτων είχαν αρχικά καθοριστεί με βάση τη δοκιμασία της κλασικής μεθόδου σωληναρίου, είναι επί του παρόντος δύσκολο να προσδιοριστεί κατά πόσον αυτά τα κρίσιμα επίπεδα μπορούν να εφαρμοστούν σε τίτλους προσδιορισμένους με μέθοδο μικροστηλών γέλης.

Αυτή η μελέτη συνέκρινε τιτλοποιήσεις με τρεις μεθόδους: την κλασική μέθοδο τιτλοποίησης σε σωληνάριο (CTT) και τις μεθόδους μικροστηλών γέλης (GMA) από δύο διαφορετικούς κατασκευαστές (GMA1-DiaMed και GMA2-Grifols) για τιτλοποίηση αλλοαντισώματος RBC.

Κατά τη σύγκριση των μεθόδων CTT και GMA1 (DiaMed), διαπιστώσαμε ότι οι περισσότερες περιπτώσεις (86.13%) ήταν υψηλότερες με GMA1, ωστόσο οι περισσότερες διαφορές ήταν υψηλότερες κατά μία αραιώση 41.18% ή δύο αραιώσεις 37.82%, παρουσιάζοντας πολύ καλή συμφωνία $W = 0.91$, $p < 0.0001$ μεταξύ των δύο μεθοδολογιών. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Bromilow και συν. [339] (έλεγχος κατανομών $p > 0.05$) που μελέτησαν τον τίτλο αντισώματος σε περιπτώσεις με κλινικά σημαντικά αντισώματα (Αντι-C: 3, αντι-c: 5, αντι-E: 9, αντι-Kell: 8, αντι-e : 1, αντι-S: 1, αντι-Fya: 3, αντι-Jka: 4) με CTT και GMA1 (με Diamed) και ανέφεραν υψηλότερο τίτλο με τη μέθοδο γέλης σε 31/34 (91.18%) περιπτώσεις. Οι τρεις περιπτώσεις με υψηλότερο τίτλο με CTT ήταν ένα αντι-Kell, ένα αντι-S και ένα αντι-Fya, ενώ στη μελέτη μας η μόνη περίπτωση με υψηλότερο τίτλο με CTT ήταν ένα αντι-Jka. Οι ακριβείς τιμές των τίτλων δεν ήταν διαθέσιμες από τους Bromilow και συν. και συνεπώς η αξιολόγηση της απόλυτης διαφοράς των τίτλων μεταξύ των δύο μεθόδων δεν ήταν εφικτό να αξιολογηθεί.

Όσον αφορά τη σύγκριση CTT και GMA2 (Grifols), η μελέτη μας έδειξε ότι αν και στις περισσότερες περιπτώσεις οι τίτλοι σε 92.7% των δειγμάτων ήταν υψηλότεροι με GMA2, οι περισσότερες διαφορές ήταν μόνο με μία αραιώση (35.43%) ή με δύο αραιώσεις (34.64%). Η μέση απόλυτη διαφορά για τις τιτλοποιήσεις που δεν υπήρχε συμφωνία ήταν 2.06 φορές υψηλότερη με GMA2. Τα δεδομένα που υπάρχουν στις βιβλιογραφίες που συγκρίνουν CTT με GMA2 (Grifols) είναι σπάνια και αφορούν τους τίτλους της IgG τάξης των αντι-A και αντι-B αντισωμάτων σε τιτλοποίηση ABO, οι οποίοι βρέθηκαν 2.17 και 2.61 φορές υψηλότεροι αντιστοίχως με GMA2 από ότι με CTT (και τα δύο $P < 0.001$) [340]. Τα αποτελέσματά μας που υποδεικνύουν επίσης υψηλότερους τίτλους με GMA2 δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω (έλεγχος κατανομών $p > 0.05$). Εντούτοις αξίζει να σημειωθεί ότι στη μελέτη μας οι διαφορές μεταξύ CTT και GMA2 δεν ήταν τόσο μεγάλες και έτσι η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν πολύ καλή $W = 0.92$, ($p < 0.0001$).

Όταν συγκρίθηκαν οι δύο μέθοδοι μικροστηλών γέλης GMA1 (με Diamed) και GMA2 (με Grifols), βρέθηκαν πανομοιότυποι τίτλοι στα περισσότερα δείγματα που εξετάστηκαν (73/137, 53.28%), ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν υψηλότεροι με τη GMA2 (49/64, 76.57%). Ωστόσο, η πλειονότητα των διαφορών 81.25% μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν μόνο με μία αραιώση και έτσι οι δύο μέθοδοι που εξετάστηκαν αποκάλυψαν μια σχεδόν τέλεια συμφωνία ($W = 0.95$, $p < 0.0001$) (Πίνακας 22α).

Οι Cid και συν.[335] που συνέκριναν τρία συστήματα μικροστηλών για έμμεση coombs και τιτλοποίηση σε 100 δείγματα, έχουν αναφέρει ότι η τιτλοποίηση αντισωμάτων με GMA1 (Diamed), GMA2 (Grifols) και Ortho Bionue έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα [μέση βαθμολογία (εύρος) 30.3 (3-112), 34.31(5 -119) και 37.38 (3-112) αντιστοίχως]. Από την άλλη πλευρά, μια μελέτη που συνέκρινε GMA1 και GMA2 (όχι για τιτλοποίηση) για έλεγχο και ταυτοποίηση αντισωμάτων κατά τον προμεταγγισιακό έλεγχο ασθενών, καταλήγει στο συμπέρασμα ότι για την ταυτοποίηση των αντισωμάτων ήταν σχετικά ακριβείς ($p > 0.05$) οι δύο μέθοδοι Grifols DG Gel και Bio-Rad (96.03% και 94.44% αντίστοιχα) [341].

Όσον αφορά την ειδικότητα του αντισώματος κατά τη σύγκριση της δοκιμασίας με σωληνάριο και με κάρτες γέλης με (CTT με GMA1 και CTT με GMA2), και οι δύο μέθοδοι GMA παρουσίασαν υψηλότερες τιμές τιτλοποίησης από ότι η CTT με μέση απόλυτη διαφορά με τίτλους μεγαλύτερους από 1 (1.62 στην σύγκριση GMA1 με CTT και 1.91 στην GMA2 με CTT). Αυτή η περίπτωση περιλάμβανε όλα τα αλλοαντισώματα στα οποία έγινε τιτλοποίηση (αντι-D, αντι-Kell, αντι-E, αντι-Jka, αντι-c, αντι-Cw, αντι-Fya, αντι-M, αντι-Kra, αντι-Lua, αντι-e, αντι-G, αντι-Cha), με μοναδική εξαίρεση ενός αντι-Jka που παρήγαγε υψηλότερο τίτλο με CTT σε σύγκριση με GMA1 με μία αραιώση (πίνακας 20β). Ο Finck και συν. που είχαν συγκρίνει CTT με ένα διαφορετικό σύστημα μικροστηλών Ortho BioVue (μέθοδος που στηρίζεται σε τεχνολογία στήλης με μικροσφαιρίδια), διαπίστωσαν επίσης ότι για τα περισσότερα αλλοαντισώματα που τιτλοποιήθηκαν με Ortho BioVue (αντι-E, αντι-e και αντι-c) κατά μέσο όρο, οι τίτλοι που προέκυψαν ήταν υψηλότεροι από τους τίτλους με CTT. Ωστόσο, οι τιμές των τίτλων διέφεραν κατά λιγότερο από μία αραιώση, ένα εύρημα που ήταν σημαντικά διαφορετικό από τα αποτελέσματά μας ($p < 0.05$) [310].

Όταν επικεντρωθήκαμε μόνο στα αντι-D, τα οποία αφορούσαν τα περισσότερα δείγματα της μελέτης μας ($N = 50$, συχνότητα 36.50%), παρατηρήθηκε ότι στις περισσότερες

περιπτώσεις 46/50 (92%) ήταν υψηλότερες οι τιμές με τη GMA1 σε σύγκριση με CTT ενώ ήταν ταυτόσημη στα υπόλοιπα 4/50, (8%) (Πίνακας 20β). Η μέση απόλυτη διαφορά για τις τιτλοποιήσεις που δεν υπήρχε συμφωνία ήταν 1.96 φορές υψηλότερη με GMA1. Παρόμοια δεδομένα έχουν δημοσιευθεί από τους Thakur και συν. που πραγματοποίησαν τίτλους αντι-D με GMA1 με Diamed και με CTT. Διαπιστώθηκε ότι το 90.4% των περιπτώσεων ήταν υψηλότερα με GMA1 ή ταυτόσημα στα υπόλοιπα 9.6%, και οι αντι-D τίτλοι ήταν μία έως πέντε φορές υψηλότεροι με GMA1 [316] ($p = 0.9996$). Μια άλλη μελέτη από τους Novaretti και συν.[342], διαπίστωσε ότι οι αντι-D τίτλοι με GMA1 ήταν σταθερά υψηλότεροι (100%) από αυτούς με CTT, που δεν διαφέρουν σημαντικά από τα αποτελέσματά μας ($p = 0.0748$). Ωστόσο, σε σχέση με τη διαφορά στις τιμές τιτλοποίησης ανέφεραν ότι η μέθοδος GMA1 παρήγαγε 3,4 φορές υψηλότερους τίτλους από ότι με CTT που είναι τιμή υψηλότερη από τα ευρήματά μας ($p < 0.05$).

