



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TALASEMİ MAJÖR'LÜ HASTALARDA ERİTROSİT
ANTİJENLERİNE KARŞI ALLOANTİKOR GELİŞME SIKLIĞI VE
DAĞILIMI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Zeliha ÖZDEMİR
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Ziya BAYRAKTAROĞLU**

Aralık-2008

**T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TALASEMİ MAJÖR'LÜ HASTALARDA ERİTROSİT
ANTİJENLERİNE KARŞI ALLOANTİKOR GELİŞME SIKLIĞI VE
DAĞILIMI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Zeliha ÖZDEMİR
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Ziya BAYRAKTAROĞLU**

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TALASEMİ MAJÖR'LÜ HASTALARDA ERİTROSİT ANTİJENLERİNE KARŞI ALLOANTİKOR GELİŞME SIKLIĞI VE DAĞILIMI

Dr. Zeliha ÖZDEMİR

Aralık-2008

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....

Prof. Dr. Ayşe BALAT

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....

Prof. Dr. M.Yavuz ÇOŞKUN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....

Prof. Dr. Ziya BAYRAKTAROĞLU

Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof.Dr. Ziya BAYRAKTAROĞLU
2. Prof.Dr. İrfan KUTLAR
3. Doç. Dr. Özlem KESKİN
4. Doç.Dr. Mehmet KESKİN
5. Yrd.Doç.Dr. Ercan KÜÇÜKOSMANOĞLU

ÖNSÖZ

Gaziantep Üniversitesi Rektörü ve aynı zamanda Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Prof. Dr. M.Yavuz ÇOŞKUN 'a,

Bu tezi hazırlarken, verdiği bilimsel katkılarından ve kişisel desteklerinden ötürü tez hocam Prof. Dr. Ziya BAYRAKTAROĞLU'na,

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı sevgili hocam Prof. Dr. Ayşe BALAT'a,

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sürekli olarak tecrübelerinden faydalandığım ve yetişmemde büyük emeği geçen tüm hocalarıma,

Tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen kan bankası çalışanlarına,

Birlikte büyük bir uyum ve zevkle çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma ve hastane çalışanlarına,

Bugünlere gelmemde emeği geçen ve sevgileriyle her zaman yanımda olan aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Zeliha ÖZDEMİR
Gaziantep 2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
TABLO LİSTESİ.....	VIII
1- GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2- GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TALASEMİLER.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Talasemi sıklık ve dağılımı.....	3
2.1.3. Talasemi sendromlarının klinik sınıflaması.....	3
2.1.3.1. Alfa talasemiler.....	4
2.1.3.2. Beta talasemiler.....	4
2.2. Genel immünohematoloji.....	4
2.2.1. Kan grubu antikorları.....	4
2.2.2. Antikor oluşumunun sebepleri.....	4
2.2.3. Antijen antikor ilişkileri.....	5
2.2.4. Kan grubu antikorlarının klinik önemi.....	5
2.2.5. Antikorlarla eritrosit yıkımı.....	6
2.3. ABO kan grup sistemi.....	6
2.3.1. ABO antikorları.....	7
2.3.2. Diğer kan grubu sistemleri.....	7
2.3.3. KELL kan grubu sistemi.....	8
2.3.4. Duffy kan grubu sistemi.....	8
2.3.5. Kidd kan grubu sistemi.....	9

	Sayfa
2.3.6. MNSs kan grubu sistemi	9
2.3.7. Lewis kan grubu sistemi.....	10
2.3.8. Lutheran kan grubu sistemi	11
2.3.9. P grup sistemi.....	12
2.3.10. Globosid kan grup koleksiyonu.....	12
2.3.11. Li kan grup koleksiyonu.....	13
2.3.12. Yüksek frekanslı kan grupları.....	14
2.3.13. Yüksek titreli düşük aviditeli kan grupları (HTLA).....	14
2.3.14. Düşük frekanslı kan grupları.....	14
2.4. Kan grup antikorlarını tanımlama teknikleri.....	14
2.4.1. Eritrosit aglutinasyonu ile kan grup antikorlarının taranması.....	14
2.4.2. İnkomplet antikorlarla aglutine eritrositlerin sensitizasyonu.....	15
2.4.2.1. Eritrosit çevresindeki su örtüsünü ve iyonik bulutu azaltmak.....	15
2.4.2.1.1. Albumin.....	15
2.4.2.1.2. Polibren.....	15
2.4.2.1.3. Proteolitik enzimler.....	16
2.4.2.2. Antijen antikor arasındaki bağın güçlenmesi... ..	16
2.4.2.2.1. PEG.....	16
2.4.2.2.2. LISS.....	16
2.4.2.3. Antikor moleküllerinin birbirini ile bağlanması: Antiglobulin test.....	16
2.4.2.3.1. İndirekt Antiglobulin Testi	17
2.5. Eritrosit antikorlarının taranması : Tüpten kolona kadar.....	19
2.5.1. Antikor tarama ve tanımlama için Solit faz mikrotitre plak metodu.....	20
2.5.1.1. Capture R mikro titre plak tekniği.....	20
2.5.1.2. Solit tarama mikro titre plak tekniği.....	20

2.6.	Transfüzyon öncesi karşılaştırma testleri.....	20
2.6.1.	Karşılaştırma testleri.....	20
2.7.	Antikor tarama	21
2.7.1.	Antikor taramanın avantajları.....	23
2.7.2.	Tipleme ve tarama stratejisi.....	23
2.8.	Eritrosit antikorlarının tanımlanması.....	24
2.9.	Antikorların dışlanması.....	24
2.10.	Pozitif reaksiyonların değerlendirilmesi.....	25
2.11.	Bulunan antikorların doğrulanması.....	25
2.12.	Fisher'in tam metodu.....	25
3-	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1.	Çalışmanın yürütülmesi.....	27
3.2.	Sonuçların yorumlanması	28
4-	BULGULAR.....	30
5-	TARTIŞMA.....	32
6-	KAYNAKLAR.....	38

ÖZET

TALASEMİ MAJÖR'LÜ HASTALARDA ERİTROSİT ANTİJENLERİNE KARŞI ALLOANTİKOR GELİŞME SIKLIĞI VE DAĞILIMI

Dr. Zeliha ÖZDEMİR

Uzmanlık Tezi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Ziya BAYRAKTAROĞLU

Aralık-2008, 47 sayfa

Talasemi, hemoglobin yapısına giren globin zincirlerinden birinin veya daha fazlasının yapılamaması veya az miktarda yapılması ile karakterize bir grub kalıtsal hastalıktır. Talasemili hastalarda sık transfüzyon neticesinde eritrosit antijenlerine karşı alloimmünizasyon gelişmesi önemli bir sorundur. Bizim bu çalışmadaki amacımız eritrosit antikor sıklığı oranının, fenotipik transfüzyona ihtiyaç gösterecek kadar yüksek olup olmadığını tespit etmektir. Çalışma Ocak 2007 ile Haziran 2008 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasında yapıldı. Çalışmaya 72'si pediatrik yaş grubunda 14'ü erişkin yaş grubunda olmak üzere toplam 86 hasta alındı. Çalışmanın başlangıcında 72 pediatrik vakanın 5'inde (%6.9), 14 erişkin vakanın 3'ünde (%21.4), toplamda ise 86 hastanın 8'inde (%9.3) IAT testi pozitif bulundu. Onsekiz aylık çalışma süresi içerisinde IAT testi negatif olan pediatrik vakaların 4'ünde testin pozitifleştiği görülmüştür. Süre sonunda 72 pediatrik vakanın 9'unda (%12.5), toplamda ise 86 hastanın 12 tanesinde (%13.9) IAT testi pozitif bulundu. Alloantikor gelişimi açısından kadın ve erkek arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca alloantikor gelişme sıklığı yaşa göre bir fark göstermedi. Pediatrik yaş grubuna göre ise dağılım şu şekildedir; Anti-K %44.4, anti-C %22.2, anti-E %11.1, anti-D% 11.1 ve anti-Fy^a %11.1 dir. Bir vakada birden fazla antikor profili varken, antikorların sadece biri tanımlanabilmiştir. Erişkin yaş grubunda ise; Anti-E %66.6, anti-D %33.3 bulunmuştur. Sonuç olarak talasemili hastalarda antikor tarama testleri düzenli olarak yapılmalı ve transfüzyon politikaları, lökosit filtrasyonu ve fenotipik eşleştirme açısından yeniden değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: Talasemi, Alloantikor

ABSTRACT
ALLOANTIBODY FORMATION AND DISTRIBUTION OF THALASSEMIA
MAJOR PATIENTS

Dr. Zeliha ÖZDEMİR
Residency Thesis, Department of Pediatrics
Supervisor: Prof. Dr. Ziya BAYRAKTAROĞLU
December-2008, 47 Pages

Thalassemia is a hereditary disorder that is characterized by minimal production of globulin chains or restricted production of more globulin chains, that constitute hemoglobin structure. Development of alloimmunization against erythrocyte antigens is an important problem in thalassemic patients. In this study our aim is detecting ratio of erythrocyte antibody frequency and try to find out whether the frequency of antibody production is enough to apply phenotypic transfusion. The study is carried out at Blood Bank in Gaziantep University Medicine Faculty between January 2007-June 2008. Totally 86 patients, 72 of them at pediatric age group, 14 of them at adult age group are taken into study. At the beginning of the study 5 of 72 pediatric patients(6.9%), 3 of 14 adult patients (21.4%) and totally 8 of 86 patients (9.3%) have been found IAT test positive. During 18 months study period among the IAT test negative cases, four of them were converted to positive. At the end of the duration 9 of 72 pediatric cases (12.5%), totally 12 of 86 cases (13.9%) IAT test is found positive. No significant difference is detected about alloantibody development between men and women. The distribution for pediatric age group is as follows; Anti-K 44.4%, anti-C 22.2%, anti-E 11.1%, anti-D 11.1% and anti-Fya 11.1%. Only one of the antibodies can be determined while there are more than one antibody profile in one case. In adult age group; Anti-E was found 66.6%, anti-D was found 33.3%. Finally antibody screening tests must be done regularly to the thalassemic patients and new perspectives must be observed for transfusion politics, leukocyte filtration and phenotypic equalization.

Keywords: Thalassemia, Alloantibody.

KISALTMALAR

mRNA	: Messenger ribonükleik asit
IgM	: İmmünglobulin M
IgG	: İmmünglobulin G
2-AET	: 2 amino-ethyl-isothiouronium bromide
DTT	: Dithiotreitol
DAT	: Direkt antiglobulin testi
IAT	: İndirekt Antiglobulin Test
PEG	: Polietanolglükol
AET	: 2-Aminoethylisothiouronium
HFA	: High Frequency Antigens
HTLA	: High-titer, low avidity
LFA	: Low Frequency Antigens
ISBT	: International Society of Blood Transfusion
PEG-IAT	: Polyethylene Glycol-İndirekt Antiglobulin Test
LISS-IAT	: Low ionic strength saline- İndirekt Antiglobulin Test
BSA	: Bovine Serum Albumin
pH	: Asit-baz ölçüsü
p	: Olasılık değeri
HLA	: Human Leukocyte Antigen
NaN₃	: Sodyum azot 3
cc	: Sıvı birimi
Rh	: Rhesus faktör
AABB	: American Association of Blood Banks

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Alloantikör ve otoantikörlerin saptanması	28
Tablo 2. Reaksiyon gücü ile agglutinasyon arasındaki ilişki.	35
Tablo 3. Yaşa göre alloantikör dağılımı.....	38
Tablo 4. Değişik çalışmalardaki yapısal farklılıklar.....	41
Tablo 5. Literatürdeki bazı çalışmalarda alloantikör dağılımı.....	43

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi, hemoglobin yapısına giren globin zincirlerinden birinin veya daha fazlasının yapılamaması veya az miktarda yapılması ile karakterize bir grub kalıtsal hastalıktır. Değişik klinik ve biyokimyasal özellik gösteren çeşitli talasemi tiplerinde hemoglobinin farklı polipeptit zincirlerinde (alfa, beta, gama veya delta) yapım kusuru bulunur. En sık görülen genetik tipler alfa ve beta zincirleri ile ilgilidir. Beta talasemi geni Akdeniz ülkelerinde yaygın olduğu için hastalık Akdeniz anemisi olarak da isimlendirilir. Beta talasemilerin en ciddi formu Talasemi majördür. Bu hastalıkta yaşam ancak sık aralıklarla yapılan eritrosit transfüzyonları ile mümkündür. Düzenli aralıklarla yapılan eritrosit transfüzyonları sonucunda vucutta demir birikimi meydana gelir ve atım için fizyolojik bir ortam yoktur. 100 cc eritrosit süspansiyonu yaklaşık 120 mg hemoglobin demiri içerir. Hipertransfüzyon sağaltımı alan Talasemi majörlü bir hastanın bu şekliyle 140-180 mg/kg/yıl demir aldığı söylenebilir. Demir birikimi başlangıçta retikuloendotelial alanlarda olur, fakat bu alanlar dolduğunda parankimal hücrelerde birikim başlar. Kalp, karaciğer ve endokrin organların fonksiyonunu bozar; morbidite ve mortaliteden çoğunlukla karaciğer yetmezliği ve kardiyak toksisite sorumludur.

Talasemili hastalarda sık transfüzyon neticesinde eritrosit antijenlerine karşı alloimmünizasyon gelişmesi önemli bir sorundur. Transfüzyon ile alınan yabancı eritrositlerle maruziyet sonrasında genelde IgG formunda antikorlar gelişir ve bu antikorlar donör eritrositlerinde hasara neden olurlar ve hemoliz görülür. Bu durumda hastalar daha sık eritrosit transfüzyonu almaya ihtiyaç duyarlar. Sık eritrosit transfüzyonu ve hemoliz sonucunda hastalarda görülen en önemli komplikasyon demir birikimidir. Bu açıdan alloantikorların tanımlanması ve tespit edilen alloantikor negatif kanın hastaya verilmesi ile hemoliz ve dolayısıyla eritrosit transfüzyon sıklığı azaltılabilir.

Bizim bu çalışmadaki amacımız, yöremizdeki talasemi hastalarında eritrosit antijenlerine karşı gelişen alloantikör sıklığını tespit edebilmek ve transfüzyon politikasını yeniden yapılandırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TALASEMİLER

2.1.1. Tanım

Talasemi, insan hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinden birinin veya daha fazlasının yapılamaması veya az miktarda yapılması ile ortaya çıkan otozomal resesif geçiş gösteren bir grup hastalıktır (1).

2.1.2. Talasemi Sıklık ve Dağılımı

Talasemi, çeşitli ülkelerde ve aynı ülkenin farklı bölgelerinde dağılım bakımından farklılık gösterir. Akdeniz ülkelerinde batıya gidildikçe sıklığı azalır (2). Ülkemizde ilk kez 1941'de bildirilmiştir, ancak özellikle 1950'den sonra üzerinde daha fazla durulmuştur(3,4). Türkiye' de β -talasemi taşıyıcılığı 1971'de Çavdar ve ark. ve Dinçel ve ark. nın Türkiye genelinde sürdürdüğü çalışmada %2.1 olarak gösterilmiştir (5,6). Daha sonra yapılan birçok çalışmada bölgesel farklılıkların %3.4 ile %11 arasında değiştiği gösterilmiştir (7,8).