Αναφορικά με το αντι-Kell βρέθηκαν ομοίως υψηλότερες τιμές τίτλων και με τις δύο μεθόδους μικροστηλών γέλης (GMA1 κατά 1.16 και GMA2 κατά 1.48) και τις 25 περιπτώσεις που εξετάστηκαν, σε αντίθεση με τους Finck και συν. [310] όπου τα δείγματα αντι-Kell ($n = 15$) που εξετάστηκαν με το σύστημα Ortho Bionue System παρήγαγαν χαμηλότερες τιμές τίτλων με σχεδόν μία αραιώση (0.9) σε σχέση με τη μέθοδο CTT. Όσον αφορά τα αλλοαντισώματα Jka, αξίζει να αναφερθεί ότι τα δείγματα αντι-Jka αποκάλυψαν μία από τις μεγαλύτερες διαφορές στην τιτλοποίηση και τις δύο μεθόδους GMA σε σύγκριση με CTT στις περισσότερες περιπτώσεις που εξετάστηκαν (πίνακες 20β, 21β). Ειδικά για το GMA2 (Grifols) σε σύγκριση με CTT, η μέση απόλυτη διαφορά των τίτλων ήταν 2.67. Αυτό φαίνεται να συμβαδίζει με προηγούμενες παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες το σύστημα DG Gel Grifols συνδέεται με αυξημένη ευαισθησία στην ανίχνευση αντι-Jka αντισωμάτων [341].

Μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ της κλασικής μεθόδου σωληναρίου και των μεθόδων που βασίζονται σε μικροστήλες γέλης (CTT έναντι GMA1 και CTT έναντι GMA2) βρέθηκαν σε δείγματα με αντι-e και αντι-Cha με μέση διαφορά στους τίτλους 3,00 και για τις δύο συγκρίσεις. Οι τίτλοι των περιπτώσεων αντι-Cha ήταν 16 με CTT και 128 με GMA1 και GMA2, όπως αναμένεται από ένα αντίσωμα HTLA χαμηλού τίτλου υψηλής συγγένειας.[100] Ωστόσο, ο περιοριστικά μικρός αριθμός αντι-Cha (δύο περιπτώσεις) και του αντι-e (μία περίπτωση) μπορεί να θεωρηθεί ως περιοριστικός παράγοντας.

Αξίζει να σημειώσουμε σχετικά με τους περιορισμούς, ότι αρκετές παράμετροι στη μελέτη μας μπορεί να ερμηνευθούν ως περιορισμοί, αλλά είναι στην πραγματικότητα παράμετροι που αναδεικνύουν την ιδιαιτερότητα της κάθε μεθόδου. Παρασκευάστηκαν εναιωρήματα ερυθρών (RBC) για όλες τις μεθόδους (CTT, GMA1, GMA2) με χρήση των ίδιων εμπορικών διαθέσιμων ερυθρών τεστ για να αποτραπούν διαφορές που θα προέκυπταν από τις διαφορές του αντιγονικού προφίλ των ερυθρών, ετοιμάστηκε εναιώρημα ερυθροκυττάρων από ερυθρά τέστ $3 \pm 1\%$ με προσθήκη φυσιολογικού ορού σε τελική συγκέντρωση 0,8% για μεθόδους γέλης (GMA1 και GMA2) όπως προηγούμενα είχε χρησιμοποιηθεί από τους Cid και συν.[335] και τους Thakur και συν.[316] Ωστόσο, αυτό για τη μελέτη και των δύο μεθόδων GMA1 (Diamed) και GMA2 (Grifols) σε δοκιμασίες τιτλοποίησης, δεν περιλαμβάνεται σε καμία από τις συστάσεις-οδηγίες των κατασκευαστών. Αν και ο έλεγχος με CTT πραγματοποιήθηκε μόνο μία φορά για κάθε ένα από τα δείγματα τιτλοποίησης, (εκτός από τα δείγματα που αφορούσαν την παρακολούθηση εγκύων γυναικών που είχαν αναπτύξει αντισώματα στα πλαίσια του επανελέγχου για επαλήθευση του προηγούμενου τίτλου και που δεν υπήρξε καμία διαφορά στις τιμές) και έτσι δεν έχουμε αξιολόγηση της επαναληψιμότητας, για όλες τις τιτλοποιήσεις με CTT. Το γεγονός ότι όλοι οι προσδιορισμοί τίτλου πραγματοποιήθηκαν από έναν μόνο επιστήμονα εργαστηρίου ελαχιστοποιούν τον διαφορετικό βαθμό υποκειμενικότητας στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με CTT. Τέλος, όσον αφορά τα δείγματά μας, παρόλο που στις μελέτες μας περιελήφθησαν αλλοανοσοποιημένες έγκυες γυναίκες, δεν υπήρχαν διαθέσιμα πλήρη κλινικά δεδομένα παρακολούθησης και έτσι δεν πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της τιμής του τίτλου και της κλινικής έκβασης του νεογνού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι διαφορές στις εμπορικές μεθόδους μικροστηλών με γέλη, οι διαφορετικές πρακτικές που εφαρμόζονται μεταξύ των εργαστηρίων (όπως ερυθρά ελέγχου με διαφορετική αντιγονική σύνθεση, διαφορετικά μέσα αραιώσης) μαζί με το διαφορετικό αριθμό δειγμάτων μπορεί να είναι μια λογική εξήγηση για ορισμένες από τις ανιχνευθείσες αποκλίσεις μεταξύ διαφόρων μελετών.

Από όσο γνωρίζουμε, η μελέτη μας περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων τιτλοποίησης, ένα σύνολο 137 δειγμάτων που εξετάστηκαν το καθένα ταυτόχρονα με την κλασική μέθοδο σωληναρίου και με τη δοκιμασία συγκόλλησης μικροστηλών γέλης δύο διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων GMA (GMA1 με Diamed και GMA2 με Grifols) για τιτλοποίηση αντισωμάτων RBC σε έγκυες γυναίκες και ασθενείς. Η αραιώση των δειγμάτων στην τιτλοποίηση έγινε με φυσιολογικό ορό και οι τιτλοποιήσεις για τις μεθόδους CTT και GMA διεξήχθησαν από τα ίδια σωληνάρια αραιώσης, αποδίδοντας την βασική διαφορά στην ακρίβεια της συγκεκριμένης μεθόδου εάν υπάρχει.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματά μας που δείχνουν υψηλότερες τιμές τιτλοποίησης με αμφότερα τα GMA σε σύγκριση με την CTT, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι η μέθοδος μικροστηλών γέλης φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη από την CTT για την τιτλοποίηση των αλλοαντισωμάτων.

Αυτό είναι σύμφωνο με το εύρημα ότι η μέθοδος γέλης φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση αλλοαντισωμάτων RBC [316,343]. Ωστόσο, οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές στη μελέτη μας και η συμφωνία μεταξύ όλων των μεθόδων ήταν πολύ καλή, υποδεικνύοντας πιθανώς ότι η GMA αποτελεί κατάλληλη εναλλακτική λύση σε σχέση με τη CTT και για την τιτλοποίηση αντιερυθροκυτταρικών αλλοαντισωμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Malcolm Needs. Human Erythrocytes antigens of Blood Groups. Transfusion and Transplantation Science, Robin Knight (eds), Oxford University Press. 2013, pp 19-44.
2. Laura Cooling, ABO, H, and Lewis Blood Groups and Structurally Related Antigens. Technical Manual, 17th ed. John D Roback, Brenda J. Grossman, Teresa Harris, Christopher D Hillier (eds), AABB, 2011, pp 363-388.
3. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. Transpl. Immunol 2005;14:143-153.
4. G. Daniels. The molecular genetics of blood group polymorphism. Human genetics. Springer;2009 (article 729).
5. Daniels GI, Fletcher A et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigen. Vox Sang. 2004;87:304-316.
6. Luiz Carlos de Mattos. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. Rev Bras Hematol Hemoter 2016;38:331-340.
7. Dean L. The ABO Blood Group. Blood Groups and Red Cell Antigens. National Center for Biotechnology Information(US). Bethesda (MD):2005;5.
8. Yamamoto F, Clausen H, White T et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. Nature 1990;345:229-233.
9. Neil D. Avent, Antonio Martinez, Willy A. Flegel et al. The BloodGen project: toward mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. Transfusion 2007;47:40S-46S.
10. Denisse M. Harmening. The ABO Blood Group System. Modern Blood and Transfusion Practices 5th ed, Denisse M. Harmening, F.A. Davis Company, Philadelphia, 2005, pp 108-133.
11. Ranadhir Mitra, Nitasha Mishra, Girija Prasad Rath. Blood groups systems. Indian J. Anaesth 2014;58:524-528.
12. Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Chester MA, Olsson ML. An extensive polymerase chain reaction allele-specific polymorphism strategy of clinical ABO blood group