2.1.3. Talasemi Sendromlarının Klinik Sınıflaması

A-Alfa Talasemiler

- 1) Sessiz (hafif) alfa taşıyıcılığı (alfa talasemi-2)
- 2) Ağır alfa taşıyıcılığı (alfa talasemi-1)
- 3) Hemoglobin H hastalığı
- 4) Hidrops fetalis

B-Beta talasemiler

- 1) Talasemi majör
- 2) Talasemi intermedia
- 3) Talasemi minör
- 4) Talasemi minima

2.1.3.1. ALFA TALASEMİLER

Homolog kromozomların her birinde 2 alfa geni bulunmak üzere toplam 4 fonksiyonel alfa geni bulunmaktadır. Alfa talasemilerde tanımlanan moleküler defektler genellikle gen delesyonlarıdır (1).

2.1.3.2. BETA TALASEMİLER

Beta talasemilerin tüm tiplerinde ortak nokta, beta globin zincirlerini kodlayan messenger ribonükleik asit (mRNA)'nın fonksiyonel kapasitesinde azalmadır (9).

2.2. GENEL İMMÜNOHEMATOLOJİ

Tüm insan hücre membranlarının yüzeyinde çok farklı sayıda antijen bulunabilir. Bu membran yapıları protein, karbonhidrat, yağ ve bunların kombinasyonunu içeren yüksek moleküler bileşiklerden oluşur, bu antijenler çok önemli fonksiyonlara sahiptir.

Pratikte kan grubu terimi temel olarak eritrosit membran üzerindeki antijenler için kullanılır. Kan grubu kelimesi bir genin belli alellinin ürünü olarak oluşan eritrosit antijeni anlamına gelir, şu an 250' den fazla kan grubu antijeni bilinmektedir (10).

2.2.1. Kan Grubu Antikorları

Kan grubu antijenleri kan transfüzyonu sonrası antikor oluşumuna sebep olabilir, çoğunlukla plazmada ama bazen diğer vücut sıvılarında bulunur. Kan grubu antikorları; antijenin orijinine, antikorun oluşum sebebine veya antikorun serolojik davranışına göre farklı yollarla sınıflandırılır. Antijen orijinine göre; allo ve otoantikorlar oluşur. Alloantikorlar farklı bir bireyden alınan antijenlere karşı oluşan antikorlardır, otoantikorlar ise bireyin kendi antijenlerine karşı oluşan antikorlardır (11,12).

2.2.2. Antikor Oluşumunun Sebepleri

Doğal yolla oluşan antikorlar, kan grubu antijenleri ile yakın benzerliği olan antijenlerin etkisi ile oluşur (çoğunlukla intestinal bakterilerden orijin alırlar) ve asla yabancı eritrositlerle temasa girmezler. Bilinen bir immünizasyon ile örneğin; kan transfüzyonu veya gebelik sonucu oluşan antikorlara ise immün antikorlar denir ama bu terim doğru değildir, tüm antikorlar zaten immün antikorlardır. Kan transfüzyonunun rutin amaçları arasında hem donör hemde alıcının kan gruplarını belirlemek önemlidir. Kan transfüzyonları dışında immünizasyon hamilelik sonucunda da ortaya çıkabilir. Hamilelik süresi boyunca veya özellikle çocuğun doğumu sırasında bir miktar kan çocuktan anne dolaşımına geçer. Çocuk hem babadan hem anneden gelen antijenleri içerdiğinden eritrositlerinde anneye yabancı antijenler bulunabilir, annede bu antijenlere

karşı antikor üretebilir, oluşan antikorlar immün antikorlardır. Doğal yolla oluşan antikorlar ve immün antikorlar serolojik karakterlerine göre birbirlerinden ayrılır. Doğal yolla oluşan antikorlar sıklıkla düşük ısıda reaksiyon gösterirler ve immünglobulin M (IgM) yapısına girerler, ancak immünglobulin G (IgG) yapısında olan doğal antikorlar da bulunmaktadır. İmmün antikorlar ise genellikle 37°C reaksiyona girerler ve IgG sınıfındadır (13).

2.2.3. Antijen Antikor İlişkileri

Klasik örneği anahtar kilit ilişkisidir. Antijenin karşılık gelen antikora aktif bağlanması iki kimyasal yapının basitçe ve kazara çiftleşmesidir, antijen ve antikor arasındaki bu reaksiyon reversibledir (14).

2.2.4. Kan Grub Antikorlarının Klinik Önemi

Eritrosit antikorlarını invitro tanımlamak önemlidir, çünkü bu antikorlar invivo olarak antijen taşıyan eritrositlerin yıkımını hızlandırır. Eritrosit antikorları üç farklı istenmeyen durum oluştururlar.

A. Gecikmiş Tip Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu

Eritrosit antikorları ciddi hemolitik transfüzyon reaksiyonları yapabilir. Vericinin eritrositleri, alıcının antikorları ile temas edecek antijenleri içerirse bu durum gerçekleşebilir (15).

B. Yenidoğan'ın Hemolitik Hastalığı

Eğer hamile bir kadın, çocuğun eritrositleri üzerindeki antijene karşı eritrosit antikorları geliştirirse bu antikorlar plasentadan geçer ve çocuğun eritrositlerini parçalar (16).

C. Otoimmün Hemolitik Anemi

Eğer bir kişide kendi eritrositlerinde bulunan antijenlere karşı antikor oluşmuşsa, kendi eritrositlerinin yıkımına neden olabilir. İnvivo olarak pek çok antikor eritrositleri hasara uğratabilme özelliğine sahiptir (17).

1. Optimal reaksiyon ısısı

Klinik olarak önemli antikorlar sıcak antikorlardır ve en iyi 37°C ' de reaksiyona girerler, bu antikorlar vucut ısısında eritrosit yıkımına neden olurlar. Antikorların optimal reaksiyon ısısı 30°C' nin altına inerse bunları soğuk antikorlar olarak adlandırırız (10). Soğuk hemaglutinin hastalığında, soğuk tip otoantikorlar eritrosit antijenleri ile reaksiyona girebilirler (18).

2. İmmünglobulin sınıfı veya alt sınıfı

Kompleman bağlayan IgG ve IgM antikoları eritrosit hasarı yapabilir. IgG' nin dört alt grubu vardır, herbiri eritrosit yıkımında farklı etki gösterir. IgG3 her zaman eritrosit yıkımı yaparken, IgG4 antikoları ise eritrositler üzerinde aynı etkiye sahip değildir.

3. Komplemana bağlanabilme yeteneği

IgM - kompleman bağlayan antikolar, ciddi intravasküler hemolize neden olurlar, çünkü komplemanı fikse ettikten sonra tüm kompleman sistemini aktive ederler. İnvasküler hemolize yol açan antikolar; anti-A, anti-B, anti-Val, anti-P, anti-P1, anti-Tj^a, anti-Le^a dır. Neyse ki çoğu IgM antikoları soğuk antikolardır ve sıklıkla bu durum hemolitik etkilerini sınırlar, ancak bazı IgG antikoları da kompleman bağlayabilir. Bilinen örneği Kidd kan grubu antijenlerine karşı oluşan antikolardır (10).

4. Tekrardan yenilenmiş antijen stimülasyonu ile antikoların hızlı üretimi

Karşılık gelen antijenle yeniden temasa geçtikten sonra immün antikolar büyük miktarlarda üretilebilirler. Bir hasta tespit edilemeyecek kadar düşük konsantrasyonda IgG eritrosit antikolarına sahipse ve donör kanında bu antikoların yöneleceği kan grubuna karşı önceden maruziyet varsa hafıza hücreleri sayesinde hızlıca antikor üretilir. Bu sekonder immün cevap donör kanının transfüzyonundan 5-10 gün sonra yıkılmasına neden olur, buna gecikmiş hemolitik transfüzyon reaksiyonu denir (19).

2.2.5. Antikolarla Eritrosit Yıkımı

İnvivo olarak iki önemli yıkım mekanizması var.

A. İnvasküler (İntravasal) hemoliz

B. Ekstravasküler (ekstravasal) hemoliz

A. İnvasküler (İntravasal) hemoliz

Antikolar komplemanı bağlarlar ve tüm kompleman sistemi uyarılır, böylece hücre membranı hasara uğrar ve hemoliz gerçekleşir.

B. Ekstravasküler (Ekstravasal) hemoliz

Hasara uğrayan veya antikorla kaplı eritrositler dalak veya karaciğerde yıkıma uğrar(14).

2.3. ABO KAN GRUP SİSTEMİ

İlk kez Karl Landsteiner tarafından 1900 yılında tanımlanmıştır (20). Her insanda iki adet alel vardır, biri anneden diğeri babadan gelir. Altı muhtemel kombinasyona

neden olur (AA, AO, BB, BO, AB, OO). O aleli sessiz olduğundan A, B, AB, O olmak üzere dört adet kan grubu vardır.

2.3.1. ABO Antikorlar

Anti-A ve anti-B gelişimi intestinal bakteriler tarafından stimüle edilebilir. Genellikle anti-A ve anti-B IgM tipi antikorlardır ve aglütininler olarak adlandırılırlar, ancak nadirde olsa IgG yapısında da olabilir. Bu antikorlar 5-10'lu yaşlarda maksimum güce ulaşır. Anti-A gerçekte anti-A totaldir ve hem A1, hem de A2 eritrositlerle reaksiyona girer. Anti-A, kan grubu B ve O olan kişilerde bulunur.

Anti-A ve anti-B antikorların klinik önemi :

- IgM ve IgG tipi anti-A ve anti-B antikorlar komplemana bağlanırlar ve IgM–kompleman kompleksi intravasküler hemoliz oluşturur. Anti-A ve anti-B antikorları her zaman hemolitik tansfüzyon reaksiyonları oluşturur.
- IgM anti-A ve anti-B antikorlarının titre ve aviditesi daima yüksektir.
- A ve B kan grubu antijenleri eritrosit membranları üzerinde fazla sayıda bulunur.
- IgM anti-A ve anti-B antikorları 37°C' de çok aktiftirler (10).

Anti-A1

Anti-A1 antikorunu A2 kan grubu olan kişilerin %8'inde ve A2B kan grubu olan kişilerin ise %35'inde bulunur (21). Çoğunlukla IgM sınıfı antikorlardır, minör klinik önemi vardır ve genellikle 37°C' de reaksiyona girmez (22).

Anti-H

Alloanti-H Bombay kan grubu olan insanların serumlarında bulunur. Anti-H klinik olarak önemlidir, çünkü 37°C'de ve 4°C'de güçlü olarak ABO kan grubu hücrelerle reaksiyona girerler (14,23).

Anti-A,B

Anti-A,B kesinlikle anti-A ve anti-B' nin karışımı değildir. Anti-A,B, eritrosit üzerinde ne A nede B kan grubu antijenleri yokken oluşur. Anti-A,B antikorları A ve B antijenlerinin her ikisi üzerinde bulunan antijenik determinantlara karşı yönelmişlerdir (10).

2.3.2. Diğer Kan Grubu Sistemleri

Şimdilik 250'den fazla kan grubu bilinmektedir. Kan grubu sistemlerinin yanında aynı zamanda, yüksek frekanslı antijen serileri ve düşük frekanslı antijen serileri vardır.

ISBT (Uluslar arası kan transfüzyonu topluluğu) kan grubu sistemlerini yeniden sınıflandırmıştır (24,25). Örneğin; K antijeni için, 006 numarası Kell sistemini temsil eder, bunu 001 numaralı K antijeni takip eder. Dolayısıyla K antijeni için numaralandırma 006.001 dir. Kan grubu sistemlerinin numaralandırılması 001'den 023'e kadardır(26).

2.3.3. KELL Kan Grubu Sistemi

1946'da Coombs bir antikor buldu, bu antikor hastanın birinde o ana kadar bilinmeyen bir antijene karşı saptanmış ve yeni bir kan grubu sistemine ait olduğu düşünüldü. Hastanın adı Kelleher olduğundan, Kell kan grubu sistemi adı verilmiştir. Kell kan grubu sisteminin klinik önemi büyüktür (27).

Antijenler

Kromozom 7 üzerindeki tek bir protein üzerinde taşıyıp, tek bir gen tarafından kodlanır (28). Şimdiye kadar Kell sistemine ait 22 alel bilinmektedir. En önemli antijenler; K , k, Kp^a , Kp^b, Js^a ve Js^b, dir. K antijeni en immünojenik kan grubu antijenlerinden biridir. Çok nadiren bir kişinin eritrositlerinde Kell sistem antijenleri görülmeyebilir, bu nadir durumda genotip K^o olarak adlandırılır . Bu genotipli hastalar çoğunlukla tüm Kell antijenlerine karşı antikor üretirler, bu sebeple bu kişiler K^o kan grubu olan hastalardan kan almalıdırlar (27,29,30).

Antikorlar

Kell antijenlerine karşı oluşan antikorlar IgG sınıfındadır. Bu antikorlar transfüzyondan sonra veya gebelikten sonra oluşabilirler. Transfüzyon reaksiyonuna veya yenidoğan hemolitik hastalığına sebep olabilirler, ayrıca kemik iliği supresyonu yaptığından gebelerde anti-K oluşumu, fetus için çok tehlikelidir. Anti-K oldukça sık oluşan bir alloantikordur. Kell antikorları İndirekt antiglobulin test (IAT) ile gösterilebilmektedir (29-31).

2.3.4. Duffy Kan Grubu Sistemi

Cutbush tarafından 1950'de keşfedildi, Duffy kan grubu Fy olarak kısaltılmıştır.

Antijenler

Bu sistemde 7 farklı antijen vardır; Fy^a, Fy^b, Fy³, Fy⁴, Fy⁵, Fy⁶ ve Fy_x (varyant Fy_b). Ancak en önemli antijen grubu Fy^a ve Fy^b dir. Dört ana fenotipe sahiptir; Fy(a+b+), Fy(a+b-), Fy(a-b-), Fy(a-b+) dir. Beyaz ırkta Fy(a-b-) fenotipi nadir görülürken diğer üç fenotip yaygındır. Afrika-Amerikan siyahlarında Fy(a-b-) %68

oranında gözlenirken, Batı Afrikanın bazı bölgelerinde %100 oranında görülür (32). Fy(a-b-) fenotipli bireylerde Duffy proteini eritrositlerde bulunmaz (33). Duffy sistemi için gerekli olan gen kromozom 1 üzerinde lokalizedir ve Rhesus sistem (Rh) genine benzer. Fy³ antijeni Fy^a ve/veya Fy^b antijeninin ifade edilebildiği tüm hücrelerde bulunur. Duffy antijenleri daha az immünojeniktir (27,34,35).

Antikorlar

Duffy antijenlerine karşı gelişen antikorlar IgG tipindedir. Bu antikorlar yenidoğanın hemolitik hastalığı gibi ciddi transfüzyon reaksiyonları oluşturabilirler. Enzimle muamele edilen eritrositlerde Duffy antijenleri hasarlanır, bu nedenle pozitif reaksiyon negatife dönüşür, antikor tanımlamada bu özellikten yararlanır (34,35).

2.3.5. Kidd Kan Grubu Sistemi

1951'de Allen Kidd sistemini keşfetti. Bu sistemde üç antijen bilinmektedir. Üç alelli tek gen bu kan grubu sisteminin oluşmasından sorumludur, Jk şeklinde kısaltılmıştır (27).