- genotyping that avoids potential errors caused by null, subgroup, and hybrid alleles. *Transfusion* 2007;47:2110-2125.
13. Yaser MH, Hosseini-Maaf B, Olsson ML. Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles. *Curr Opin Hematol.* 2008;15:618-624.
 14. Laura Cooling. ABO, H, and Lewis Blood Groups and Structurally Related Antigens. *AABB Technical Manual* 2010;12:363-385.
 15. Daniels Geof. ABO, Hh, and Lewis systems. *Human Blood Groups*, Second ed. 2002;2:10-51.
 16. H. Goubran. Blood group serology. *International Society of Blood Transfusion, ISBT* 2009;4:1-5.
 17. Sujata S Giriyan, Akanksha Agrawal, Richa Bajpai et al. A1 and A2 Sub-Types of Blood Group 'A': A Reflection of their Prevalence in North Karnataka Region. *J. Clin Diagn Res.* 2017;11:EC40-EC42.
 18. Manisha Shrivastava, Seema Navaid, A. Peethambarakshan et al. Detection of rare blood group, Bombay (Oh) phenotype patients and management by acute normovolemic hemodilution. *Asian J Transfus Sci.* 2015;9:74-77.
 19. R.S.Balgir. Identification of a rare blood group, "Bombay (Oh) phenotype," in Bhuyan tribe of Northwestern Orissa, India. *Indian J Human Genet.* 2007;13:109-113.
 20. Dipta TF, Hossain AZ. The Bombay blood group: are we out of risk? *Mymensingh Med J.* 2011;20:536-540.
 21. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med.* 1995;333:32-41.
 22. O' Donnell J , Laffan M A . The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med.* 2001;11:343-351.
 23. P.L. Mollison, C.P. Engelfried, Marcela Contreras. ABO, Lewis and P groups and li antigens. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 2005;4:114-162.
 24. Mark E. Brecher. ABO,H, and Lewis Blood Groups and Structurally Related Antigens. *AABB* 2005;13:289-302.
 25. Baumgarten A, Kruchok AH, Weirich F. High frequency of IgG anti-A and anti-B antibody in old age. *Vox Sang* 1976;30:253.
 26. Park JY, Kob M, Prodeus AP et al. Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: possible role of WASP in human lymphocyte maturation. *Clin Exp Immunol* 2004;136:104-110.

27. Sujata S Girivan, Akanksha Agrawal, Richa Bajpai et al. A1 and A2 Sub-Types of Blood Group 'A': A Reflection of their Prevalence in North Karnataka Region. *J Clin Diagn Res* 2017;11:EC40-EC42.
28. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:87-375.
29. C.S. Sheeladevi, S. Suchitha, G.V. Manjunath et al. Hemolytic Disease of the Newborn Due to Anti-c Isoimmunization: A Case Report. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2013; 29: 155–157.
30. Levine P, Katzin EM. Isoimmunization in pregnancy and the variety of isoagglutinins observed. *Proc. Soc Exp. Biol NY* 1940;43:343-346.
31. Flegel WA. Molecular genetics of Rh and its clinical application. *Transf Clin Biol.* 2006;13:4-12.
32. Westhoff CM. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol.* 2007;44:42-50.
33. Willy A. Flegel. The genetics of the blood group system. *Blood Transfusion* 2007;5:50-57.
34. Mark E. Brecher. The Rh System. *AABB Technical Manual* 2005;14:315-334.
35. Stella T. Ckou, Connie M. Westhoff. The Rh system. *AABB Technical Manual* 2010;13:389-410.
36. Laura Dean. Blood group antigens are surface markers on the red blood membrane. *Blood Groups and Red Cell Antigens*; 2005 (chapter) 2.
37. Stella T. Chou, Connie M. Westhoff. The Rhesus System. *Technical Manual*, 17th ed. John D Roback, Brenda J. Grossman, Teresa Harriw, Christopher D Hillier. American Association of Blood Banks, 2011, pp 390-410.
38. Marilyn Wiler. The Rhesus Blood Group System. *Modern Blood and Transfusion Practices*, 5th ed, Denisse M. Harmening, F.A. Davis Company, Philadelphia, 2005, pp 134-147.
39. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak phenotype. *Curr Opin Hematol.* 2006;13:476-483.
40. Koutsouri T, Chaikali A, Giannopoulos A, Douramani P, Flesiopoulou I, et al. Frequency distribution of RHD alleles among Greek donors with weak D phenotypes demonstrates a distinct pattern in central European countries. *Transfus Med* 2019;29:468-470.

41. Roubinet F, Apiol PA, Blancher A. Frequency of partial D phenotypes in the south western region of France. *Transfus Clin Bio* 1996;3:247-255.
42. Daniels G. Variants of RhD-current testing and clinical consequences. *Br. J Haematol* 2013;161:461-470.
43. Westhoff CM. Molecular genotyping of RH: what (not) to do? *Transfusion* 2007;47:1337-1339.
44. Daniels GL, Poole G, Poole J. Partial D and weak D: can they be distinguished? *Transfus Med*. 2007;17:145-146.
45. S. Gerald Sandler, Leonard Chen, Wily A. Flegel. Serological weak D phenotypes: A review and guidance for interpreting the RhD blood type using the *RHD* genotype. *Br J Hematol* 2017;179:10-19
46. Denomme G.A, F. Wagner B.J. Fernades. "Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33, 864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention". *Transfusion* 2005;45:1554-1560.
47. Dogic V, J. Bingulac-Popovic, I. Babic, Z. Hundric-Haspl et al. Distribution of weak D types in the Croatian population. *Transfus Med* 2011;21:278-279.
48. Rizzo C, L. Castiglia, E. Arena et al. "Weak D and partial D: our experience in daily activity". *Blood Transfus* 2012;10:235-236.
49. Kennedy MS, Wilson S, Kelton JG. Perinatal Transfusion Medicine. Arlington VA: American Assosiation of Blood Banks; 1990.
50. Reid ME, Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen FactsBook. 2nd ed. London: Academic Press, Elsevier; 2004.
51. Velkova E. Correlation between the Amount of Anti-D Antibodies and IgG Subclasses with Severity of Haemolytic Disease of Foetus and Newborn. *Open Access Maced J Med Sci* 2015;3:293-297.
52. J Joyce Poole and Geoff Daniels. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfusion Medicine* 2007;21:58-71.
53. Moise KJ. Red blood cell alloimmunization in pregnancy. *Semin Hematol*. 2005;42:169-178.
54. Mouro I, Colin Y, Cherif-Zahar B et al. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet* 1993;5:62-65.
55. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: A review. *Blood* 2000;95:375-387.

56. Ben C. Hill, Courtney A. Hanna, Jill Adamski, et al. Ficin-Treated Red Cells Help Identify Clinically Significant Alloantibodies. Masked as Reactions of Undetermined Specificity in Gel Microtubes. *Laboratory Medicine* 2017; 48: 24–28.
57. P.L. Mollison, C.P. Engelfried, Marcela Contreras. The Rh blood group system (and LW). *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 2005;5:163-208.
58. Malik S, Moiz B. Clinacal significance of maternal anti-Cw antibodies: a review of three cases in literature. *J Pak Med Assoc* 2012;62:620-621.
59. Kollamparambil TG, Jani BR, Aldouri M et al. Anti-C(w) alloimmunization presenting as hydrops fetalis. *Acta Pediatr.* 2005;94:499-501.
60. Allen FH, Jr. Tippet PA. A new Rh blood type which reveals the Rh antigen G. *Vox. Sang.* 1958;3:321-330.
61. Palfi M, Gunnarsson C. The frequency of anti-C + antiG in the absence of anti-D in alloimmunized pregnancies. *Transfus. Med.* 2001;11:207-210.
62. Huber AR, Leonard GT, Driggers RW, Learn SB, Gilstad CW. Case report: Moderate hemolytic disease of the newborn due to anti-G. *Immunohematology.* 2006;22:166–170.
63. R. Jerman, A. Korhonen, K. Haimila et al. Severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-C+G. *Immunohematology* 2015;31:123-127.
64. Raj Nath Makroo, Anita Kaul et al: Anti G antibody in alloimmunized pregnant women: Report of two cases. *Asian J. Transfusion* 2015;9: 210-212.
65. Schulze TJ, Goebel M, et al:Development of anti-G, anti-C, and anti-Jkb in a 22-year-old mother during her fourth pregnancy. *Transfus Med Hemother.* 2013;40:207-209.
66. Shirey RS, Mirabella D C et al. Differentiation of anti-D, -C and –G: Clinical relevance in alloimmunized pregnancies. *Transfusion* 1997;37:493-496.
67. Corina L. Muller, Jodi L. Schucker. When anti-G and anti-C antibodies masquerade as anti-D antibody. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2011;24:193-194.
68. Schulze TJ, Goebel M, Scharberg EA, Bugert P, Janetzko K. Development of anti-G, anti-C and anti-Jk(b) in a 22-year-old mother during her fourth pregnancy. *Transfus Med Hemother.* 2013;40:207–209.
69. W. John Judd. *Guidelines for Prenatal and Perinatal Immunohematology.* AABB Bethesda, Maryland; 2005.

70. Marcos Paulo Miola, Sandra Valeria Bolonhesi, et al. Do not confuse anti-LW antibodies with anti-D. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35:198.
71. Sunghwan Shin, Ji Young Seo, Sooln Choi, Sejong Chun. Anti-LW Showing Anti-D Mimicking Specificity: A case Report. *Korean J Blood Transfus* 2017;28:77-81.
72. Laura Dean. The Kell blood group. *Blood Groups and Red Cell Antigens* 2005 (chapter) 8.
73. P.L. Mollison. Other red cell antigens. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 2005;6:209-252.
74. Lee S, Russo D, Redman CM. The Kell blood group system: Kell and Kx membrane proteins. *Semin Hematol* 2000;37:113-121.
75. Symmans WA, Shepherd CS et al. Hereditary acanthocytosis associated with the McLeod phenotype of the Kell blood group system. *Br. J. Hematol.* 1979;42:575-583.
76. Mayer B, Hinkson L, Hillebrand W et al. Efficacy of Antenatal Intravenous Immunoglobulin Treatment in Pregnancies at High Risks due to Alloimmunization to Red Blood Cells. *Transfus Med Hemother* 2018;45:429-436.
77. Mark E. Brecher. Other Blood Groups. *AABB Technical Manual* 2005;15:335-358.
78. Mark E. Brecher. Initial Detection and Identification of Alloantibodies to Red Cell Antigens. *AABB Technical Manual* 15th ed. 2005;19:428-449.
79. Schonewille H, van de Watering LM, Loomans DS, Brand A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion* 2006;46:250-256.
80. Geoff Daniels. Other Blood Groups. *AABB Technical Manual* 2010;14:411-435.
81. Orteda DC, Cardenas H, Barreto G. Genetic Variants of Duffy and Hemoglobin S Genes in an Afrodescendant Population from Colombia. *Hum Biol.* 2018;90:271-280.
82. Karthigayan Gunalan, Juliana M. Sa, Roberto R. et al. Transcriptome profiling of *Plasmodium vivax* in Saimiri monkeys identifies potential ligands for invasion. *PNAS* 2019;116:7053-7061.
83. Barros MMO. Kidd system antigens and kidney disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2017;39:293-294.
84. Shaum Lawicki, Randal B. Covin et al. The Kidd (jk) Blood group system. *Transfus Med Rev* 2017;31:165-172.

85. R.N.Makroo, Sweta Nayak, Mohit Chowdhry et al. Facts and Fallacies if Kidd Antibodies: Experience in a Tertiary Care Hospital in North India. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2017;33:254-258.
86. Wu PC, Chyan TW, Feng SH, et al. Genotyping and serotyping profiles showed weak Jka presentation for previously typed as Jk null donors. *Vox Sang* 2019;114:268-274.
87. Kim WD, Lee YH. A fatal cases of severe hemolytic disease of newborn associated with anti- Jkb. *J. Korean Med. Sci.* 2006;21:151-154.
88. Hold S, Donaldson H, et al: Acute Transplant Rejection Indused by Blood Transfusion Reaction to the Kidd Blood Group System. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2403-2406.
89. Payrard T, LamY, Saison C, et al. Anti-U-like as an alloantibody in S-s-U- and S-s-U+(var) black people. *Transfusion* 2012;52:622-628.
90. Reid ME. MNS blood group system: a review. *Immunohematology* 2009;25:95-101.
91. Rashmi Tondon, Rahul Kataria, Rajendra Chaudhry. Anti-M: Report of two cases and review of literature. *Asian J Transfus Sci.* 2008;2:81-83.
92. Guastafierro S, Sessa F, Cuomo C. et al. Delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-S antibody in patient with anti-Jk(a) autoantibody and multiple alloantibodies. *Ann Hematol.* 2004;83:307–308.
93. Rothman I K, Alter H J, Strewler G J. Delayed overt hemolytic transfusion reaction due to anti-U antibody. *Transfusion* 1976;16:357-360.
94. Karamatic Crew V, Green C, Daniels G. Molecular bases of the antigens of the Lutheran blood group system. *Transfusion* 2003;43:1729-1737.
95. Geof Daniels. Other Blood Groups. *AABB Technical Manual* 2010;14:417-418.
96. Francesco Bennardelo, Serelina Coluzzi, Giuseppe Curciarello et al. Recommendationw for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. *Blood Transfus.*2015;13:109-134.
97. C.B. Bub. Dithiothreitol treatment of red blood cells. *Immunohematology* 2017;33:170-172.
98. W.J. Judd, K. Kramer, J.J. Moulds. The Rapid Identification of Chido and Rodgers Antibodies Using C4d- Coated Red Blood Cells. *Transfusion* 1981;21:189-192.
99. Harvey G. Klein, David J. Anstee et al: Other red cell antigens. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine.* 2013;6:231-240.

100. R. Mourgey. A review of the Chido/Rodgers blood group. *Immunohematology* 2010; 26:30-38.
101. J. Moulds. System 011-Yt System, 017-Ch/Rg System 026- JMH. *Immunohematology* 2011;27:124-126.
102. H. Chaplin JR. Relation of Complement Components to Blood Group Serology. *Immunohematology* 2005;21:90-92.
103. Suzan D. Rolih, Lois J. James, Rosanne Sheehan. Recognition and Resolution of High-Titer, Low-Avidity Antibodies. *American Association of Blood Banks*, 1979 pp1-47.
104. Giles CM: Serologically difficult red cell antibodies with special reference to Chido and Rodgers blood groups in Mohn JF et al: *Human Blood Groups*. Buffalo NY, Karger 1976, pp 268-276.
105. Lacey P. Moulds, M. Sobonya J: Clinical and serological observations in hemolytic disease of the newborn caused by anti-Holey, abstracted. *Transfusion* 1978;18:379.
106. Kathy D Blaney, Paula Howard. Other blood group systems. *Basic & Applied Concepts of Immunohematology-Pageburst E-book on vital Source 2*, 2008;6:150-152.
107. Geoff Daniels. Chido/ Rodgers Blood Group System. *Human Blood Groups 3rd ed* 2013 (chapter)17. Doi;10.1002/9781118493595.
108. Marshall JV. The Bg antigens and antibodies. *Canad J Med Tech* 1973;35:26.
109. P.L. Mollison, C.P. Engelfried, Marcela Contreras. Immunology of red cells. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 2005;3:57-65.
110. Mark E. Brecher. Immunology. *AABB Technical Manual* 2005;11:243-263.
111. James C. Zimring, Steven L. Spitalnik. Molecular Biology and Immunology in Transfusion Medicine. *AABB Technical Manual* 2010;10:315-320.
112. P.L. Mollison. Red cell antibodies against self-antigens, bound antigens and induced antigens. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 2005;7:253-298.
113. Misganaw Birhaneselassie. Principles of antigens and antibodies. *Immunohaematology* 2004;2:11-18.
114. Paula R. Howard. Immunology; Basic Principles and Applications in the Blood Bank. *Basic & Applied Concepts of Blood Banking and Transfusion Practices*. 2016;2:23-42.
115. P. L. Mollison. Immunology of red cells. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 2005;3:55-69.

116. Redman M, Regan F, Contreras M. A prospective study of the incidence of red cell allo-immunization following transfusion. *Vox. Sang.* 1996;71:216-220.
117. Frohn C, Dumbgen L, Brand IM, et al. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion* 2003;43:893-898.
118. Zalba Marcos, S Antelo Caamano ML et al. Transfusion of D positive red cells to selected D- negative patients. *Med Clin (Barc)*; 2019 pii: S0025-7753(19)30632-3. doi:10.1016/j.medcli.2019.07.023.
119. Hendrickson JE, Tormey CA. Understanding red blood cell alloimmunization triggers. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;2:446-451.
120. Victor Mendonca Alvew, Paulo Poberto Juliano Martins, Sheila Soares et al. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. *Rev Bras Hematol* 2012; 34:206-211.
121. Romphruk AV, Simtong P, Butryojantho C. The prevalence, alloimmunization risk factors, antigenic exposure, and evaluation of antigen-matched red blood cells for thaladdemia transfusions: a 10-year experience at a tertiary care hospital. *Transfusion* 2019;59:177-184.
122. ET Maya, KA Buntugu, F Pobee et al. Rhesus Negative Woman Transfused With Rhesus Positive Blood: Subsequent Normal Pregnancy Without Anti D production. *Ghana Med J.* 2015;49:60-63.
123. R.N. Makroo, Aakanksha Bhatia, Richa Gupta et al. Prevalence of Rh, Duffy, Kell, Kidd & MNSs blood group antigens in the Indian donor population. *Indian J Med Res* 2013;137:521-526.
124. Price TH. Standards for blood banks and transfusion services. 26th ed. Bethesda USA: AABB, 2009, pp 33–34.
125. Katharine AD, Ira Pre transfusion testing, Technical manual. 16th ed. Bethesda, USA : AABB; 2008, pp 437–460.
126. Katharine A. Downes, Ira. Shulman. Rre-transfusion Testing. Technical Manual 17th ed. John D Roback, Brenda J. Grossman, Teresa Harris. AABB 2011, pp 437-462.
127. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev.* 2000;14:44-61.

128. Milkins C. Berryman J. Cantwell C. et al. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfus Med* 2013;23:3-35.
129. Esther Ifeoma Obi, Crosdale Ogbo Pughikumo, Richard Ishmael Oko-jaja. Red blood cell alloimmunization in multi-transfused patients with chronic kidney disease in Port Harcourt, South-South Nigeria. *Afr Heath Sci* 2018;18:979-987.
130. Giancarlo Liumbruno, Francesco Bennardello, Angela Lattanzio et al. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets. *Blood Transfus* 2009;7:132-150.
131. Kathy D. Blaney, Paula R. Howard. Basic and applied Concepts of Blood Banking and Transfusion Practices. *Immunology Basic Principles and Applications in the Blood Banks* 2013;1:3-18.
132. Campbell-Lee S.A, Kittles R. Red Blood Cell Alloimmunization in Sickle Cell Disease: Listen to Your Ancestors. *Transfus Med Hemother* 2014;41:431-435.
133. Sabita Basu, Ravneet Kaur, Gagandeep Kaur. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives. *Asian J Transfus Sci.* 2011;5:3-7.
134. Sheryl A. Whitlock. Introduction to immunohematology. *Immunohematology for Medical Laboratory Technicians* 2009;1:6-27.
135. Kumlien G, Wilpert J, Safwenberg J, Tyden G. Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation* 2007;84:s17-19.
136. Gharehbaghian Ahmad, Karimi Gharib, Vafaiyan Vida et al. Frequency & specificity of RBC alloantibodies in patients due for surgery in Iran. *Indian J. Med Res* 2013;138:252-256.
137. Fischbach F, Dunning MB III. Overview of immunodiagnostic Studies: Blood Banking or Immunohematology Tests, In: A manual of laboratory and diagnostic tests, 8th ed. Fischbach F. Dunning MBIII (eds), Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009, pp 649-687.
138. Robin Knight. Introduction to Basic Immunology and Techniques. *Transfusion and Transplantation Science*, Robin Knight, Oxford University Press 2013, pp 4-18.
139. Harvey G. Klein, David J. Anstee. Red cell incompatibility in vivo. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 12th ed. 2014, pp 411-457.