Antijenler

Kromozom 18'de bu genin üç aleli bulunur. Jk^a, Jk^b ve Jk dır. Jk aleli sessiz bir aleldir ve antijen kodlatmaz. Jk (a-b-) fenotipi Batı Avrupa popülasyonunda nadir görülür. Bu fenotipin oluşumunda iki mekanizma sorumludur. Birincisi Jk alelinin homozigot olarak eksikliğidir, diğeri ise dominant inhibitör geni olan İn(Jk) nın etkisidir(20). Jk^a ve Jk^b antijenlerinin yanında Jk³ antijeni de vardır. Bu Kidd antijeni Jk^a ve/veya Jk^b antijeni olan insanlarda görülür. Jk(a-b-) kişilerde ise görülmez (36).

Antikorlar

Genellikle IgG grubundandırılar ama IgM'de olabilirler. Pratik olarak her zaman komplemanı bağlarlar. Alloantikorlar kan transfüzyonu veya gebelik sonrası oluşup hemolitik transfüzyon reaksiyonları ve yenidoğanın hemolitik hastalığına sebep olabilirler. Kidd antikorları hızlıca azalabilme kapasitesine sahip olup, tespit seviyesinin hemen altına düşebilir. Böylece antikorlar rutin tarama sırasında ortaya çıkmayabilir. Kidd antikorlarını en iyi tarama yöntemleri PEG-IAT, LISS-IAT ve Enzyme-IAT dır (37,38).

2.3.6. MNSs Kan Grubu Sistemi

İki ayrı kan grubu sistemini içerir: MN sistem 1927'de Landsteiner ve Levine tarafından tanımlanmıştır. Ss sistemine ait anti-S 1947'de anti-s 1951'de tanımlanmıştır.

M ve N'yi kodlayan genler S ve s'yi kodlayan genlerle yakın ilişkilidir. Her iki gende kromozom 4 de bulunur, birbirlerine yakındırlar, birbirleri arasında geçiş olmaz. Bu yüzden MNSs haplotipleri tam kalıtlıdır (10).

Antijenler

40 adet antijen içerir. En iyi bilinenler: M, N, S, s, U'dur. MNSs sistemi düşük frekanslı antijenlerin çoğunluğunu içerir. MN antijenleri sialoglikoprotein α üzerine lokalizedir ve glikoforin A da denir. Ss antijenleri ise sialoglikoprotein β üzerine lokalize olup glikoforin B de denir. U antijeni de glikoforin B üzerindedir. U antijeni tüm S-pozitif ve/veya s-pozitif olan beyaz ırkta bulunur. Bununla beraber S ve s antijenlerinin her ikisini de içermeyen kişilerin eritrositlerinde U antijeni %16 oranında görülebilir. Beyaz ırkta fenotipi S-s- olan kişiler zor görülür. U negatif kişiler daima zencilerdir. M, N, S, s antijenleri fetusda erken evrede tanımlanabilir (39,40).

Antikorlar

MNSs sistem antijenlerine karşı en önemli antikorlar anti-M, anti-N, anti-S, anti-s dir. Anti-M ve anti-N doğal yolla oluşurlar. Anti-M IgG ve IgM sınıfına ait olabilir. Anti-N ise genellikle IgM sınıfına aittir. Anti-M ve anti-N komplemanı bağlamazlar, nadiren hemolitik transfüzyon reaksiyonu oluştururlar. Bromelin, tripsin, papain gibi enzimlerle muamele gören eritrositlerde glikoforin A parçası kalktığından M ve N antijenleri saptanamaz, bu yüzden anti-M ve anti-N de saptanamaz. Anti-M ve anti-N serum fizyolojik veya IAT ile saptanabilir. Anti-S ve anti-s; bu antikorlar esas olarak immün antikor şeklindedirler, bu durumda IgG sınıfındadırlar. Yinede bu antikorlar doğal yolla da oluşabilirler (IgM). Çünkü s antijeni popülasyonda yüksek frekansda görüldüğünden anti-s nadir görülür. Anti-S ve anti-s hemolitik transfüzyon reaksiyonuna veya yenidoğanın hemolitik hastalığına yol açabilir. Anti-U daima komplemanı bağlamayan bir IgG antikorudur, nadiren ciddi hemolitik transfüzyon reaksiyonu ve yenidoğanın hemolitik hastalığına sebep olur.

2.3.7. Lewis Kan Grubu Sistemi

Lewis kan grubu sistemi antijenleri eritrosit zarında olmayan bir kan grubu sistemidir. Eritrositler Lewis antijenlerini indirekt olarak plazmadan absorbe ederler, kısaca Le olarak gösterilir. Asyalılarda sık rastlanır (41).

Antijenler

En önemli Lewis antijenleri Le^a ve Le^b dir ve bu antijenlerin oluşumu Lewis geninde Le ve le alelleri tarafından gerçekleştirilir, fakat aynı zamanda sekretuar genin SE ve se alelleride bu antijenlerin oluşumunda etkilidir. Se aleli ABH antijenlerinin plazmada üretimini sağlar. Bu alel prekürsör maddeleri plazmada H antijenine çevirir ve daha sonra plazmada A ve/veya B antijeni oluşur. Sırasıyla A, B, AB kan grupları oluşur (42). Le aleli Le-transferaz denen bir enzimi kodlar. Bu enzim fukoz molekülünü prekürsör madde üzerine ekler ve Le^a antijeninin oluşmasına neden olur. Sekretuarlarda Se aleli olduğu zaman H antijeni aynı prekürsör tarafından H-transferaz enzimi ile oluşturulur ve plazmada bulunur. Le-transferaz H maddesi üzerine plazmada fukoz ekler ve Le^b antijeni oluşur. Böylece Se ve Le –transferazlar aynı prekürsör madde için yarışmaya girerler. Se-transferaz Le-transferazdan daha etkilidir. Bu durum sekretuar eritrositlerin H antijenini daha fazla salgıladığını ve bu yüzden Le^b antijeninin Le^a antijenine göre daha fazla olduğunu açıklar (43,44). Doğumdan hemen sonra rutin tekniklerle Lewis antijenleri gösterilemez. Önce Le^a antijeni oluşur(Le aleli olduğunda). Çocuk üç aylık olunca Lewis fenotipi $Le(a+b)$ olarak gösterilir. İkinci basamakta Se aleli Le^b antijenini oluşturur. Eritrositler $Le(a+b+)$ olur. Yedi yaşına kadar final Lewis fenotipini tanımlamak mümkün değildir (45).

Antikorlar

Anti- Le^a ve anti- Le^b doğal yollarla oluşurlar, klinik önemleri azdır, sadece nadir vakalarda Lewis antikorları hemolitik transfüzyon reaksiyonlarından sorumludur. Lewis sistemine karşı oluşan antikorlar hamilelerde oldukça sıktır fakat yenidoğanın hemolitik hastalığına sebep olmazlar. Donörün plazmasında Lewis antijeni olduğundan dolayı Lewis antikorları nötralize olur (10). Lewis antijenlerinin transfüzyon öncesi belirlenmesi veya bu antijenlere yönelik crossmatch yapılmasına gerek olmadığı düşünülmektedir (46).

2.3.8. Lutheran Kan Grubu Sistemi

Callender 1945’de Lutheran kan grubu sistemini keşfetti. Şimdiye kadar 18 antijen bu sistemde bilinmektedir, kısaca Lu olarak adlandırılır.

Antijenler

En önemli antijenler Lu^a ve Lu^b dir. Lu^b antijeni çeşitli populasyonlarda yüksek frekanslı iken Lu^a antijeni düşük frekanslıdır. $Lu(a-b)$ çok nadir görülür (47). $Lu(a-b-)$

fenotipinin iki tipi vardır. Dominant Lu(a-b-) fenotip ve resesif Lu(a-b-) fenotip olmak üzeredir. Dominant fenotipinde Lu geni bulunur ama antijen sunumu Lutheran inhibisyon geni tarafından inhibe edilir. Burada hücre membranı üzerinde Lu antijenleri çok azdır (48) Antijen seviyesi kişiden kişiye değişir(21). Eritrositler AET(2-Aminoethylisothiuronium) veya DTT(Dithiothreitol) ile muamele edildiğinde Lutheran ve Kell antijenleri zarar görür (49,50).

Antikorlar

Anti-Lu^a ve anti-Lu^b doğal yolla (IgM) ve immünantikor (IgG) şeklinde görülebilir. Zayıf olduklarından klinik olarak çok önemli değildirler, yinede bu antikorlara karşı transfüzyon reaksiyonu görülebilmektedir. Anti-Lu^b bulduran kişilere uygun kan bulmak zordur, çünkü populasyonun %99.8'i Lu^b antijeni taşır (10).

2.3.9. P Grub Sistemi

Landsteiner ve Levine 1927'de tanımlamıştır. Bu sistemde tek antijen vardır. Bu antijen yapısı ABH, Lewis ve I kan gruplarında ki antijen yapısıyla aynıdır.

Antijen

P kan grubu antijeni P1-antijenidir. Beyaz ırkın %79' da görülür. P1 yokluğunda P2 kan grubu olarak adlandırılır. Burada P2 antijeni yoktur ve dolayısıyla anti-P2' de yoktur. P1 antijen seviyesi kişiden kişiye değişir, zencilerde daha sık görülür (51,52).

Antikorlar

Anti-P1 IgM tipi olup soğuk antikordur. 37°C'de zorla aktive olurlar bu yüzden transfüze edilen eritrositlerde önemsenmezler. Anti-P1 antikorları ABO kan grubu sisteminde P1 antijeni taşıyan grupta sorun yaratırlar. Anti-P1 antikorları salin testi ile tanınabilir, aglütinasyon reaksiyonları enzimlerle arttırılabilir (53-55).

2.3.10. Globosid Kan Grub Koleksiyonu

Üç adet antijen içerir, ABH ve Lewis antijenlerine benzer. Serolojik olarak P kan grubu sistemi ile ilişkilidir, uzun zaman tek bir sistem olduğu düşünülmüştür.

Antijenler

Globosid kan grubuna ait üç antijen; P, Pk, LKE (Luke)' dir. Populasyonun hemen hemen %100'de P pozitifdir ve bu yüzden P antijeni hem P1 hemde P2 grubunda bulunur. P antijeni doğumda tamamen gelişmiştir. Pk antijeni populasyonda nadir görülür, çünkü bu antijen, grubun prekürsörüdür. Pratikte Pk antijeni P antijenine transforme olur ve tarandığında gösterilemez (52).

Antikorlar

Anti-P, P^k veya P fenotipi olanların serumunda bulunur. P2^k kan grubundan olan hastalarda anti-P ve anti-P1 içerirler. Anti-P alloantikör veya otoantikör olarakta bulunabilir. Alloanti-P IgG veya IgM cinsinden olabilir. Bu nadir antikörler sadece P^k veya P fenotipindeki insanların kan grubunda bulunabilir. Otoanti-P ise bifazik IgG-hemolizindir. Bu antikör paroksizmal soğuk hemoglobinemisi veya viral enfeksiyonlardan sonra oluşur. Bifazik hemoliziner IgG tipinde ve soğuk antikörler olup komplemanı kuvvetli bağlarlar. Bifazik hemolizinerlerin tipik karakteristik aktiviteleri, hızlıca (birkaç dakika ile birkaç saat arasında) hasta soğuğa maruz kaldıktan sonra hemoliz oluşur ve hemoglobüriye neden olur. Anti-P + anti-P^k + anti-P1 kombinasyonuna anti-Tja denir ve genotipi pp olanlarda bulunur. Bu antikörler IgG ve IgM grubundandır, komplemanı bağlarlar. Uygunsuz transfüzyon olduğunda hemolize neden olurlar (56). Anti-LKE antikörleri LKE antijenlerine karşı oluşmuştur, düşük ısıda en iyi reaksiyon gösterebilir (10).

2.3.11. Li Kan Grub Koleksiyonu

Wiener 1956'da tanımlamıştır. Antijenler ABH, Lewis, P, Globosid grub sistemleri ile aynı temel maddeden oluşur. Li kan grub koleksiyonunda iki antijen vardır (57,58).

Antijenler

İki adet antijeni vardır. I ve i olarak adlandırılır. İ antijeni doğumda eritrosit membranının üzerinde bulunur, ancak I antijeni nadiren bulunur. İlk 8 ay boyunca i antijenine göre I antijeni daha çok üretilir. Erişkinlerde sadece I antijeni bulunur. Çok nadiren i antijeni erişkinlerde görülür ve bu kişilerde I aleli yoktur (59).

Antikorlar

Nadirde olsa i-homozigot kişiler vardır ve bunlarda I antijeni bulunmaz. Genellikle Anti-I antikörü alloantikördür, otoantikör anti-I ise sağlıklı kişilerde küçük titrelerde bulunurlar. Yüksek titrede otoantikör anti-I bulunan hastalarda otoimmün hemolitik anemi görülebilir. Anti-i nadir görülen IgM antikördür, bu antikör genotipi ii olan erişkin eritrositler ve yenidoğan eritrositlerini hemolize uğratar. Bunların önemi kan transfüzyonu öncesinde antikör tarama ve crossmatch testlerini bozabilirler. Ayrıca güçlü bir otoaglutinin olan Anti-i veya anti-I bulunan hastaların eritrositlerinin yaşam süresi kısa olup, bu olay 30°C'de veya daha yüksek ısı söz konusu olduğunda gerçekleşir (57,59,60).

2.3.12. Yüksek Frekanslı Kan Grubları

Populasyonda yüksek oranda bulunan kan grub antijenleri HFA (High Frequency Antigens) olarak adlandırılır. HFA'yı kodlayan alel frekansı bazen %99 dan daha yüksek olur. Örneğin; Vel, Lan, Yt^a, Co^a, Ge^a, Kp^b ve Js^b, Lu^b,P-antijeni, I-antijeni. HFA'ya karşı oluşan antikorlar problem oluşturabilirler çünkü uygun eritrosit donörü bulmak zordur (10).

2.3.13. Yüksek Titreli Düşük Aviditeli Kan Grubları (HTLA)

Bu antikorlar yüksek titrelerde reaksiyon verir fakat kuvvetli bağlanırlar, aviditeleri düşüktür ve zayıf reaksiyon verirler, bu antikorlara HTLA antikorları denir. Reaksiyon şekli dikkat çekicidir. Serum yüksek dilüsyonlarda uyumsuz eritrositlerle reaksiyona girer. Dilüe olmayan serumda reaksiyon zayıf gelişir. HTLA antikorları klinik olarak önemsizdir. Uyumsuz donör eritrositleri nadiren hasara uğrarlar (61).

2.3.14. Düşük Frekanslı Kan Grubları

Toplumda düşük veya çok düşük frekansdaki kan grubu antijenlerine LFA (Low Frequency Antigens) denir. 100'den fazla LFA bilinmektedir. LFA' ların bir grubuna özel antijenler denir. Bazen bu antijenler öyle nadir görülürler ki, sadece bir ailenin üyesinde bulunabilir. Çoğunlukla antijen yokluğunda, LFA geninin dahil edildiği, alternatif bir alel bilinmektedir. Bu alternatif alel muhtemelen sessizdir ve populasyonda yüksek frekansda bulunur. Bazı LFA'lar beyaz ırk dışındaki populasyonda daha yüksek frekansda bulunabilirler. Örneğin; LFA Di^a (Diego^a) Japon' larda %10 iken zencilerde %20 oranında görülür (62).

2.4. Kan Grub Antikorlarını Tanımlama Teknikleri

2.4.1. Eritrosit aglutinasyonu ile kan grub antikorlarının taranması

Bu teknikte antikorla sensitize olan eritrositler aglutine olur ve çıplak gözle görülebilirler. Pozitif aglutinasyon reaksiyonu antikorların eritrositlerle reaksiyona girdiğini gösterir. Antikorlar IgM tipi ise aglutinasyon direkt oluşur. IgG tipi ise hücreler sensitize olur fakat aglutine olmaz. Aglutinasyon için başka maddelere ihtiyaç vardır. Komplet antikorların (IgM), 30 nm çapı vardır ve Fab-parçaları oldukça uzak olduğundan eritrositler arasında köprü kurulabilir. Sadece bu antikorlar direkt aglutinasyona sebep olur ve bu yüzden komplet antikorlar veya aglutininler denir. Aglutininler salın solusyonunda dahil tüm şartlarda eritrositleri aglutine edebilecek vaziyettedirler. Daha küçük inkomplet antikorlar (IgG) eritrositleri sensitize eder ama

eritrositler arasında köprü oluşturamaz. İnkomplet antikorlarla sensitize olan eritrositlerin aglutinasyonu için iki durum vardır, bu durumlar aynı zamanda kombine edilebilirler.

Metod 1: Eritrositlerin çevresinde iyon bulutu şeklinde olan su örtüsünü azaltmak.

Metod 2: Human-IgG antikorlarına karşı antikorlar kullanılarak, sensitize olmuş eritrositler üzerindeki antikorlara bağlanır, farklı eritrositler üzerindeki IgG antikorları arasında bir köprü kurulur.

O grubu dışındaki eritrositlerde ABO antijenleri bulunduğundan dolayı, anti-A ve/veya anti-B ile reaksiyona girmemesi için, IAT testinde kullanılan hücreler O grubundan hazırlanmalıdır.

2.4.2. İnkomplet antikorlarla aglutine eritrositlerin sensitizasyonu:

2.4.2.1. Eritrosit çevresindeki su örtüsünü ve iyonik bulutu azaltmak

Bu tabaka direkt olarak negatif yüklüdür ve hücrelerin yüzeyine tutunur. Bunun çevresindeki pozitif yüklü bulut çok yoğundur ve bu bölünen yüzey üzerindeki potansiyele zeta potansiyeli denir. Bu zeta potansiyelini azaltarak eritrositlerin birbirine daha çok yaklaşması sağlanabilir. Böylece inkomplet antikorlar eritrositleri aglutine edebilirler. Bu yolla IgG antikorlar bulunabilir. Zeta potansiyelindeki azalma aşağıdaki solusyonlarla aşılabılır (10).

- Albumin gibi polimerler
- Polibren gibi polikatyonlar
- Proteolitik enzimler

2.4.2.1.1. Albumin

Bipolar polimerdir. Albumin eritrosit süspansiyonuna eklendiğinde eritrositlerin yüzey yükleri değişir. Bipolar albumin molekülleri pozitif su moleküllerinin yerini alır. Sonuç olarak daha az pozitif partiküller eritrosit membranına fikse olacak ve zeta potansiyeli azalacaktır. Böylece eritrosit çevresindeki su örtüsü azalır ve eritrositler arasındaki mesafe artar. Bazı inkomplet antikorlar eritrositler arası mesafeyi geçebilirler ve onları aglutine ederler. Genelde albumin solusyonlarının %22'si (BSA: Bovine Serum Albumin) antiglobulin test ile kombine olarak kullanılır (14,55).

2.4.2.1.2. Polibren

Pozitif yüklü moleküller, eritrosit yüzeyindeki negatif yüklerle reaksiyona girerek aglutinasyonu artırır. Bu yolla polibren, eritrositler arasında köprü oluşturur. Yüksek

miktarda konduğunda eritrositler spontan olarak agregasyona uğrar. Polibren sıklıkla antiglobulin testi ile kombine olarak kullanılır (55,63).

2.4.2.1.3. Proteolitik enzimler

Bu enzimler eritrosit membranından glikoprotein gibi protein olan yapıları kaldırırlar. Glikoproteinlerin çoğu sonlarında bulunan negatif yüklü nörominik asit grupları içeren şeker zincirler ihtiva ederler, buda hücre yüzeyindeki negatif yükten sorumludur. Test öncesinde hücrelerin enzimle muamele edilmesi negatif yükü azaltır ve aralarındaki mesafe kısalır, IgG molekülleri eritrositler arasında köprü oluşturabilirler. Papain, bromelin, fisin bu amaç için uygun enzimlerdir. Duffy ve MNSs sistemi gibi sistemlerin antijen proteinlerini bu enzimler bozabilir, bu yüzden enzimle muamele edilen hücrelerde bu antijenlere karşı antikorlar saptanamaz. Rhesus, Kidd ve Lewis antikorları ise enzimle muamele edilen hücrelerde kolayca saptanabilirler (14,55).

2.4.2.2. Antijen antikor arasındaki bağı güçlenmesi

Böylece aglutinasyon dahada artar ve bu durum polietanolglikol (PEG) veya düşük iyonik güçteki (LISS) ortamda hücre süspansiyonu ile sağlanır.

2.4.2.2.1. Polietilen Glikol (PEG)

Suda çözülebilen, antikor alımını arttırmak için kullanılan, lineer yapılı bir polimerdir. Temel görevi; ortamdaki suyu uzaklaştırıp, eritrositler etrafında boş alan yaratmak ve antikorları efektif konsantrasyona ulaştırıp, antikor alımını arttırmaktır (64). PEG, monospesifik anti-human IgG kullanıldığı antiglobulin testiyle beraber kombine halde kullanılır. PEG metodu tek fazlı bir tekniktir ve klinik olarak ilişkili tüm eritrosit antikorlarının tanımlanmasında uygun bir yöntemdir (65).

2.4.2.2.2. Düşük İyon Konsantrasyonlu Salin (LISS)

Düşük iyonik konsantrasyonlu salin ile eritrosit süspansiyonu hazırlanır. Antikor molekülleri antijene kuvvetli bir şekilde bağlanır. Antiglobulin testi ile beraber LISS metodu kullanıldığında iyonik güç artar. LISS metodu daha çok kolon tekniğinde kullanılır (66-69).

2.4.2.3. Antikor moleküllerinin birbiri ile bağlanması: Antiglobulin test

Genellikle eritrositler direkt olarak IgG antikorlarını aglutine edemezler. Antihuman globulin yönteminde, aglutinasyon görülmesinin sebebi, farklı eritrositler üzerindeki antikorların anti-human globulin serumunda bulunan antiglobulin

molekülleri tarafından bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bu prensib 1908'de Moreschi tarafından geliştirilmiş, 1945 yılında ise Coombs tarafından tekrar keşfedilmiş ve Coombs testi denilmiştir. Antiglobulin testi inkomplet antikorları tanımlamak için yapılan en önemli metottur. Sensitize olan eritrositlerle birlikte IgG antikorları ve kompleman faktörleri bu test ile gösterilebilir (10).

2.4.2.3.1. İndirekt Antiglobulin Testi (IAT)

Serum veya plazma örneğindeki antikorlar test eritrositleri ile reaksiyona girdiklerinden kolayca tespit edilirler. IAT antikor tarama eritrosit antikorlarını tespit etmek için kullanılır. IAT'ın antikor tarama ile beraber kullanıldığı bir diğer yer ise crosmach ve antikor tanımlamadır. IAT' da hasta serumunun test eritrositleri ile inkubasyonundan sonra anti-human globulin serumu eklenir. Hücreler, ortama reaksiyonu potansiyalize edici ajanların (örneğin; albumin, PEG veya polibren) varlığında veya LISS ortamında süspanse edilir. IAT pozitif ise bu durum antikorların test eritrositleri üzerindeki antijenlere (tarama ve tanımlama) veya donör eritrositlerine (crosmach) karşı oluştuğunu gösterir (70,71).

IAT üç faz içerir:

1. Sensitizasyon fazı
2. Yıkama fazı
3. Antiglobulin fazı

Sensitizasyon fazı: Serum eritrositlerle beraber inkube edilir. Serumda antikorlar varsa bunlar eritrositlere bağlanır.

Yıkama fazı: Eritrositler tam bağlı olmayan immünglobulinleri ortamdaki kaldırmak için yıkanılır. Bu önemlidir, çünkü bağlı olmayan immünglobulinler antiglobulin molekülleri ile reaksiyona girebilir. Böylece anti-human globulin serumunun nötralizasyonu ve yanlış negatif reaksiyon görülebilir (10).

Antiglobulin fazı: Klinik olarak önemli antikorların saptanmasında kullanılan IAT yöntemi, antiglobulin fazı içerir (72). Anti-human globulin serumu ortama eklenir. Anti-human globulin, human IgG'ye karşı antikorlar içerir. Bu antikorlar eritrositler üzerindeki IgG moleküllerine bağlanıp köprü oluşturup eritrositleri aglutine ederler (10).

2.4.2.3.2. IAT sensitivitesini etkileyen faktörler

- a) Serum ve hücre oranı: Genellikle bir volüm(damla) %3.5'lik eritrosit süspansiyonu iki volüm seruma eklenir. Reaksiyon zayıfsa serum volümü artırılır.
- b) İnkubasyon ortamı: Eritrositlere antikor bağlanmasının eritrositlerin çevresindeki su örtüsü ve iyonik bulutun azalmasıyla arttığı gösterilmiştir. Eğer antijen antikor bağlanması artırılabilirse antikorların eritrositlere bağlanması artar. Bu yüzden eritrositlerin süspansiyon halinde bulunduğu ortam, antikorların eritrositlere bağlanma hızını ve gücünü etkiler. Albumin veya polibren , antikorların eritrositlere bağlanmasını artırır. Antijen ve antikor arasındaki bağ LISS veya PEG ortamında artar. Antiglobulin testleri sıklıkla LISS ortamında veya albumin ortama eklendikten sonra, PEG ortamında veya ortama polibren eklendikten sonra yapılır.
- c) Asidite (pH): Çoğu eritrosit antikorları pH: 5.5-8.5 arasında iş görür. Anti-P gibi bazı antikorlar ise daha düşük pH'da daha iyi tespit edilirler (73). Ancak düşük pH, bazı antikorların reaktivasyonunu önemli derecede düşürebilir. Örneğin; Duffy, Kidd (74).
- d) İnkubasyonun derecesi: IgG antikorlarının reaksiyon verdiği ısı 37°C'dir.
- e) İnkubasyon zamanı: Genellikle 15-30 dakikalık bir inkubasyon süresi, antijene karşılık gelen tüm antikorların bağlanması için yeterlidir.

İkinci fazda, yıkamanın doğru yapılması önemlidir, çünkü yıkamadan sonra bağlı olmayan immünglobulin molekülleri ortamdaki uzaklaştırılır. Yıkama prosedürü tam yapılmazsa serbest immünglobulinler solüsyonda bulunabilir ve ortama anti-human globulin serumu eklendiği zaman ortamdaki serbest immünglobulinler ile reaksiyona girerler. Üçüncü fazda ise antiglobulin serumu her zaman anti-IgG içermelidir. Bazı IgG ve IgM antikorları anti-kompleman tarafından daha iyi tanımlanabilir. Kompleman bağlayan eritrositler üzerindeki antikor molekülünün (IgG veya IgM) fiksasyonu birçok kompleman molekülünün fikse olmasına sebep olur. Testin sensitivitesi anti-kompleman kullanılarak artırılabilir. Anti-human globulin serumu hem anti-IgG hemde anti-kompleman içerir. Buna polispesifik anti-human globulin serumu denir. Anti-C3d aktivitesi önemlidir. Bazı otoimmün hemolitik hastalarda C3d eritrositlerde

saptanabilen tek globulin olabilir (75). Bu esas olarak salin, albumin veya LISS' deki antiglobulin testinde kullanılır.

2.5. Eritrosit Antikorlarının Taranması : Tüpten kolona kadar

İlk zamanlarda aglutinasyon tekniği slaytlarla yapılıyordu ama daha sonra aglutinasyon testleri cam tüplerde yapılmaya başlandı ve buna tüp metodu denildi. Son birkaç yıldır tüp metodunun yanında kolon testleride geliştirildi. Bu kolon testlerinin ilk jenerasyonu IAT temeline dayanmaktaydı. Bunlar, kolon (veya jel) aglutinasyon tekniği olarak adlandırıldı, bu yöntem LISS antiglobulin metoduyla benzer sensitiviteye sahipti (76). Bu teknikte LISS'de süspanse edilmiş sensitize eritrositlerin aglutinasyonu, anti-human globulin serumuyla, jel kolonunda gerçekleşmektedir. Eritrositler ve serum, jelin en tepesindeki inkubasyon kompartmanında inkube edilir, sonra kolon santrifüje edilir, böylece eritrositler jele doğru migrasyona uğrarlar. Sensitize eritrositler anti-human globulin serumu ile reaksiyona girdikten sonra aglutinasyona uğrarlar. Santrifüjden sonra aglutinatlar kolon materyalinde arkada kalır. Sensitize olmayan eritrositler jeldeki anti-human globulin serumu ile reaksiyona girmezler, jeli geçip kolonun en altına gelirler. Aglutinatların fiziksel ayrımı, jelin içinden geçişteki süzölmeye ve büyüklüğüne bağlıdır. 1900'lerin sonuna doğru piyasalarda ikinci tip kolon testleri görölmeye başlandı. 1986'da Lopierre kolon teknolojisinin patentini aldı (77). Bu ikinci jenerasyon kolon testleri, sensitize eritrositlerin aglutinasyonuna bağlı olmayıp, kolonun içinde bulunan jelin matriksine, sensitize olmuş eritrositlerin direkt bağlanmasıyla oluşur. Bu test sistemi 'solit faz teknolojisi' üzerine kuruldu ve kolon (veya jel) affinite tekniği olarak adlandırıldı (55,78). Bu immünoaffiniteli jel kolonu yüksek yoğunluklu ortamda, aktif ve immünreaktif fazları içerir. Bu kolonda affinite testi, sensitize eritrositlerin direkt olarak kolonun aktif fazına fikse olmasıyla oluşur. İmmünreaktif faz, protein G (veya protein A ve protein G), anti-IgG ve anti-kompleman faktör C3d'yi jel matriksine fikse durumda içerir. Protein G streptokokların hücre duvarından gelen bir proteindir ve human IgG'nin dört altgrupunun Fc parçasına yüksek affinite gösterir. Sensitize eritrositler kolonun en üstünde bulunurlar, yeterince sensitize olamayan eritrositler ise santrifüj sırasında en alta doğru hareket ederler. Kolonun üstündeki ve altındaki eritrosit oranları reaksiyonun gücünü gösterir, buda 0.5 + ile 3 + arasında bulunur (79,80).

2.5.1. Antikor tarama ve tanımlama için Solit faz mikrotitre plak metodu:

Bu teknik 1900 yıllarının başında kan grub serolojisini göstermek için geliştirilmiştir. Bu teknikte reaktanlardan biri daha önceden mikrotitre plakta fikse edilmiştir. Mikro titre plak sisteminin örnekleri solit faz tekniği üzerine ve antikor tarama, tanımlama için geliştirilmiştir. Bu amaçla iki yöntem uygulanmaktadır (81).