140. Ralph E. B. Green. The Antiglobulin test, in: Modern Blood and Transfusion Practices, 5th ed. Denisse M. Harmening, F. A. Davis Company, Philadelphia, 2005, pp 93-107.
141. Phyllis S. Walker. Identification of Antibodies to Red Cell Antigens. In: Technical Manual, 17th ed. John D Roback, Brenda J. Grossman, Teresa Harris, Christopher D Hillier. American Association of Blood Banks, 2011, pp 463-496.
142. R.C. Dara A.K. Tiwari, D. Arora Applications of selected cells in immunohematology in a developing country: case studies in a developing country: case studies. Immunohematology 2017;33:27-35.
143. De Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM et al. Haemolytic disease of the fetus and newborn. Vox Sang 2015;109:99-113.
144. Christopher A, Tormey, Gary Stack. Immunogenicity of blood group antigens: a mathematical model corrected for antibody evanescence with exclusion of naturally occurring and pregnancy-related antibodies. Blood 2009;114:4279-4282.
145. Shirey RS, Edwards RE, Ness PM. The risk of alloimmunization to c (Rh4) in R1R1 patients who present with anti-E. Transfusion 1994;34: 756-8.
146. Beek TN, Young NG, Erickson ML, Prats I. Rare antibody-associated hemolytic transfusion reaction and transfusion-related acute lung injury: a case report. BMC Surg. 2017;17:48.
147. Noizat – Pirenne F, Habibi et al: The use of rituximab to prevent severe delayed haemolytic transfusion reaction in immunized patients with sickle cell disease. Vox Sang. 2015;108:262-267.
148. Leslie P. Scheunemann, Kenneth I. Ataga. Delayed hemolytic transfusion reaction in sickle cell disease. Am J Med Sci. 2010; 339:266-269.
149. White J, Qureshi H, Massey E et al. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. Transfusion Medicine 2016;26:246-263.
150. Shamee Shastri, Sudha S. Bhat, Manish Raturi et al. Further evidence of naturally occurring anti-Jka antibodies. Asian J Transfys Sci. 2015;9:107.
151. Sun XL, Yu Y, Guan XZ, Chen LF. Infuence of “dosage effect” on unexpected antibody identification. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2015;23:222-227.

152. Sood R, Neelima, Kumar D, Kumar T, Kumar V, et al. Antibody Titers Study in Group O Blood Donors: Tube and Column Agglutination Techniques. J Thrombo Cir 2016; 2:104. doi:10.4172/jtcoa.1000104
153. Cooling L. ABO and platelet transfusion therapy. Immunohematology 2007;23: 20-33.
154. Fung MK, Downes KA, Shulman IA Transfusion of platelets containing ABO-incompatible plasma: a survey of 3156 North American laboratories. Arch Pathol Lab Med 2007;131: 909-916.
155. Mark E Brecher. Antibody Detection/Identification and Compatibility Testing. AABB Technical Manual 15th ed. 2005;3:761-767.
156. L.N. Bagg. Sulfhydryl treatment of serum or plasma for the reduction of IgM antibodies. Immunohematology 2018;34:135-139.
157. Mark E. Brecher. Red Cell Antigens-Antibody Reaction and their Detection AABB Technical Manual 15th ed. 2005;12:271-279.
158. Livia Lara Pessoni, Marcos Antonio Ferreira, Julles Cristian Rodrigues et al. Red blood cell alloimmunization among hospitalized patients: transfusion reactions and how alloantibody identification rate. Hematol Transfus Cell Ther. 2018;40:326-331.
159. Cristian Morath, Martin Zeier et al. ABO-Incompatible Kidney Transplantation. Immunol 2017;8:234.
160. Montgomery JR, Berger JC, Warren DS, et al. Outcomes of ABO-incompatible kidney transplantation in the United States, Transplantation. 2012;93:603-609.
161. John R. Montgomery, Jonathan C. Berger et al. Outcomes of ABO-Incompatible Kidney Transplantation in the United States. Transplantation 2012;93:603-609.
162. Nina Worel. ABO-Mismatched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Transfus Med Hemother 2016;43:3-12.
163. Garrett S, Booth I, Eric A. Gehrie et al. Clinical Guide to ABO-Incompatible Allogeneic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2013;19:1152-1158.
164. Roley SD, Liang PS, Ulz L. Transplantation of ABO-incompatible bone marrow and peripheral blood stem cell components. Bone Marrow Transplantation 2000;26:749-757.
165. Phyllis S. Walker. Identification of Antibodies to Red Cell Antigens. AABB Technical Manual 2010;16:463-496.

166. Pollock JM, owman JM. Anti-Rh(D) subclasses and severity of Rh haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1990;59:176-179.
167. Sidhu M, Bala R, Akhtar N, Sawhney V. Prevalence, Specificity and Titration of Red Cell Alloantibodies in Multiparous Antenatal Females at a Tertiary Care Centre from North India. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016;32:307-311.
168. Sánchez-Durán MÁ, Higuera MT, Halajdian-Madrid C, et al. Management and outcome of pregnancies in women with red cell isoimmunization: a 15-year observational study from a tertiary care university hospital. *BMC Pregnancy Childbirth* 2019; 15:19:356.
169. Grenache DG. Hemolytic disease of the newborn. In: Gronowski AM, editor. *Current clinical pathology: handbook of clinical testing during pregnancy*. Totowa (NJ): Humana Press; 2004. pp. 219–241.
170. Tovey LA. Oliver memorial lecture. Towards the conquest of Rh hemolytic disease: Britain's contribution and the role of serendipity. *Transf Med* 1992;2:99-109.
171. Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* (ed 12th). Oxford, OX4 2DQ, UK: John Wiley & Sons, Ltd;2014.
172. Mayne S, Parker JH, Harden TA, Dodds SD, Beale JA. Rate of RhD sensitization before and after implementation of a community based antenatal prophylaxis programme. *BMJ*. 1997, pp 315.
173. Turner RM, Lloyd-Jones M, Anumba DO, et al. Routine antenatal anti-D prophylaxis in women who are RhD negative: meta-analyses adjusted for differences in study design and quality. *PLoS One*. 2012;7:3.
174. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal Hyperbilirubinemia. *New England Journal of Medicine*. 2001;344:581-590.
175. Foudoylaki-Paparizos L, Valsami S, Bournas N, et al. Alloimmunization during pregnancy in Greece: need for nationwide HDFN prevention programme. *Transfus Med*. 2013;23:254-259.
176. Branger B, Winer N. Epidemiology of anti-D allo-immunization during pregnancy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006;35:1S87-1S92.
177. Tamima Al-Dughaishi, Ikhlass S. Al-Rubkhi. Alloimmunization due to red cell antibodies in Rhesus positive Omani Pregnant Women: Maternal and Perinatal outcome. *Asian J Transfus Sci*. 2015;9:150-154.

178. Moise KJ. Non-anti-D antibodies in red cell alloimmunisation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92:75–81.
179. Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fya and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. *Transfus Med.* 1997;7:301–304.
180. Sebija Izetbegovic. Occurrence of ABO And RhD Incompatibility with Rh Negative Mothers. *Mater Sociomed* 2013;25:255-258.
181. Laura Dean. Hemolytic disease of the newborn. *Blood Groups and Red Cell Antigens* 2005;4:25-29.
182. Ahmet Yalinkaya, Mehmet Siddik Evsen, Yusuf Celic et al. Intrauterine blood transfusion in immune hydrops fetalis, corrects middle cerebral artery Doppler velocimetry very quickly. *Bosn J Basic Med Sci* 2012;12:37-40.
183. P.L.Mollison, C.P. Engelfried. Haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 2005;12:496-530.
184. Martin WL, West AP Jr, Gan L, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2,8 Å of an FcγRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of Ph-dependent binding. *Mol Cell.* 2001;7:867-877.
185. Heddle NM, Klama L, Frassetto R, et al. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. *Transfusion* 1993;23:217-20.
186. Daniels G. Human blood groups. 2nd ed. Oxford:Blackwell Science; 2002.
187. Reid ME, Chandrasekaran V, Sausais L, et al. Disappearance of antibodies to Cromer blood group system antigens during mid pregnancy. *Vox Sang* 1996;71:48-50.
188. Mohandas J, Narla A. Blood group antigens in health and disease. *Curr Opin Hematol* 2005;12:135-140.
189. Greco VA, Byrne KM, Procter JL, et al. Detection of antibodies in acid eluates with the gel microcolumn assay. *Transfusion.* 2002;42:698–701.
190. Anderson L, Szabo F. The incidence and outcome of clinically significant antibodies detected in Rhesus-D positive pregnant women outcome of the Northern Territory. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2018;58:514-517.

191. Awowole I, Cohen K, Rock J, Sparey C. Prevalence and obstetric outcome of women with red cell antibodies in pregnancy at the Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, West Yorkshire, England. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019;237:89-92.
192. Sabita Basu, Bavneet Kaur, Gagandeep Kaur. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives. *Asian J Transfus Sci.* 2011;5:3-7.
193. Koelewijn J , Vrijkotte TG, de Haas M, van der Schoot CE, et al. Risk factors for the presence of non rhesus D red cell antibodies in pregnancy. *Br J Obstet Gynaec* 2009;116:655-664.
194. Makroo RN, Arora B, et al. Clinical significance of antibody specificity to M,N and Lewis blood group system. *Asian J. Transus Sci* 2014;8:10.
195. Reid ME, Lomas-Francis C. The blood group antigen facts book. 2nd ed. San Diego:Academic Press; 2003.
196. Smith ML, Beck ML. The immunoglobulin structure of human anti-M agglutinins. *Transfusion* 1979;19:472-4.
197. M.E. Brecher. Perinatal Issues in Transfusion Practice. AABB Technical Manual 2005;13:535-556.
198. Drabik-Clary K, Reddy VV, Benjamin WH, Boctor FN. Severe hemolytic disease of the newborn in a group B African-American infant delivered by a group O mother. *Ann Clin Lab Sci.* 2006;36:205-207.
199. Dajak S, Stefanovic V, Capkun V. Severe hemolytic disease of fetus and newborn caused by red blood cell antibodies undetected at first-trimester screening. *Transfusion.* 2011;51:1380-1388.
200. Bowman JM. RhD hemolytic disease of the newborn. *N Engl J Med.* 1998;339:1775-1777.
201. Kennedy MS. Perinatal Issues in transfusion practice in American Association of Blood Banks Technical Manual, 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks,2008 pp 626.
202. Kamenicka H, Zajic T, Bydzovska I. Determination of Fetomaternal Hemorrhage by Flow Cytometry and Red Blood Cell Aliommunization in Pregnancy. *Ann Hematol Oncol* 2018;5 ISSN:2375-7965.
203. Vijay G. Sankaran, Stuart H. Orkin. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3: a011643.

204. Dennis R.Goulet, William M. Atkins. Consideration for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020;109:74-103.
205. Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaides KH et al. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 1996;36:248-255.
206. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Reviews of Reproduction* 1999;4:81-89.
207. Patricia Palmeira, Camila Quinello, Ana Lucia et al. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:985646.
208. Papantoniou N, Sifakis S, Antsaklis A. Therapeutic management of fetal anemia: review of standard practice and alternative treatment options. *J Perinat Med.* 2013;41:71-82.
209. Sankaralingam P. Jain A, Bagga R et al. Red cell alloimmunization in RhD positive pregnant women and neonatal outcome. *Transfus Apher Sci.* 2016;55:153-158.
210. Bujandric N, Milanovic MK. The importance of immunohematology testing in the neonatal period. *Med Pregl* 2013;66:317-321.
211. Judd WJ, Stroup-Walters M. et al. Prenatal and perinatal immunohematology: Recommendations for serological management of the fetus, newborn and obstetrical patient. *Transfusion* 1990;30:175-183.
212. Judd WJ. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology revisited. *Transfusion* 2001;41:1445-52.
213. Marl G, Deter RL, Carpenter RL, for the Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocities in Anemic Fetuses. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med* 2000;342:9-14.
214. White J, Qureshi H, Massey E, Needs M, Byrne G, Daniels G, et al. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfus Med* 2016;26:246-263.
215. Tobian AA, Shirey RS, Montgomery RA, Cai W, Haas M, Ness PM, et al. ABO antibody titer and risk of antibody-mediated rejection in ABO-incompatible renal transplantation. *Am J Transplant* 2010;10:1247-1253.

216. Wagner F.F, Frohmajer A, Flegel W.A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. BMC Genetics 2001;95:2699-2708.
217. Van den Veyver IB, Subramanian SB, Hudson KM, et al. Prenatal diagnosis of the RhD fetal blood type on amniotic fluid by polymerase chain reaction. Obstet Gynecol 1996;87:419-422.
218. Lo YM, Hjelm MN, Fidler CF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998;339:1734-1738.
219. Avent ND, Finning KM, Martin PG, et al. Prenatal determination of fetal blood group status. Vox Sang 2000;78:155-162.
220. Carolina Trucco Boggione, Melina E Jujan Brajiovich et al. Genotyping approach for non-invasive foetal RHD detection in an admixed population. Blood Transfus 2017;15:66-73.
221. Moise KJ, Jr Argoti PS. Management and prevention of red cell alloimmunization in pregnancy. A systematic review. Obstet Gynecol. 2012;120:1132–9.
222. Silvia Manfroi, Chiara Calisesi, Pietro Fagiani et al. Prenatal non-invasive foetal *RHD* genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis. Blood Transfus. 2018;16:514-524.
223. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K(Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. Transfusion. 2007;47:2126–33.
224. Bennet PR, Le Van Kim C, Colin Y, et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. N Engl J Med. 1993;329:607-610.
225. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood-a meta-analysis. Am J Obstet Gynecol. 2006;195:1163-1173.
226. Allen RW, Ward S, Harris R. Prenatal genotyping for the RhD blood group antigen: Considerations in developing an accurate test. Genet test 2000;4:377-381.
227. Pollack JM, Bowman JM. Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh haemolytic disease of the new born. Vox Sang. 1990;59:176–179.
228. Cacciatore A, Rapiti S, Carrara S et al. Obstetric management in Rh alloimmunized pregnancy. J Prenat Med 2009;3:25-27. TITLOI

229. Meghan Delaney, Dana C. Matthews. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus, and newborn. American society of Hematology 2015;1:146-151.
230. Bowman JM, Pollock JM. Amniotic fluid spectrophotometry and early delivery in the management of erythroblastosis fetalis. Pediatrics 1965;35:815-9.
231. Thompson S, Eggington J, Dodd A, et al. Late developing red cell antibodies in pregnancy. Transfus Med. 2003;13:8-9.
232. Heddle NM, Klama L, Frassetto R, et al. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. Transfusion 1993;3:217-220.
233. A Gooch, J. Parker, J. Wray, H. Qureshi. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion. Transfus Med 2007;17:252-262.
234. Spinnato JA. Hemolytic disease of the fetus: A plea for restraint. Obstet Gynecol 1992;80:873-877.
235. Esan AJ. Hemolytic Disorders of the Newborn, Current Methods of Diagnosis and Treatment: A Review Study. J Hematol Blood Transfus Disord 2016;3:008.
236. Jennifer G. Hensley, Katherine P. Conghlin, Laura L. Klein. A Curious Case of anti-D Antibody titer. J. Midwifery Womens Health 2009;54:497-502.
237. Queenan JT. Modern management of the Rh problem. 2nd ed. Hagerstown, MD: Harper and Row 1977.
238. Hackney DN, Knudtson EJ, Rossi KQ et al. Management of pregnancies complicated by anti-c. Obstet Gynecol. 2004;103:24-30.
239. Zuppa AA, Cardiello V, Alighieri G et al. Anti-Rh(c), "little c" isoimmunization: the role of rHuEpo in preventing late anemia. J Pediatr. Hematol Oncol 2013;35:269-271.
240. Joy SD, Rossi KQ, Krugh D. et al. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunisation. Obstet Gynecol 2005;105:24-28.
241. Moran P. Robson SC, Reid MM. Anti-E in pregnancy. Br J Obstet Gynaecol. 2000;107:1436-8.
242. Vijay Kumawat, Ashish Jain, Neelam Marwaha. Hemolytic disease of fetus and newborn due to anti-E alloantibody in a newborn of Rh (D)- positive mother. Asian J Transfus Sci. 2012; 6:187.

243. Albert Franco, M.D. Karen et al. Management of anti- Jka Alloimmunization. J Report Med 2009;54:121-125.
244. Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, et al. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. N Engl J Med 1998;338:798-803.
245. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. Blood 1999;93:4425-4435.
246. Daniels G, Hadley A, Green C, Fetal anaemia due to anti-Kell may result from immune destruction of early erythroid progenitors. Transfus Med. 1999, pp 9-16.
247. Van Wamelen DJ, Klumper FJ, de Haas M, Meerman RH, van Kamp IL Oepkes D. Obstetric history and antibody titer in estimating severity of Kell alloimmunization in pregnancy. Obstet Gynecol. 2007;109:1093–1098.
248. Mc Kenna DS, Nagaraja HN, et al. Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunization. Obstet Gynecol 1999;93:667-673.
249. Al Rivami AZ, Salmani M, et al. Successful management of severe hemolytic disease of the fetus due to anti-Jsb using intrauterine transfusions with serial maternal blood donations: a case report and a review of the literature. Transfusion 2014;54:238-243.
250. Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fya and the potential clinical value of Duffy genotype in pregnancies at risk. Transfus Med 1997;7:301-304.
251. Moise KJ. Non anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2000;92:75-81.
252. Diego Velasco Rodriguez, G. Perez-Segura, et al. Hemolytic Disease of the newborn due to anti-Jkb: Case Report and REVIEW OF THE Literature. Indian J Hematol Blood Transfusion 2014;30:135-138.
253. Eun Jung Beak, Mr Sung Charn Park et al. Hemolytic Disease of Newborn Due to anti-Jka and the Duration of Antibody Persistence. Journal of Paediatrics and Child Health. 2013;49:101-102.
254. Judd WJ. Methods in immunohematology. 2nd ed. Durham, NC: Montgomery Scientific Publications; 1994.
255. Stetson B, Scrape S, Markham KB. Anti-M Alloimmunization: Management and Outcome at a Single Institution. AJP Rep 2017;7:205-210.