- Capture R mikro titre plak tekniği
- Solit tarama mikro titre plak tekniği

2.5.1.1. Capture R mikro titre plak tekniği:

Antikor tarama ve tanımlama için uygundur. Öncesinde test eritrositleri ile mikro titre plağın zeminine fiksasyon yapılır. Tek hücre kalınlığında olacak şekilde monotabaka oluşturulur ve test olacak serumla inkube edilir. Yıkama yapıldıktan sonra anti-IgG ile kaplı indikatör eritrositler ortama eklenir, santrifüjden sonra reaksiyon paterni okunur. Pozitif reaksiyonda eğer serumdaki IgG antikorları test eritrositlerinin monotabakasına bağlanmışsa düz bir tabaka şeklinde görülür. Negatif reaksiyonda ise hiçbir antikor test eritrositlerine bağlanmaz ve indikatör hücreler tabakanın ortasında toplanırlar (82,83).

2.5.1.2. Solit tarama mikro titre plak tekniği:

Antikor tarama tanımlamada kullanılır. Test edilecek serum test eritrositleri ile inkube edilir. Mikro titre plakta sensitizasyon ve yıkama basamakları gerçekleştirilir. Eritrositler anti-IgG/anti-C3d karışımında tekrar süspansiyon haline getirilir. Eritrositler sensitize oldukları zaman bu anti-IgG/anti-C3d karışımıyla aktive olmuş mikro titre plağın tabanına fikse hale gelir ve böylece tüm tabanda test eritrositleri tabaka oluşturarak pozitif reaksiyon görülür. Negatif reaksiyonda ise test eritrositlerine hiçbir antikor fikse olmaz ve test eritrositleri tabanın ortasında toplanır (10).

2.6. Transfüzyon Öncesi Karşılaştırma Testleri

2.6.1. Karşılaştırma testleri

Transfüzyon reaksiyonlarını önlemek için alıcı ile vericinin ABO, Rhesus-D uyumluluğu olması gerekir, ayrıca, alıcıda alloantikor negatif olmalıdır. Bir çok hemolitik transfüzyon reaksiyonu donör veya alıcı bilgilerindeki hatadan kaynaklanır (84). Alıcıya ait numune laboratuara geldiğinde transfüzyon istem kağıdı ile numune karşılaştırılmalı eğer herhangi bir şüphe varsa numune tekrar istenmelidir (85).

Eğer hasta serumunda antikorlar varsa tanımlanmalı ve uygun donör bulunmalıdır. Kan transfüzyonu öncesinde yapılan karşılaştırma testlerinin önemi aşağıda açıklanmıştır.

1. Hem alıcının hem vericinin ABO ve Rhesus-D grubu tanımlanmalıdır. ABO tanımlanması çok önemlidir, hem forward ve hemde reverse olarak tespit edilmelidir. ABO uyumsuzluğu varsa bu düzenli antikorlar ciddi transfüzyon reaksiyonları oluştururlar. Rhesus D-antijenini tanımlamakta önemlidir, çünkü ciddi derecede immünojeniktir.
2. Alıcının serumu irregüler eritrosit antikorları açısından taranmalıdır.
3. Bazı durumlarda alıcı ve vericinin eritrositleri crossmatch ile araştırılmalıdır.
4. Irregüler antikorlar, antikor taramada gösterildiği zaman spesifiteleri araştırılmalıdır.

2.7. Antikor Tarama

Hastanın serumundaki düzensiz antikorları bilmek önemlidir. Düzensiz antikorların hasta serumunda test edilmesi özel test eritrositleri kullanılarak yapılır ve bu eritrositlerin kan grubu O'dır, böylece anti-A ve anti-B antikorları testi bozmaz (85). Taramada kullanılacak hücreler çeşitli kan grubu sistemlerinin en önemli antijenlerini içermelidir. Böylece klinik olarak eritrositler için önemli antikorlar ortaya çıkarılabilir. Genellikle tarama paneli 3 farklı donörün eritrositlerini içerir, bu üçlü tarama panelinde en önemli kan grubu antijenleri her zaman homozigot olarak en az bir hücrede bulunur. Zayıf eritrosit antikorları (örneğin; anti-Fya, anti-Jka, anti-S) bazen sadece bu antijenler için homozigot olan eritrositlerle reaksiyon verir. Klinik olarak önemli antikorlar, heterozigot test hücreleri kullanıldığında gözden kaçırılabilir ama homozigot test hücreleri ile tanımlanabilir, buna dozaj etkisi denir. Klinik olarak önemli antikorlar; anti-C, anti-c, anti-D, anti-E, anti-e, anti-K, anti-k, anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-S, anti-s (86,87).

Her bir antijen için C, c, D, E, e, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s belki M ve N antijenleri için test eritrositleri homozigot olan kişilerden seçilmelidir. Sadece K antijeni heterozigot kişilerde yeterince bulunabilir. Taranan paneldeki bir hücre Cw antijeni için pozitif olurken diğer hücre Rhesus D-negatif olmalıdır. Bu ihtiyaçları içeren öyle bir panel oluşturabilmek için üç farklı donöre ihtiyaç vardır. Tarama hücrelerinin hazırlanmasında eritrositler koruyucu solusyonlar içerisinde tutulur, böylelikle

testlerdeki duyarlılıkları korunmuş olur. Hücreler bu solusyonlar içerisinde bir aydan fazla tutulmamalıdır, çünkü sterilitelelerini kaybedebilirler (88).

Hastanın serumundan antikor taramanın en önemli metodu IAT dir. Bu geleneksel test farklı yollardan oluşturulabilir. En çok kullanılan indirekt antiglobulin testi şekilleri aşağıda verilmiştir.

1. BSA ile yapılan indirekt antiglobulin testi;
2. LISS ile hazırlanmış eritrosit süspansiyonuyla yapılan indirekt antiglobulin testi;
3. PEG ile hazırlanmış indirekt antiglobulin testidir.

İAT uygulamaları ya eritrosit antijenlerini ya da eritrosit antikorlarını araştırmak amacıyla kullanılabilir. Bunlar; antikor tarama, antikor tanımlama, antikor titrasyonu, tarama ve tanımlama için eritrosit elüsyon testi ve uyumluluk testi (crossmatch)dir. Antikor tarama testlerinde otokontrol yapılması önemlidir. Bu yolla mevcut antikorun alloantikor veya otoantikor olup olmadığına karar vermek mümkün olur (Tablo 1). Ancak yakın zamanda transfüzyon yapılan olgularda alıcıdaki alloantikorlar donörün eritrositlerini kaplayarak otoantikor gibi görünebilir (89,90).

Tablo 1. Alloantikor ve otoantikorların saptanması

Otokontrol	Test Hücresi	Antikor
Pozitif	Negatif	Otoantikor
Negatif	Pozitif	Alloantikor
Pozitif	Pozitif	Otoantikor
		Otoantikor+Alloantikor

Duyarlı bir antikor tarama testinde iki veya üç farklı donörden alınmış test hücreleri kullanılmalıdır. Mümkün olabildiğince homozigot hücrelerin (EE,ee,cc,CC) kullanılması duyarlılığı artırır. Anti-c, anti-Jka ve anti-M antikorları homozigot hücrelerle heterozigot hücrelere göre daha iyi reaksiyon verir, hatta bazı kişilerde sadece homozigot hücreler kullanılarak gösterilebilir. Bir antikor eğer homozigot hücrelerle heterozigot hücrelere göre daha kuvvetli aglutinasyon oluşturuyorsa dozaj gösterdiğinden söz edilir. Antikor tarama testi pozitif olgularda pozitifliğe neden olan antikorun hangi eritrosit antijenine veya antijenlerine karşı geliştiği daha çok sayıda test hücresi kullanılarak tanımlanabilir. Negatif bir antikor tarama testi serumda antikor bulunmadığını göstermez. Serumda, az rastlanılan eritrosit antijenlerine karşı bir antikor

varsa tarama testleri negatif olabilir. Sıklıkla bu antikorların varlığı sadece uygun olmayan bir crossmatch testi ile gösterilebilir. Antikor taraması sırasında saptanan antikorları tanımlamak için 8-16 hücre dizisi içeren paneller kullanılmaktadır. Bu hücre dizileri de O kan grubuna sahip donörlerden hazırlanmaktadır. Antikor taramadaki yöntem ile aynıdır, tek farklılık 2-3 hücre dizisi yerine daha fazla sayıda hücre ile işlemlerin yapılmasıdır (76,91). Antikor tarama için alternatif metotlar kolon affinite testi ve solid faz mikrotitre metodudur. Hasta serumunda antikor olunca bir veya daha fazla sayıda tarama panelini sensitize edeceklerdir, bu durumda bir veya daha fazla sayıda tarama hücresi hastanın serumuyla reaksiyona girecek ve tarama pozitif çıkacaktır. Böyle bir durumda serumdaki antikorların spesifitesi tanımlanmalıdır.

2.7.1. Antikor Taramanın Avantajları

Crossmach ile karşılaştırıldığında test eritrositleri ile antikor taramanın önemli avantajları vardır; ticari olarak test eritrositleri her zaman bulunabilir, testler transfüzyon yapılmadan çok önce yapılabilir, bu durumda pozitif tarama ortaya çıktığı zaman antikorların spesifitesini tanımlamak için çok zaman kalır ve uygun donör kanı bulmak için yeterince zaman vardır, test eritrositlerinin kalitesi standardizedir ve en önemlisi kan grubu antijenleri en azından test eritrositlerinin birinde homozigot olarak bulunur ve böylece zayıf antikor varlığı ayırt edilebilir (10). Antikor taramanın dezavantajı; alıcıdan, antikor tarama için kullanılan hücrelerde bulunmayan bir antijene karşı antikor bulunması halinde, antikor tarama testi yanlış negatif sonuç verir.

2.7.2. Tipleme ve Tarama Stratejisi

A- Serolojik Crossmatch

ABO kan grubu ve Rhesus-D antijenleri hem alıcıda hem vericide tanımlanır (forward ve reverse). Alıcı serumu ile vericinin eritrositleri anti-human globulinli ortamda karşılaştırılır (Serolojik Crossmatch), bu yöntemin dezavantajı: Donör eritrositlerindeki antijenik yapının heterozigot olduğu durumda, alıcı serumundaki antikorlarla reaksiyon vermeyebilir (yanlış negatif cevap) (92,93).

B- Elektronik Crossmatch

1. ABO, Rhesus-D grublama forward ve reverse olarak alıcıda ve vericide yapılır.
2. Alıcıda antikor tarama yapılır (94).

Son zamanlarda alıcıdaki ABO grublamanın iki kez farklı zaman dilimlerinde yapılması tavsiye edilmektedir (95).

2.8. Eritrosit Antikorlarının Tanımlanması

Taramada veya crossmatch de pozitif bir reaksiyon saptandıysa kan transfüzyonu verilmeden önce antikor spesifikliği tanımlanmalıdır. Shullman, bazı hastalarda yeni oluşan antikorların transfüzyondan sonra 1-2 gün içinde tanımlanabileceğini gösterdi (96). Böyle bir spesifikite testi yapmadan önce çok geniş çaplı hücre panellerine ihtiyaç vardır. En önemli kan grubu antijenleri için pozitif veya negatif olan çeşitli eritrositleri kapsayan hücre panelleri kullanılmalıdır. Bir tanımlama paneli 8-20 farklı eritrosit süspansiyonu içerir.

Antikor tanımlama fikri bir protokole olabildiğince bağlı olmalıdır. Antikor taramada kullanılan IAT testi antikor tanımlamada da geleneksel bir metottür.

Tanımlama panelinde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olabilmesi için p değerinin 0.05 veya 0.01 den az olması gerekir. Hastanın eritrositleri üzerinde antikor bulunup bulunmadığını açığa çıkarmak önemlidir. Alloantikor ve otoantikorlar arasındaki ayırmda Direkt antiglobulin testi (DAT) kullanılır. DAT negatif ise serumda ki antikorlar büyük bir olasılıkla alloantikorlardır. Eğer alıcı daha önce transfüzyon almışsa, DAT pozitifliği alıcıdaki yabancı eritrositlerin alloantikorlarla kaplanması sonucu da gelişmiş olabilir. Bazen bir kişide hem oto hem de alloantikor birlikte bulunabilir. DAT pozitif bir kişide eğer alloantikor mevcut ise bunun tanımlanması için ya otoabsorbsiyon ya da alloabsorbsiyon yapılması gerekebilir. Eğer alıcıda derin bir anemi varsa veya daha önce transfüzyon almış ise otoabsorbsiyon uygulanamaz, bu gibi hallerde tek seçenek alloabsorbsiyondur. Otoantikorların cinsini tayin etmenin pratikte bir önemi yoktur (10). Antikor tanımlaması yapılan hastaların kayıtları transfüzyon servisleri tarafından saklanmalıdır (85). Antikor tanımlamada negatif reaksiyonlarla muhtemel antikorlar dışlanır, pozitif reaksiyonlarla ise kanıtlanır, ayrıca hastanın eritrositlerinde antikora karşılık gelen antijenin olmaması (negatif) gerekir.

2.9. Antikorların Dışlanması

Eğer panel hücreleri ile yapılan IAT testinde reaksiyon negatif ise o hücrede bulunan antijenlere karşı gelişmiş antikor olamaz, olsaydı reaksiyonun pozitif olması gerekirdi. Bu yöntem dışlama ya da eliminasyon denir. Dışlamanın kesinlik kazanması için iki negatif reaksiyonun homozigot hücrelerde görülmesi gerekir. Zayıf antikorlar heterozigot eritrositlerle reaksiyona girmeyebilir, bu nedenle önemli antijenler, tanımlama panelindeki hücreler üzerinde homozigot olarak bulunmalıdır (C, c, D, E, e,

k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N). Ancak K, Lu^a, Kp^a antijenleri homozigot olmaları oldukça nadirdir ve bu yüzden panelde bu antijenlerin homozigot olmasına gerek yoktur. Panel hücrelerinin reaksiyon şiddeti bize bir takım ipuçları verebilir, örneğin; reaksiyonlar hep aynı şiddette ise tek antikordan, değişken şiddette ise birden fazla antikor varlığından, hep aynı şiddette bütün hücreler reaksiyon veriyorsa high-frequency antikor varlığından şüphenilmelidir.

2.10. Pozitif Reaksiyonların Değerlendirilmesi

Eğer bir panel hücresinde pozitif reaksiyon varsa ve o hücrede elenmemiş sadece bir antijen varsa, antikor muhtemelen o antijenle reaksiyona girmiştir (pozitif reaksiyon). Aynı antijenin negatif olduğu bütün panel hücrelerinde reaksiyonlar negatif olmalıdır. Pozitif reaksiyon görülen hücrede birden fazla elenmemiş antijen varsa, reaksiyon dikkate alınamaz.

2.11. Bulunan Antikorların Doğrulanması

Tesbit edilen antikora karşı hastada antijen bulunmamalıdır, çünkü hasta kendisinde olmayan antijene karşı alloantikor yapabilir. Örneğin, anti-Fy^a tanımlandıysa, Fy^a'nın yokluğu belirlenmelidir. Bu amaçla hastanın eritrositleri antijenik açıdan test edilir. Yalnız burada hastanın son üç ay içinde kan transfüzyonu alıp almadığı bilinmelidir, çünkü antijen testindeki pozitif bir reaksiyon transfüze edilmiş donör eritrositleri ile oluşabilir (10).

2.12. Fisher'in tam metodu

P olabilirliği antikor tanımlama sonuçları olup, saf koinsidansa dayanır ve Fisher'in tam metodu ile ölçülür. Hücre panelindeki pozitif ve negatif reaksiyonların sayısı bu metot için önemlidir. Serum reaktivasyonunun varlığı veya yokluğu test eritrositleri üzerindeki belirli antijenlerin varlığı veya yokluğu ile koreledir (97).

P değerinin hesaplanması için uygulanan formül aşağıdaki gibi olmalıdır.

A: Eritrositlerin belirli antijenlerle birlikte pozitif reaksiyon sayısı

B: Eritrositlerin belirli antijenlerin yokluğunda pozitif reaksiyon sayısı

C: Eritrositlerin belirli antijenlerle birlikte negatif reaksiyon sayısı

D: Eritrositlerin belirli antijenlerin yokluğunda negatif reaksiyon sayısı

N: Test eritrositlerinin total sayısı (A+B+C+D)

$$P = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{N!A!B!C!D!}$$

Sonuçlar Fisher'in tam metot kriterlerini karşılarsa istatistiksel olarak oldukça güvenilir demektir. Bu metotla olasılık 'p' değeri hesaplanır. P-değeri<0.01 ise antikor tanımlama güvenilir olur. Antikor spesifikliğini teyit edecek gerekli farklı eritrosit sayısı Fisher'in tam metodunu karşılamalıdır (98,99). Sonuçları yorumlayan bilgisayar programları mevcuttur, ayrıca bu programlar ile geçmişte tanımlanan antikor bilgilerine ulaşılabilir (100).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Yürütülmesi:

Ocak 2007 ile Haziran 2008 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Pediatrik Onkoloji Polikliniği tarafından takip edilen 72 Talasemi majör hastası (46 erkek-26 kız) ile Gaziantep Üniversitesi İç Hastalıkları Hematoloji Bölümü tarafından takip edilen 14 Talasemi majörlü hasta (7 erkek-7 kız) bu çalışmaya katıldı. Çalışma için 191 karar numarası ile yerel etik kuruldan onay alındı. Hastalar çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onay alındı. Hastalar düzenli olarak hastanemizde 2-4 haftada bir eritrosit transfüzyonu alıyorlardı. Ancak hastaların çoğunda transfüzyon tedavisine hastanemizde başlanmadığı için alloantikörlerin ne zaman geliştiğini tespit etmek mümkün değildi. Hastalığın doğasından dolayı, hastaların hepsinde bir yaşından önce eritrosit transfüzyonuna başlanmıştı. Hastanemizde öncelikle tüm hastalara, transfüzyon öncesi uyumluluk testleri yapılmaktadır. Burada hem alıcının hem vericinin kan grupları ABO ve Rhesus D açısından incelenmektedir. Kan gruplarının saptanmasında Tango® (Biotest AG, Germany, Köln) tam otomatik cihazda, mikropate aglutinasyon yöntemi ile çalışıldı. Burada kan grubu tayini için kullanılmaya hazır, kurutulmuş monoklonal antikörlerle (anti-A, anti-B) muamele edilmiş, mikropakalar kullanılmıştır. Daha sonra alıcının serumundan antikör tarama yapıldı. Antikör tarama tam otomatik Tango® (Biotest AG, Germany, Köln) cihazı ve Biotestcell®-P3 test hücreleri kullanıldı. Bu test rutin taramaya uygun bir solid faz (Solidscreen II) testidir. Burada kullanılan reaktif eritrosit hücreleri Biotestcell®-P3 olarak adlandırılan (P1, P2, P3) üç hücre panelini içermektedir. Üç farklı donörden elde edilen bu hücreler klinik önemi olan tüm antijenleri içermektedir, ayrıca bunların bir kısmı homozigot yapıdadır.

Solidscreen II test sisteminde esas olarak yapılanlar şunlardır; 50µl serum/plazma mikrotest plaklarındaki protein A ile aktive edilir. Serum veya plazma numunesi, donör eritrosit hücreleri veya otokontrol için hasta eritrosit hücreleri, reaktif eritrosit hücreleri ile mikrotest plaklarında 37°C de inkube edilir. Daha sonra santrifugasyon ve yıkama

adımı gelir. Santrifugasyonda anti-human globulin eklenir. Anti-human globulin reaktiflerinin köprü oluşturabilme kabiliyeti nedeniyle kompleman veya antikorlarla kaplı eritrosit hücreleri santrifugasyon adımı süresince mikrotest plağının üst bölümünde asılı bulunur. Serbest eritrosit hücreleri ise iyi görülmeyebilir ve santrifugasyondan sonra dipte görülür. Solidscreen II test sistemi temelde solid faz tekniğine dayanır.

3.2. Sonuçların Yorumlanması:

Biotestcell P1, P2 yada P3' den herhangi birinin pozitif olması ihtiva ettiği eritrosit antijenlerine karşı antikor oluştuğunu gösterir. Üç faz testindeki negatif reaksiyonlar serumda üç farklı hücrelerde bulunan antijenlere karşı antikor oluşmadığını gösterir (Tablo 2).

Tablo 2. Reaksiyon gücü ile agglutinasyon arasındaki ilişki

Reaksiyon gücü	Agglutinasyon
4+	Bir tek aglutinat. Serbest eritrosit hücresi yok.
3+	Güçlü reaksiyon. Birkaç büyük agglutinatlar.
2+	Öbekler halinde çok sayıda agglutinatlar. Serbest eritrosit hücresi yok.
1+	Birçok sayıda küçük agglutinatlar ve bir grup serbest eritrosit hücresi.
+/-	Makroskopik olarak değerlendirilebilen eritrosit süspansiyonları ve çok sayıda mikroskopik agglutinasyonlar.
-	Agglutinasyon olmadan homojen eritrosit süspansiyonu

Antijenite özelliği azalabileceğinden dolayı reaktif hücreler son kullanım tarihinden sonra kullanılmamalıdır, son kullanım tarihi ürün etiketinde yer almaktadır.

Biotestcell®-P3, Solidscreen II testi, tam otomatik Tango® (Biotest AG, Germany, Köln) sistemi için üretilmiştir.

Eğer antikor taramada pozitiflik saptanmışsa, antikor tanımlamaya geçilebilir. Antikor tanımlamada solid faz (Solidscreen II) yöntemi ile Cellbind Screen (^{REF} K7000) reaktif hücreler kullanıldı. Tüm solusyonlar kan grubu 0 olan erişkin donörlerden elde edilir. Hücreler özel koruyucu ortamda muhafaza edildi. Testin ilkesi affinite tekniğine dayanmaktadır. Antijen profil kağıdı tüm panelleri içermektedir. Kağıttaki kolonlar

enzimle muamele edilip ortadan kaldırılan veya reaksiyon gücü azaltılan antijenleri göstermektedir. Kağıttaki antijen varlığı veya yokluğu, tek bir kaynaktan spesifik antikor ile tanımlanmalıdır.

Eritrosit hücreleri 2-8°C de korunmuştur. Koruyucu olarak %0.025 lik kloramfenikol, %0.001 lik gentamisin ve %0.01 lik neomisin sülfat kullanılmıştır. Tüm kan hücreleri enfeksiyon taramasından geçirilmiş ve negatif bulunmuştur. Kan örnekleri aseptik koşullarda elde edilmiştir. Numunelerin test edilmesi ertelendiğinde 2-8°C de saklanmıştır.

Hastaların antikor tanımlaması yapıldıktan sonra tanımlanan antikorun cinsine, özelliğine göre mevcut stoklardaki kan ürünlerinde, ABO-Rhesus uygun numunelerden belirlenen antikorun karşıtı, antijen negatif kan ürünü tespit edilip, crossmatch yapılarak transfüzyon uygulanmıştır.

Antijen tanımlamada DiaMed-ID (DiaMed AG,1785 Cressier s/Morat, Switzerland) kiti kullanılmıştır. ID-Card 'DiaClon Rh-subgroups + K' Kell tiplendirilmesi ve tam bir Rh fenotiplemesini sağlar. ID-Card 'DiaClon Rh-subgroups + K' her biri jel matriksi içinde olacak şekilde monoklonal antikorlar ve koruyucu olarak <%1 NaN3 içerir. mikrotübüler yapıdadır. İhtiyaç duyulan ajanlardan bir diğeri, ID-Diluent 2 dir. Bunun içinde eritrosit süspansiyonları için modifiye LISS solüsyonu bulunmaktadır. Kan örnekleri tercihen sitrat, EDTA'lı tüpler içine konulmalıdır. Temiz bir tüpe 0.5 cc ID-Diluent 2 konur, üzerine 50 µL kan numunesi eklenir ve karıştırılır. Test prosedürüne göre öncelikle ID-Card üzerindeki aliminyum folyo çıkarılır, ID-Card'ın tüm mikrotübüllerine 10 µL eritrosit süspansiyonu eklenir ve ID-Centrifuge içinde 10 dakika santrifugasyonu yapılır. Sonuçların yorumlamasına gelince;

Pozitif : Jel yüzeyi üzerinde kırmızı bir hat oluşturan aglutine hücreler görülür, dört basamakta değerlendirilir.

Negatif: Mikrotübül tabanında hücre kümesi görülür.

4. BULGULAR

Çalışma Ocak 2007 ile Haziran 2008 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasında yapıldı. Çalışmaya 72'si pediatrik yaş grubunda 14'ü erişkin yaş grubunda olmak üzere toplam 86 hasta alındı. Pediatrik yaş grubu 46 erkek (%63.9) ve 26 kız (%36.1) hastadan oluşmaktaydı. Erişkin yaş grubunda ise 7 erkek (%50) ve 7 kız (%50) hasta mevcuttu. Pediatrik hastaların yaş grupları minimum 1 ile maksimum 16 arasında değişirken erişkin hastalar ise minimum 18 ile maksimum 52 yaşları arasında yer almaktaydı. Pediatrik hastaların ortalama yaşları 7.47 ± 3.9 bulundu. Erişkin hastaların ise ortalama yaşları 27.36 ± 9.54 bulunmuştur.

Hastalar, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Pediatrik Onkoloji ve İç Hastalıkları Hematoloji bölümlerinde takip edilmekte olan vakalardır. Vakaların hepsi Talasemi majör tanısı almış ve önemli bir kısmında bir yaşından önce eritrosit transfüzyonlarına başlanmıştı.

Çalışmanın başlangıcında 72 pediatrik vakanın 5'inde (%6.9), 14 erişkin vakanın 3'ünde (%21.4), toplamda ise 86 hastanın 8'inde (%9.3) IAT testi pozitif bulundu. Onsekiz aylık çalışma süresi içerisinde IAT testi negatif olan pediatrik vakaların 4'ünde testin pozitifleştiği görülmüştür. Erişkin vakalarda bir değişiklik olmamıştır. Süre sonunda 72 pediatrik vakanın 9'unda (%12.5), toplamda ise 86 hastanın 12 tanesinde (%13.9) IAT testi pozitif bulundu.

Alloantikör gelişimi açısından kadın ve erkek arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Fisher'in kesin testi $p > 0.01$). Ayrıca alloantikör gelişme sıklığı yaşa göre bir fark göstermedi (Fisher'in kesin testi $p > 0.01$).

Tüm hastalar dikkate alındığında alloantikör sıklığı sırasıyla; Anti-K %33.3, anti-E %25, anti-C %16.6, anti-D %16.6 ve anti-Fy^a %8.3 bulunmuştur. Bir vakada birden fazla antikör profili varken, antikörlerin sadece biri tanımlanabilmiştir.

Pedriatrik yaş grubuna göre ise dağılım şu şekildedir; Anti-K %44.4, anti-C %22.2, anti-E %11.1, anti-D %11.1 ve anti-Fy^a %11.1 dir. Erişkin yaş grubunda ise; Anti-E %66.6, anti-D %33.3 bulundu (Tablo 3).

Tablo 3. Yaşa göre alloantikor dağılımı

Alloantikor cinsi	Pedriatrik vaka sayısı	Erişkin vaka sayısı	Total vaka sayısı
Anti-K	4	--	4
Anti-E	1	2	3
Anti-C	2	--	2
Anti-D	1	1	2
Anti-Fy ^a	1	--	1
Toplam	9	3	12

İki kardeş hastada DAT testi takip sırasında sonradan pozitifleşti, her iki vakada da IgG (4+) bulunurken, otokontrolleri de pozitif bulunmuştur. Daha önce IAT testi (alloantikor) pozitif olan pedriatrik dört vaka ise sonradan negatifleşmiştir.

Antikor pozitif olan hastaların eritrosit antijenleri jel santrifügasyon yöntemi ile çalışıldı. Anti-K pozitif olan vakaların Kell antijeni negatif, anti-E pozitif olan vakaların E-antijeni negatif, anti-C pozitif olan vakaların C-antijeni negatif ve anti-D pozitif olan vakaların ise D-antijeni negatif bulundu.

5. TARTIŞMA

β talasemi major ciddi anemi ile seyreden bir hastalıktır, düzenli yerine koyma tedavisi yapılmazsa hayatın ilk on yılında fatal seyreder. 1960'lerden itibaren kan transfüzyonunun devreye girmesi β talasemi için dönüm noktası olmuştur, paralel olarak hastalığın doğal gidişi dramatik olarak, transfüzyonun yan etkilerine kaymıştır. Aynı zamanda tedavi verilen β talasemi majör hastaları, yaşam boyunca takip ve tedavi alması gereken bir transfüzyon komplikasyonu olan demir birikiminden etkilenirler. Uzun dönem demir şelasyon tedavisine, donör kanının virolojik açıdan taranmasına rağmen β talasemi majör olan yetişkin ve çocuk hastalarda, dokularda demir birikimi ve kanla geçen enfeksiyonlar önlenememiş ve morbidite-mortalitenin temel nedenleri olmuştur, ayrıca Talasemi hastalarında akut ya da gecikmiş hemolitik transfüzyon reaksiyonlarına neden olan eritrosit alloimmünizasyonu gelişir, bundan dolayı kronik transfüzyon desteğindeki hastalar, transfüzyon tedavisinin başlangıcında klinik ile ilişkili eritrosit alloantikörleri taranmalı ve düzenli olarak izlenmelidir (101).