256. Yasuda H, Otho H et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn with late-onset anemia due to anti-M: a case report and review of the Japanese literature. *Transf Med Rev* 2014;28:1-6.
257. Crispin P, Sliwinski K, Wilson C et al. Cold reacting anti-M causing delayed hemolytic disease of the newborn. *Transfusion* 2019;59:3575-3579.
258. Deirdre De Santis. Anti U Antibodies During Rregnancy with mild Hemolytic Disease of the Newborn. *Laboratory Medicine* 1999;30:170-175.
259. Smith G, Knott P. et al. Anti-U and hemolytic disease of the fetus and newborn. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:1318-1321.
260. Squires A, Nasef N, et al. Hemolytic disease og the newborn caused by anti-Wright (anti-Wra): case report and review of literature. *Neonatal Netw* 2012;31:69-80.
261. Van Dijk BA, Dooren MC, Overbeeke MA. Red cell antibodies in pregnancy:There is no "critical titre". *Transfus Med* 1995;5:199-202.
262. Engelfreit CP, Reesink HW, Bowman J. et al. Laboratory procedures for the prediction of the severity of hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1995;69:61-69.
263. Lucas GF, Hadley AG, Nance SJ. Et al.Predicting hemolytic disease of the newborn: A comparion of the monocyte monolayer assay and the chemiluminescence test. *Rransfusion* 1993;33:484-487.
264. Sacks DA, Nance SJ, Garratty G, et al. Monocyte monolayer assay as a predictor of severity of HDN of the fetus and newborn. *Am J Perinatol* 1993;10:428-431.
265. Hadley AG, Wilkes A, Goodrick J, et al. The ability of the chemiluminescence test to predict clinical outcome and the necessity for amniocenteses in pregnancies at risk of hemolytic disease of the newborn. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:231-234.
266. Bowman JM. Hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1996;70:62-67.
267. Oepkes D, van Kemp IL, Simon MJG, et al. Clinical value of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assay in the management of Rh D alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1015-1020.
268. Queenam JT, Tomai TP, Ural SH, King JC, Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14 to 40 weeks gestation: A proposal for clinical manadement. *Am J Obsten Gynecol* 1993;168:1370-1376.

269. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee for Quality Improvement and Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Practice parameter: Management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn. *Pediatrics* 1994;94:558-65.
270. Bub CB, Aravechia MG, Costa TH, Kutner JM, et al. RHD alleles among pregnant women with serologic discrepant weak D phenotypes from a multiethnic population and risk of alloimmunization. *J Clin Lab Anal* 2018 ;32(1).
271. C. Milkins, J. Berryman et al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfus Med* 2013;23:3-35.
272. Dake LR, Judd WJ. Weak D testing DAT-positive infants born to Rh-negative women in cases of fetal-maternal ABO incompatibility. *Transfusion* 2002;42:108S.
273. Kristinsdottir T, Kiartansson S, et al. Positive Coombs test in newborns; causes and clinical consequences. Summary of cases diagnosed in the Blood Bank in the year 2005 to 2012. *Laeknabladid* 2016;102:326-331.
274. Kein A, Agpalo M et al. How to use: the direct antiglobulin test in newborns. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2015;100:198-203.
275. Dinesh D. Review of positive direct antiglobulin tests found on cord blood sampling. *J Paediatr Child Health* 2005;41:504-507.
276. Feng CS, Kirkley KC, Eicher CA, et al. The Lui elution technique. A simple and efficient method for eluting ABO antibodies. *Transfusion*. 1985;25:433-434.
277. Zantek ND, Scott A et al. The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol* 2012;87:707-709.
278. Jeon H, Calhoun B, Pothiwala M, Herschel M, Baron BW. Significant ABO haemolytic disease of the newborn in a group B infant with a group A2 mother. *Immunohematology* 2000;16:105-8.
279. Ashif Jethava, Esperanza Olivares et al. A case of Hemolytic Disease of the Newborn due to Dia Antibody. *Case Rep Pediatr* 2015;2015:897803 doi 10.1155/2015/897803.
280. Moise KJ. Non anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;92:75-81.
281. Sentinel Event Alert. Kernicterus threatens healthy newborns. Oakbrook Terrace, IL: Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations, 2001, (chapter)18

282. Shulman IA, Calderon C, Nelson JM, Nakayama. R. The routine use of Rh-negative reagent red cells for the identification of anti-D and the detection of non-D red cell antibodies. *Transfusion* 1994;34:666-670.
283. Charles M. Stedman, Judy C. Baudin, Charles A. White et al. Use of the erythrocyte rosette test to screen for excessive fetomaternal hemorrhage in Rh-negative women. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:1363-1369.
284. Yeowon A. Kim, Robert S. Makar. Detection of fetomaternal hemorrhage. *Hematology* 2012, pp 417-423.
285. De la Cámara C, Arrieta R, González A, Iglesias E, Omeñaca F: High-dose intravenous immunoglobulin as the sole prenatal treatment for severe Rh immunization. *N Engl J Med* 1988;318:519-520.
286. Berlin G, Selbing A, Ryden G: Rhesus haemolytic disease treated with high-dose intravenous immunoglobulin. *Lancet* 1985;i:1153.
287. Gottvall T, Selbing A: Alloimmunization during pregnancy treated with high dose intravenous immunoglobulin. Effects on fetal hemoglobin concentration and anti-D concentrations in the mother and fetus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:777-783.
288. Porter TF, Silver RM, Jackson GM, Branch DW, Scott JR: Intravenous immune globulin in the management of severe Rh D hemolytic disease. *Obstet Gynecol Surv* 1997;52:193-197.
289. Ballow M: Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin therapy and potential use in autoimmune connective tissue diseases. *Cancer* 1991;68:1430-1436.
290. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, et al. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfus Med* 2014;24:8-20.
291. Deepti Jain. Rh isoimmunized pregnancy managed noninvasively: A report of two cases. *Int J Appl Basic Med Res* 2017;7:73-76.
292. Lubusky M, Simetka O, Studnickova M et al. Fetomaternal hemorrhage in normal vaginal delivery and in delivery by cesarean section. *Transfusion* 2012;52:1977-1982.
293. Lubusky M, Simetka O, Studnickova M et al. Fetomaternal hemorrhage in delivery by cesarean section. *Ceska Gynecol* 2012;77:156-162.
294. Aitken SL, Tichy EM. Rh(O)D immune globulin products for prevention of aloimmunization during pregnancy. *Am J Health Syst Pharm*. 2015;72:267-276.

295. Samson D, Mollison PL. Effect on primary Rh-immunization of delayed administration of anti-Rh. *Immunology* 1975;28:349.
296. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Prevention of Rh alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can.* 2003;25:765–73.
297. Okwundu CL, Afolabi BB. Intramuscular versus intravenous anti-D for preventing Rhesus alloimmunization during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;1:CD007885.
298. Hall AM, Cairns LS, Altmann DM, et al. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLA-transgenic mice. *Blood* 2005;105:2175-2179.
299. Bicher J, Schondorfer, G., Pabst, G. & Andresen, I. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2003;110:39– 45.
300. Eklund J, Hermann, M., Kjellman, H. & Pohja, P. Turnover rate of anti-D IgG injected during pregnancy. *British Medical Journal* 1982; 284: 854– 855.
301. Mollison P.L., Engelfreit, C.P. & Contreras, M. No value in immune anti-A or anti-B in predicting HDFN. In: *Blood Transfusion in Clinical Medicine* (10 edn), Blackwell Oxford 1997, pp 418– 424.
302. Toki D, Ishida H, Horita S, Yamaguchi Y, Tanabe K. Blood group O recipients associated with early graft deterioration in living ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation* 2009;88:1186-1193.
303. Kobayashi T, Saito K. A series of surveys on assay for anti-A/B antibody by Japanese ABO-incompatible Transplantation Committee. *Xenotransplantation* 2006;13:136-140.
304. Shin JH, Lee JY, Kim JH, Kim HR, Lee JN. Screening and identification of unexpected red cell antibodies by simultaneous ISS/Coombs and NaCl/Enzyme gel methods. *J Korean Med Sci* 2009;24:632-635.
305. Knight RC, de Silva M. New technologies for red-cell serology. *Blood Rev* 1996;10:101-110.
306. Susan Rolish et.al. Antibody detection errors due to acidic or unbuffered saline. *Immunohematology* 1993;9:15-18.
307. Bruce M, et. al. A serious source of error in antiglobulin testing. *Transfusion* 1986;26:177-181.