Eritrosit antijenlerine karşı primer alloimmünizasyon transfüzyondan haftalar veya aylar sonra ortaya çıkabilir. Alloimmünizasyon sonucu oluşan antikörler, özellikle Kidd sistemindeki antikörler (anti-Jk^a ve anti-Jk^b), zamanla ölçülemeyecek düzeylere düşebilir, daha sonra antikor yapımına neden olan antijeni eksprese eden eritrositler nakledilirse, gelişen anamnestic reaksiyon sonucu, birkaç saat veya birkaç gün içinde nakledilen eritrositlerle reaksiyon veren IgG sınıfı antikörler ortaya çıkar ve hastada hemoliz gelişerek, DAT pozitifleşir. Bu nedenle daha önce gelişmiş bir alloantikörün tanımlanması ve hasta kayıtlarına geçirilmesi oldukça önemlidir, aksi takdirde bu tip bir komplikasyonun ön tedbiri alınamaz. Eğer bir hastada hemolitik transfüzyon reaksiyonundan şüphelenilirse taze elde edilmiş kan örneğinden, DAT testi yapılır, pozitif olması durumunda IAT testine geçilir, sonuç pozitif ise, antikor tanımlamaya geçilir. Hemolizi olan bir hastada daha önce bir antikorun bulunması gecikmiş

hemolitik transfüzyon reaksiyonunu kuvvetle teyit eder. Transfüzyon ihtiyacı devam ediyorsa, tespit edilen antikorun ilgili antijenini içermeyen donör üniteleri seçilmelidir. Gelecekte yapılacak testlerde, antikor tekrar ölçülemeyecek düzeylere inerse de, hasta anamnestik reaksiyona yol açan antijenlere maruz kalmamalıdır. Bazı hastanelerde hastalara taşıdığı antikoru bildiren tıbbi ikaz kartları verilir böylece hastaya başka bir hastanede transfüzyon gerekecekse hasta bu kartı gösterir. Bu konu ile ilgili olan klinikler, önemli antikorları taşıyan hastalara ait kayıt ve dokümanları süresiz olarak hastanelerde saklamalı ve her transfüzyonda tekrar gözden geçirmelidir (102,103).

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Onkoloji ve İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalları tarafından Ocak 2007 ile Haziran 2008 yılları arasında takip edilen toplam 86 Talassemi majör hastasının 12'sinde(%13.9) alloantikor geliştiği görüldü. Alloantikorların cinsine göre dağılımı ise; anti-K: %36.3, anti-E: %27.2, anti-C: %18.1, anti-D: %18.1, anti-Fy^a: %8.3 şeklinde idi. Ülkemizde Duran Canatan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 156 hastanın 14'ünde (%8.9) oranında alloantikor saptanmıştır (104). Literatürde bu konuda yapılmış pek çok çalışma mevcuttur; Wang Y ve ark. nin yaptığı çalışmada düzenli transfüzyon alan 30 hastanın 11'inde (%37), Fongsatikul L ve ark. nin yaptığı çalışmada 632 vakanın 19'unda (%3), Tardtong P ve ark. nin yaptığı çalışmada 164 hastanın 14'ünde (%8,5), Michail V ve ark. nin yaptığı çalışmada, 120 vakanın 23'ünde (%19,16); Spanos Th ve ark. 973 vakanın 220'sinde (%21,1), Ameen R ve ark. nin yaptığı çalışmada 190 hastanın 57'sinde (%30), Daniele P ve ark. nin yaptığı çalışma da 139 yetişkin hastanın 49'unda (%35), Schonewille H ve ark. nin yaptığı çalışmada ise %33,8 oranında bulunmuştur (104-111).

İlk bakışta elde edilen sonuçların oldukça önemli farklılıklar gösterdiğini söyleyebiliriz. Bütün bu çalışmaları daha yakından analiz ettiğimizde ise pek çok açıdan yapısal farklılıklar içerdiklerini görebiliriz. Bu farklılıkları başlıca yaş (pediatrik/erişkin), çalışmanın retrospektif veya prospektif olması, fenotipik transfüzyon uygulaması, populasyonun genetik yapısının çeşitliliği, kullanılan kan ürününün lökosit içeriği şeklinde özetleyebiliriz (Tablo 4).

Yukarıda zikredilenlerin bazılarının eritrosit alloimmünizasyon oluşumuna direkt etkisi olduğuna inanılmaktadır, hastalar ve donör populasyonunun eritrosit antijenik yapılarının arasındaki farklılık (genetik heterojenite) gibi. Örneğin Wang Y ve arkadaşlarının (105) Tayvan'da yaptığı çalışmada alloantikor tespit edilen 11 vakanın

3'ünde anti-Mi saptanmıştır. Bu antikorun oluşumu Tayvana özgündür, çünkü Mi antijen delesyonu (yokluğu) en çok bu toplumda görülmektedir, sonuç olarak alloantikor görülme sıklığı (11/3, %27.2) oranından etkilenmiştir ve bu ülkede farklı Çinli gruplar ve yerli kabilelerden dolayı populasyon heterojenik bir yapıdadır (105).

Tablo 4: Literatürdeki değişik çalışmalardaki yapısal farklılıklar

Çalışma	Yaş (ped/eriş)	Genetik Heterojenite	Prospektif	Fenotipik Transfüzyon	Filtrasyon	Antikor Sıklığı
Wang	30	+	--	--	+	% 37
Daniele	--/139	--	--	--	+	% 35
Schonewille	653	--	--	--	+	% 33.8
Ameen	190	+	--	--	+	% 30
Spanos	973/--	--	--	--	+	% 21.1
Michail	56/--	--	+	+	+	% 14.2
Bizim	72/14	--	+	--	+	% 13.9
Canatan	156/--	--	+	--	+	% 8.9
Tardtong	164/--	--	--	--	+	% 8.5
Fongsatikul	632/--	--	+	--	+	% 3

Ameen R ve ark. nın çalıştığı populasyon da oldukça heterojenik yapı göstermektedir; vakaların bir kısmını ülke dışından gelen göçmenler teşkil etmektedir, bulunan alloantikor sıklığı (%30), Wang Y ve ark. nın bulduğu orana (%37) benzerlik göstermektedir (105,106). Bizim çalışmamın yapıldığı populasyonda majör bir genetik heterojenite faktörünün olduğunu söylemek oldukça güçtür.

Bizim çalışmamıza genetik altyapı açısından benzerlik gösteren çalışma Canatan D ve ark. na aittir. Her iki çalışmada prospektif olup, fenotipik transfüzyon uygulanmamıştır, bununla beraber alloantikor görülme sıklığı farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızdaki erişkin yaş grubunun sonuçlarını dikkate almadığımız takdirde (Canatan D ve ark. nın çalışmasında erişkin yaş grubu yoktur.) alloantikor görülme sıklığı %12.5'e düşmektedir ve her iki çalışmanın arasındaki fark kısmen azalmaktadır (%12.5-%8.9), ayrıca Canatan ve ark. nın tespit ettiği antikorların bazıları klinik öneme haiz olmadığı gibi, bizim çalışmamızda anti-D oranı daha yüksek bulunmuştur (104).

Hipotetik olarak antikor sıklığının en az görülmesi gereken sonuçlar genetik heterojen olmayan, fenotipik ve lökositlerden arındırılmış (filtrasyon) kan ürünlerinin

kullanıldığı çalışmalarda beklenmelidir. Tablo 4’de görüldüğü gibi, bu kriterlerin tümünü kapsayan bir çalışma yoktur, bununla beraber Michail V ve ark. fenotipik transfüzyon kullanılan tek çalışmadır. Fenotipik transfüzyonun antikor oluşumunu engelleyen en önemli faktör olduğu düşünülürse, Michail V ve ark. bulduğu oranın en düşük olması gerekmektedir, halbuki sonuç, beklendiği gibi değildir (%14.2). Tespit edilen antikorların hepsi Rh (D,C,E,c,e) ve Kell (K,k) gruplarının dışındaki antikorlardır; M, N, S, s, Jk, Le ve Fy^a. Fenotipik transfüzyonda genel olarak Rh alt grupları ve Kell antijeni dikkate alınmaktadır. Sonuç olarak Michail V ve arkadaşlarının uyguladığı fenotipik transfüzyon modelinde, fenotipik eşleşme antikor oluşumundan tam koruma sağlamıştır. Eşleşme dışındaki antijenlere karşı antikor oluşumu ise son derece doğaldır. Bununla beraber bu çalışmada antikor oluşum sıklığında azalma (diğer çalışmalara göre) görülmemiştir; vaka sayısının azlığı ve laboratuvarlar arası farklılıkların etkisini burada düşünmek zorundayız. Yine de bu çalışma bize daha geniş yelpazede yapılacak bir fenotipik transfüzyonun, talasemi gibi sık transfüzyon alan tüm hastalarda antikor gelişimi açısından son derece faydalı bir önlem olacağını göstermektedir (107).

Literatürde antikor sıklığının en düşük (%3) bulunduğu çalışma ise Fongsatikul ve arkadaşlarına aittir. Bu çalışmada fenotipik transfüzyon uygulanmadığı halde değerin bu kadar düşük olması ise “kazanılmış tolerans” yani β talasemili çocuklarda düzenli transfüzyon programına erken dönemde başlanmasıyla açıklanmaktadır (108). Kan ürünlerinde lökosit azaltma tekniklerinin (filtrasyon) uygulanması, bizim çalışmamızda dahil olmak üzere bütün çalışmalarda (Tablo 4) uygulanmıştır.

Lökositler arındırılmış kan ürününün kullanımının eritrosit alloimmünizasyonundan korunmada etkin olduğu bilinmektedir, bununla beraber arındırma işleminin saklama sonrası yapılması, kan ürünlerindeki lökositlerin apoptozise uğramasına ve immünojen lökosit antijenlerinin salımına yol açmakta, dolayısıyla etkinliği azaltmaktadır (105). Ayrıca, filtrasyonun ne ölçüde etkin olduğunun denetimi de (kalite kontrol) son derece önemlidir. Bizim çalışmamızda lökosit filtrasyonunun bir kısmı saklama öncesi diğer bir kısmı ise saklama sonrası yapılmıştır, kalite kontrol ise uygulanmamıştır, çalışmaların (Tablo 4) hiçbirinde saklama öncesi filtrasyon yapılmadığı rapor edilmiştir. Kan ürünlerini sonuç olarak lökosit arındırmanın talasemi hastalarında alloimmün

antikor oluşumu üzerine negatif etkisini öğrenmek için daha disiplinli yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tablo 5. Literatürdeki bazı çalışmalarda alloantikör dağılımı

	Anti-K	Anti-D	Anti-C	Anti-c	Anti- E	Diğer
Bizim çalışma	%33.3	%16.6	%16.6	--	%25	%8.3
Canatan	%29.6	%7.4	--	%14.8	% 3.7	%44.5
Wang	--	%9.09	--	%18.1	%36.3	%36.4
Fongsatikül	--	--	--	--	%42.1	%57.8
Michail	--	--	--	--	--	%100
Spanos	%29.8	%34	--	--	--	%36.2
Ameen	%28.8	%8.4	%6.3	%3.5	%18.3	%34.6

Literatürdeki çalışmalarda Talasemi hastalarında oluşan alloantikörlerin cinsi oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip olmasına rağmen bunların önemli bir kısmı klinik öneme sahip (hemoliz yapma kabiliyeti) antikörlerdir (Tablo 5). Yapılan çalışmaların tümünde en sık görülen antikörlerin Rh alt grubu ve Kell antijenine karşı geliştiğini söyleyebiliriz.

Bizim çalışmamızda en sık anti-K antikoru (%33.3) bulunurken, Canatan ve ark. benzer bir sonucu (%29.6) rapor etmiştir. Ayrıca, Spanos ve ark., Ameen ve ark., Daniele ve ark. çalışmalarında da anti-K en sık görülen antikördür (101,104,106,109).

Sonuç olarak talasemi hastalarında alloimmün antikör oluşumunun önemli bir kısmı Rhesus-subgrub (D,C,c,E,e) ve Kell antijenine dayanan fenotipik transfüzyonla önlenir. Michail ve ark. bu modeli uygulayarak tam koruma sağlamıştır, bununla beraber eşleşme dışı kalan antijenlere karşı antikör yapımının devam edeceğini yine bu çalışma bize göstermektedir (107).

Rhesus alt grubu ve Kell antijeni dışındaki antijenlerin bir kısmı hem daha az immünojeniktir ve hem de hemoliz yapma kabiliyetleri daha azdır. Fenotipik eşleştirmenin Rhesus alt grubu ve Kell antijeni dışınada genişletmenin fayda-maliyet açısından tatminkar olmayacağı aşikardır, ayrıca transfüzyondan önce yapılması gereken serolojik crossmatch bize Rhesus alt grubu ve Kell antijeni dışında gelişmiş antikörlerin varlığı hakkında kısmende olsa fikir verebilir (heterozigot antijenik yapı reaksiyon vermeyebilir).

Literatürdeki çalışmaların çoğunda, bizim çalışmada dahil olmak üzere, anti-D antikorunu saptanmıştır. D antijeni eşleşmesi rutin olarak uygulandığı halde, anti-D antikorunun ortaya çıkışı beklenmeyen bir gelişmedir. Bu durumu hipotetik olarak analiz edecek olursak; Donörlerde D antijeninin tespitinde hata yapılmıştır (yanlış negatif) veya hastalar zayıf-D antijeni ile karşılaşmıştır. Zayıf-D antijeni taşıyan eritrositler, anti-D reagenlerle serolojik reaksiyona girmeyerek D negatif gibi görünürler ve sonuçta bu donörler D-negatif işaretlenir. Esasen Amerikan Kan Bankaları Birliği (AABB) donörlerde zayıf-D antijeni bakılmasını zorunlu kılmıştır. Zayıf-D antijeni pozitif bulunan numuneler D pozitif olarak işaretlenir. Bizde yakın gelecekte donörlerde zayıf-D antijeni taramasına başlamayı planlıyoruz.

Sonuç olarak talasemili hastalar sık transfüzyon yapılmasından dolayı oldukça ciddi alloantikör geliştirme riski taşıyorlar, bu ise daha çok hemoliz ve demir birikimine sebep olacaktır. Bu nedenle talasemili hastalarda antikör tarama testleri düzenli olarak yapılmalı ve transfüzyon politikaları, lökosit filtrasyonu ve fenotipik eşleştirme açısından yeniden yapılandırılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. 4 th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2001.
2. Efremov GD. Beta-thalassemia and Hb lepore among Yugoslav, Bulgaristan, Turkish, Albanian. *Haematologica* 1990;75:31-41.
3. Aksoy M. Thalassaemia minör with large amount of fetal haemoglobin: Report of four cases. *Acta haematologica* 1959;22:188-193.
4. Aksoy M. The History of β -Thalassaemia in Turkey. *Turkish J Pediatr* 1991;33:195-197.
5. Çavdar OA, Arcasoy A. The incidence of beta thalassemia and abnormal hemoglobins in Turkey. *Acta Heamatol* 1971;45:312.
6. Dinçel G, Aksoy M, Erdem S. Beta thalassemia with increased HbA2 in Turkey: Study on 164 thalassemia heterozygotes. *Hum Hered* 1964;29:272.
7. Dinçel G, Aksoy M, Erdem S. β -Thalassaemia with increased HbA2 in Turkey : Study in heterozygotes. *Human heredity* 1979;29:272-278.
8. Kürkçüoğlu M, Dağcı A, Gencelli Y, Arcasoy A. β -Thalassaemia and abnormal hemoglobin in East Anatolia. *Doğa* 1986;10:13.
9. Lee GR, Bithell TC, Foester J, Athens JW, Lukens JN. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th Ed. Philadelphia: Lea-Febiger; 1993.
10. Engelfriet CP, Meulenbroek AJ, Visser AJS, Ligthart PC, Overbeeke MAM. *Sanquin Blood Supply Foundation. Immunohaematology* 2003:1-102.
11. Noor Haslina MN, Ariffin N, Illuni Hayati I, Rosline H. Red cell immunization in multiply transfused Malay thalassemic patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37:1015-1020.