308. Yousef H Atlanta, Denise E Jackson. Pre-transfusion serological testing: are we doing it right? *Hematology & Transfusion International Journal* 2015;1:53-55.
309. Melanie J. Adriansen, Holly E Perry. Validation of column agglutination technology for blood group alloantibody titration. *Med Lab* 2013, pp 92-96.
310. Fink R, ui-Deguzman C, Teng SM, Davis R, Yuan S. Comparison of a gel microcolumn assay with the conventional tube test for red blood cell alloantibody titration. *Transfusion* 2013;53:811-815.
311. Roback JD CM, Grossman BJ, Hillyer CD. Technical mamual. American Association of Blood Banks; In. 16th ED ed: American Association of Blood Banks; Bethesda (MD);2008.
312. Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, et al. Streamling ABO antibody titrations for monitoring ABO- incompatible Kidney transplants. *Transfusion* 2010;50:631-634.
313. Nidhi Mechta, Ishita R Chakraborty et al. Verification of column agglutination technology with conventional tube technology for naturally occurring antibody titration. *Global Joyrnal of Transfusion Medicine* 2016;1:46-50.
314. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:1194-1201.
315. Duez A, Flourie F, Garraud O. Antibodies titration for immunized pregnant women: Convantional tube test or gel microcolumn assay. *Transfusion* 2014;54:1200.
316. Thakur MK, Marwaha N, Kumar P, Saha SC, Thakral B, Sharma RR, et al. Comparison of gel test and conventiona tube test for antibody detection and titration in D-negative pregnant women: study from a tertiary-care hospital in North India. *Immunohematology* 2010;26:174-177.
317. Harvey G. Klein and David J. Anstee. The Rh blood group system. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 12th ed. 2014, pp 167-213.
318. Walker PS. Identification of antibodies to red cell antigens. In: Roback j, Combs MR, Grossman BJ, et al. *Technical Manual* 17th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks;2011.
319. Peggy Jensen. Antibody Titration. *AABB Technical Manual* 14th ed. 2003 pp 697-700, 730-731.
320. AuBuchon JP, Wildt-Eggen J et.al. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Vox Sang.* 2008;95:57-65.

321. Brecher ME. Antibody Titration studies to Assist in Early Detection of Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn. Techicam manual 15th ed. AABB 2005;5:795-798.
322. DiMaggio C. SAS for epidemiologists: applications and methods. New York: Springer;2013.
323. Raghavachari M. Measures of Concordance for Assessing Agreement in Ratings and Rank Order Data. In: Advances in Ranking and Selection, Multiple Comparisons, and Reliability. Edited by Balakrishnan N, Nagaraja HN, Kannan N: Birkhauser Boston 2005, pp 245-263.
324. Zwiers C, Koelewijn JM, Vermil L, Van Sambeeck et al. ABO incompatibility and RhIG immunoprophylaxis protect against non-D alloimmunization by pregnancy. Transfusion 2018;58:1611-1617.
325. Meghan Delaney, Dana C. Matthews. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus, and newborn. ASH Education Book 2015;1:146-151.
326. Hackney DN, Knudtson EJ, Rossi KQ, et al. Management of pregnancies complicated by anti-c isoimmunization. Obstet Gynecol 2004;103:24-30.
327. Moise KJ. Hemolytic disease of the fetus and newborn. In: Creasy RK, Resnik R. Maternal-fetal Medicine: Principles and Practice. 6th edition. Philedelphia: WB Saunders;2008, pp 477-503
328. Christopher D. Hillyer, Ronald Strauss et al. JMH Blood Group System/Cost Blood Group collection. Handbook of Pediatrics Transfusion Medicine 2004;4:59-60.
329. Daniels G, Hadley A, Green CA. Causes of fetal anemia in hemolytic disease due to anti- K. Transfusion 2003;43:115-16.
330. Shyam Sundar Mina, Rashmi Bhardwaj, Shobhna Gupta. Hemolytic disease of newborn: Can think beyond Rh(D) and ABO incompatibilities. Journal of Clinical Neonatology. 2017;6:37-39.
331. Strauss RG. Hemolytic disease of the fetus/newborn: reflections on articles from Transfusion Volume 1. Transfusion 2010;50:748-751.
332. Seon Joo Kang, Young Ae Lim. Comparison of ABO Antibody Titers on the Basis of the Antibody Detection Method Used. Ann Lab Med. 2014;34:300-306.
333. A Dubey, A. Sonker et al. Comparative evaluation of gel column agglutination and erythrocyte magnetized technology for red blood cell alloantibody titration. Immunohematology 2015;31:1-6.

334. Rumsey DH, Ciesielski DJ. New protocols in serologic testing: a review of techniques to meet today's challenges. *Immunohematology* 2000;16;131-137.
335. Cid J, Nogues N, Montero R, Hurtado M, Briega A, Parra R. Comparison of three microtube column agglutination systems for antibody screening: DG Gel, DiaMed-ID and Ortho BioVue. *Transfus Med* 2006;16:131-136.
336. Chang C, Brown M, Davies L, Pointon L, Brown R, Barker D. Evaluation of Erytra(R) fully automated analyser for Routine Use in Transfusion laboratory. *Transfus Med* 2014;24:33-38.
337. Weisbach V, Kohnhauser T, Zimmermann R, Ringwald J, Strasser E, Zingsem J, et al. Comparison of the performance of microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strength solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies. *Transfus Med* 2006;16:276-284.
338. Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, Chhibber V, Ness PM, King KE. Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Transfusion* 2010;50:631-634.
339. Bromilow IM, Adams KE, Hope J, Eggington JA, Duguid JK. Evaluation of the ID-gel test for antibody screening and identification. *Transfus Med* 1991;1:159-161.
340. Cheng D, Hao Y. Comparative evaluation of the microcolumn gel card test and the conventional tube test for measurement of titres of immunoglobulin G antibodies to blood group A and blood group B. *J Int Med Res* 2011;39:934-943.
341. Raos M, Novoselac J, Burnac IL, Lukic M, Leskovic I, Goubic Cepulic B. Evaluation of antibody screening and identification pre-transfusion tests using DG Gel cards. *J. appl. Health sci.* 2018;4:179-186.
342. Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, Bonifacio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. *J ClinLab Anal* 2004;18:255-258.
343. Weisbach V, Ziener A, Zimmermann R, Glaser A, Zingsem J, Eckstein R. Comparison of the performance of four microtube column agglutination systems in the detection of red cell alloantibodies. *Transfusion* 1999;39:1045-1050.
344. P.L.Mollison, Marcela Contreras. Haemolytic transfusion reactions. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine* 2005;11:455-494.

345. Garrett S. Booth, Eric A. Gehrie, Charles D. Bolan, Bipin N. Savani. Clinical Guide to ABO-Incompatible Allogeneic Stem Cell Transplantation Biol Blood Marrow Transplant 2013;19:1152-1158
346. Johanna Maria Koelewijn, Yolentha Maria Slootweg, Claudia Folman, et.al. Diagnostic value of laboratory monitoring to predict severe hemolytic disease of the fetus and newborn in non-D and non-K-alloimmunized pregnancies. Transfusion 2019;9999:1-9.
347. Lomas-Francis C, Reid ME. The Rh blood group system: The first 60 years of discovery. Immunohematology 2000;16:7-17.
348. Huang CH, Liu PZ, Cheng JG. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Semin Hematol 2000;37:150-65.
349. Lin M, Wang CL, Chen FS, et al. Fatal hemolytic transfusion reaction due to anti-Ku in a Knull patient. Immunohematol 2003;19:19-21
350. Judd WJ, Johnson ST, Storry JR, eds. Judd's Methods in Immunohematology. 3rd ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks;2008.
351. Cooling L, Downs T. Immunohematology. In: Mc Pherson RA, Pineus MR, eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders;2011.
352. Lee S, Russo D, Redman C. Functional and structural aspects of the Kell blood group system. Transfus Med Rev 2000;14:93-103.
353. Middleton SJ, Pither C, Gao R, Duncan S, Green J, Sharkey L, et al. Adult small intestinal and multivisceral transplantation: lessons through the "retrospecto-scope" at a single UK centre from 1991 to 2013. Transplant Proc. 2014;46:1839-1841.
354. Guideline on Clinical investigation of immunosuppressants for solid organ transplantation, EMEA, London, 28th July 2008, Doc, Ref. CHMP/EWP/263148/06.
355. A.R. Huber, G.T. Leonard et al. Case Report: moderate hemolytic disease of the newborn due to anti G. Immunohematology 2006;22:166-170.
356. S.T. Chey, C.M. Westhoff. The Rh and RhAG blood group system. Immunohematology 2010;26:178-186.
357. Dehua Wang, Catherine Lane et al. Prevalence of RhD Variants Confirmed by partial Molecular Genotyping in a Multiethnic Prenatal Population. American Journal of Clinical Pathology 2010;134:438-442.

358. Katharine A Downes. Pretransfusion Testing. AABB Technical Manual 2010;15:437-460.
359. Esther HL Chan, Thiow Christofer, et al. Evaluation of Blood Group Conversion Following ABO-Incompatible Hematopoietic Stem Cell Transplantation(HCT). Blood 2014;124:1557.
360. Mariam EL Wafi, Houria EL House et al. Prevalence of weak D phenotype among D negative C/E+ blood donors in Morocco. Int J Blood Transfus Immunohematol 2016;6:3–7.
361. Leili Moezzi, Zeinab Keshavarz, Reza Ranjbaran et al. Fetal *RHD* Genotyping Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Cell-Free Fetal DNA in Pregnancy of RhD Negative Women in South of Iran. Int J Fertil 2016;10:62-70.
362. Tippet P.A. speculative model for the Rh blood groups. Ann Hum Genet 1986;50:341-247.
363. Watkins WM. The Blood group system: Historical background. Transfusion Med. 2001;11:243-265.
364. Fehr T, Stussi G. ABO-incompatible kidney transplantation. Curr Opin Organ Transplant. 2012;17:376-385.