12. Bhatti FA, Salamat N, Nadeem A, Shabbir N. Red cell immunization in beta thalassaemia major. *J Coll Physicians Surg Pak* 2004;14:657-660.

13. Achtelig C, Grünelt E, Surber H. Evaluation of the erythrocyte antibody registry in East Germany. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1985;112:456-462

14. Vengelen VT. AABB Technical Manual. 13th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks ; 1999.

15. Darabi K, Dzik S. Hyperhemolysis syndrome in anemia of chronic disease. *Transfusion* 2005;45:1930-1933.

16. Norska I, Turlej S. Physical and psychological development of children following hemolytic disease of newborn. *Wiad Lek* 1965;18:917-921.

17. Hoffman PC. Immune hemolytic anemia selected topics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:13-18.

18. Packman CH, Leddy JP. Cryopathic hemolytic syndromes. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, eds. *Williams hematology*. 5th ed. Newyork: McGraw-Hill; 1995:685-91.

19. Maekawa T. Delayed hemolytic transfusion reaction unrecognized and underestimated clinico-pathological conditions. *Rinsho Ketsueki* 2008;49:1306-1314.

20. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymph. *Zbl Balk* 1900;27:367.

21. Beattie KM. Discrepancies in ABO grouping. In: A seminar on problems encountered in pretransfusion tests. Washington (DC): American Association of Blood Banks; 1972;129-165.

22. Sato C, Maeda H. Errors in detection of subgroups in the ABO blood group system. *Nippon Rinsho* 1997;55:2362-2368.

23. Kaur P, Basu S, Bedi RK, Kaur G. Bombay phenotype in two North Indian brothers: a case report. *Indian J Pathol Microbiol* 2007;50:919-921.

24. Lewis M, Anstee DJ, Bird GWG, Allen FH Jr, Brodheim E, Contreras M, et al. From the ISBT working party on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang* 1990;58:152-169.
25. Daniels G, Moulds JJ, Anstee DJ, Bird GW, Brodheim E, Cartron JP, et al. ISBT working party on terminology for red cell surface antigens: Sao Paulo report. *Vox Sang* 1993;65:77-80.
26. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* 2008;55:174-182.
27. Westhoff CM, Reid ME. Review: the Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. *Immunohematology* 2004;20:37-49.
28. Laird FB, Daniels G, Levitt J, editors. Blood group systems: Kell. Arlington (VA): American Association of Blood Banks; 1990.
29. Redman CM, Lee S. The Kell blood group system. *Transfus Clin Biol* 1995;2:243-249.
30. Marsh WL, Redman CM. The Kell blood group system: a review. *Transfusion* 1990;30:158-167.
31. Ridgwell K, Dixey J, Scott ML. Production of soluble recombinant proteins with Kell, Duffy and Lutheran blood group antigen activity, and their use in screening human sera for Kell, Duffy and Lutheran antibodies. *Transfus Med* 2007;17:384-394.
32. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975.
33. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrezeczna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1993;90:10793-10797.
34. Marsh WL, Ehrlich CC. The Duffy blood group system: a review of recent developments. *Infusionsther Klin Ernahr* 1975;2:280-289.

35. Beattie K. A review: the Duffy blood group system. *Immunohematology* 1989;5:45-54.
36. Marshall CS, Dwyre D, Eckert R, Russell L. Severe hemolytic reaction due to anti-Jk3. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:949-951.
37. Davis KG, Abbott RL. Delayed haemolytic transfusion reactions: review of three cases. *Med J Aust* 1982;1:335-337.
38. Liu F, Liu J. Possible insensitivity of the polybrene antibody screen to detect anti-Jka. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:101-102.
39. Palacajornsuk P. Review: molecular basis of MNS blood group variants. *Immunohematology* 2007;23:44.
40. Sondag Thull D, Girard M, Blanchard D, Bloy C, Cartron JP. S-s-U-phenotype in a Caucasian family. *Exp Clin Immunogenet* 1986;3:181-186.
41. Longworth C, Rolih S, Moheng M. Mouse monoclonal anti-Lea and anti-Leb as routine grouping reagents. *Transfusion* 1985;25:44-46.
42. Kim MJ, Kim HS, Song KS, Noh SH, Kim HG, Paik YK, et al. Altered expression of Lewis antigen on tissue and erythrocytes in gastric cancer patients. *Yonsei Med J* 2002;43:427-434.
43. Narimatsu H. Glycosyltransferase genes for synthesis of Lewis antigens. *Nippon Rinsho* 1995;53:1735-1746.
44. Kaneko M, Nishihara S, Shinya N, Kudo T, Iwasaki H, Seno T. Wide variety of point mutations in the H gene of Bombay and para-Bombay individuals that inactivate H enzyme. *Blood* 1997; 90:839-849.
45. Narimatsu H. Molecular biology of Lewis antigens--histo-blood type antigens and sialyl Lewis antigens as tumor associated antigens. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1996; 97:115-22.

46. Waheed A, Kennedy MS, Gerhan S. Transfusion significance of Lewis system antibodies: Report on a nationwide survey. *Transfusion* 1981;21:542-545.
47. Pierce SP, MacPherson CR, eds. *Blood group systems: Duffy, Kidd and Lutheran*. Arlington(VA): American Association of Blood Banks; 1988.
48. Poole J. Review: the Lutheran blood group system-1991. *Immunohematology* 1992; 8:1-8.
49. Advani H, Zamor J, Judd WJ, Johnson CL, Marsh WL. Inactivation of Kell blood group antigens by 2-aminoethylisothiuronium bromide. *Br J Haematol* 1982;51:107-115.
50. Moulds J, Moulds MM. Inactivation of Kell blood group antigens by 2-aminoethylisothiuronium bromide. *Haematol* 1983;23:274-275.
51. Mohan TC, Koo WH, Ng HW. A study of the P blood group system in the Singaporean population. *Singapore Med J* 1989;30:372-375.
52. Hellberg A, Chester MA, Olsson ML. Two previously proposed P1/P2-differentiating and nine novel polymorphisms at the A4GALT (Pk) locus do not correlate with the presence of the P1 blood group antigen. *BMC Genet* 2005;6:49.
53. Arndt PA, Garratty G, Marfoe RA, Zeger GD. An acute hemolytic transfusion reaction caused by an anti-P1 that reacted at 37 degrees C. *Transfusion* 1998;38:373-377.
54. Cheng G, Chan A, Chun M, Wong L . Evaluation of the gel test for antibody screening in a tertiary hospital in Hong Kong; insensitivity for some cold antibodies that are reactive at 37 degrees C by conventional indirect antiglobulin tests. *Clin Lab Haematol* 1995;17:81-84.
55. Knight RC, Poole GD. Detection of red cell antibodies: current and future techniques. *Br J Biomed Sci* 1995;52:297-305.
56. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreas M. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997

57. Weiner W, Shinton NK, Gray IR. Antibody of blood-group specificity in simple ("cold") haemolytic anaemias. *J Clin Pathol* 1960;13:232-236.
58. Lecomte J, Feizi T. A common idiotype on human macroglobulins with anti-I and anti-i specificity. *Clin Exp Immunol* 1975;20:287-302.
59. Maniatis A, Frieman B, Bertles JF. Increased expression in erythrocytic Ii antigens in sickle cell disease and sickle cell trait. *Vox Sang* 1977;33:29-36.
60. Mason HM, Arndt PA. A 13-year-old girl with cold agglutinin syndrome caused by anti-i. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:543-545.
61. Rolih SD. High-titer, low-avidity (HTLA) antibodies and antigens: a review. *Transfus Med Rev* 1989;3:128-139.
62. Stern DA, Hawksworth DN, Watt JM, Ford DS. A new low-frequency red cell antigen, 'SARAH'. *Vox Sang* 1994;67:64-67.
63. Confida S, Hurel C, Chesnel N, Garretta M, Muller A. Red blood cell antibody screening with groupamatic system. II. A two step haemagglutination technique using a trypsin polybren citrate method. *Vox Sang* 1981;40:34-43.
64. Deman AJM, Overbeeke MAM. Evaluation of the polyethylene glycol antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. *Vox Sang* 1990;58:207-210.
65. Gustafsson L, Wikman A, Lundahl J. Evaluation of a modified IAT gel with polyethylenglycol (PEG) addition method for red blood cell antibody identification. *J Clin Lab Anal* 2004;18:165-169.
66. Skaik YA, Overfield J. Detection of red cell antibodies: comparison of two low ionic strength diluents. *Br J Biomed Sci* 2006;63:18-20.
67. 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.

68. Champagne K, Spruell P, Chen J, Voll L, Schlanser G, Moulds M. Comparison of affinity column technology and LISS tube tests. *Immunohematology* 1998;14:149-151.
69. Szymanski IO, Gandhi JG. A new low ionic strength test for assessment of pretransfusion compatibility. Studies in vitro and in vivo. *Am J Clin Pathol* 1983;80:37-42.
70. Lee E, Redman M, Burgess G, Win N. Do patients with autoantibodies or clinically insignificant alloantibodies require an indirect antiglobulin test crossmatch? *Transfusion* 2007;47:1290-1295.
71. Wenz B, Apuzzo J, Shah DP. Evaluation of the polyethylene glycol-potentiated indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1990;30:318-321.
72. Howard JE, Winn LC, Gottlieb CE, Grumet FC, Garratty G, Petz LD. Clinical significance of anti-complement component of antiglobulin antisera. *Transfusion* 1982;22:269-272.
73. Judd WJ. A pH dependent autoagglutinin with anti-P specificity. *Transfusion* 1975;15:373-376.
74. Bruce C, Watt AH, Hare V, Blue A, Mitchell R. A serious source of error in antiglobulin testing. *Transfusion* 1986;26:177-181.
75. Packman CH, Leddy JP. Acquired hemolytic anemia due to warm reacting autoantibody. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, eds. *Williams hematology*. 5th ed. Newyork: McGraw Hill; 1995:677-685.
76. Canatan D. Antiglobulin Testler. *Kan bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbında Standartlar ve Kalite Kursu Kitabı* 2002:409-414.
77. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S. The gel test : A new way to detect red cell antigen –antibody reactions. *Transfusion* 1990;30:109-113.
78. Eichler H, Böhler A, Hastka J, Richter E, Kerowgan M, Goldmann SF . Micro-column affinity test and gel test: comparative study of two techniques for red cell antibody screening. *Vox Sang* 1999; 77:154-158.

79. Bjorck I, Peterson BA, Sjöquist J. Some physiochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Euro J Biochem* 1972;29: 79-584.

80. Bjorck I, Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G. A novel IgG binding agent. *J Immunol* 1984;133:969-974.

81. Sandler SG, Langeberg A, Rumsey DH, Novak SC. A solid phase and microtiter plate hemagglutination method for pretransfusion compatibility testing. *Haematologia* 2000; 30:149-157.

82. Gammon RR, Avery N, Mintz PD. Evaluation of CAPTURE CMV solid phase testing over the allowable shelf-life of red blood cells (adenine-saline added). *Transfus Sci* 1998;19:225-228.

83. Schrem A, Flegel WA. Comparison of solid-phase antibody screening tests with pooled red cells in blood donors. *Vox Sang* 1996;71:37-42.

84. Sazama K. Reports of 355 transfusion associated deaths: 1976 through 1985. *Transfusion* 1990;30:583-90.

85. Menitove J editor. *Standarts for blood banks and transfusion services*, 19th ed. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 1999.

86. Bilwani F, Kakepoto GN, Adil SN, Usman M, Hassan F, Khurshid M . Frequency of irregular red cell alloantibodies in patients with thalassemia major: a bicenter study. *J Pak Med Assoc* 2005;55:563-565.

87. Titlestad K, Georgsen J, Andersen H, Kristensen T. Detection of irregular red cell antibodies: more than 3 years of experience with a gel technique and pooled screening cells. *Vox Sang* 1997;73:246-251.

88. Lizza C, Myers J, Gindy L. Blood groups. In : Petz LD, Swisher SN, Kleinman S, et al, editors. *Clinical practice of transfusion medicine*. 3rd ed. Newyork: Churchill Livingstone; 1996;71:151.

89. D.Quinley E. *Immunoematology Principles and Practice*. 2nd ed. Philadelphia: New York; 1996.

90. Vengelen VT. AABB Technical Manual. 12th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks ; 1996.
91. Arslan Ö. Antikor tarama ve tanımlamada standart testler. Klinik Gelişim 2001; 14: 22-25.
92. Kuriyan M, Fox E. Pretransfusion testing without serologic crossmatch: approaches to ensure patient safety. Vox Sang 2000;78:113-118.
93. Oberman HA, Barnes BA, Steiner EA. Role of the crossmatch in testing for serologic incompatibility. Transfusion 1982;22:12-16.
94. Arslan O. Electronic crossmatching. Transfus Med Rev 2006;20:75-79.
95. Abstracts of the AABB Annual Meeting, October 20-23, 2007; Anaheim, California, USA. Transfusion 2007; 47(3 Suppl): 1A-273A.
96. Shulman IA. Controversies in red blood cell compatibility testing. In: Nance SJ editor. Immune destruction of red blood cells. Arlington(VA): American Association of Blood Banks; 1989:171-99.
97. Fisher RA. Statistical methods and scientific inference. 2 nd ed. Edinburgh, Scotland: Oliver and body; 1959.
98. Eckrich RJ. Use of a personal computer to determine the statistical validity of antibody identification by Fisher's exact method. Immunohematology 1988;4:34-37.
99. Thompson EA. R.A. Fisher's contributions to genetical statistics. Biometrics 1990; 46:905-914.
100. Rondeel JMM, Van Opdrop AHB, Dinkelar RB. Application of a computer program to exclude additional unexpected antibodies. Transfusion 1997;37:298-308.
101. Daniele Prati. Benefits and complications of regular blood transfusion in patients with beta-thalassaemia major. Vox Sang 2000;79:129-37.

102. GATA Kan Bankası. Kan Transfüzyonunda Enfeksiyon Dışı Komplikasyonlar. Ankara: Kan Eğitim Merkezi; 2007:1-16.
103. Karadoğan İ, Canatan D. İmmünolojik transfüzyon reaksiyonları. Klinik Gelişim 2001;14:52-56
104. Canatan D, Karadoğan C, Oğuz N, Balta N, Coşan RÖ, Dirican H, et al. Red cell antibodies in patient with Beta-thalassemia major. Blood Banking and Transfusion Medicine 2003;1:121-122.
105. Wang LY, Liang DC, Liu HC, Chang FC, Wang CL, Chan YS, et al. Alloimmunization among patients with transfusion-dependent thalassemia in Taiwan. Transfus Med 2006;16:200-3.
106. Ameen R, Al-Shemmari S, Al-Humood S, Chowdhury RI, Al-Eyaadi O, Al-Bashir A. RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. Transfusion 2003;43:1604-1610.
107. Michail MV, Pamphili PL, Piperi LL, Pelegrinis E, Karaklis A. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual versus better-match transfusion programmes. Vox Sang 1987;52:95-98.
108. Fongsatitkul L, Bannawat U, Sanguanserm Sri T, Kulapongs P. Unexpected red cell antibodies in thalassemic children. Birth Defects Orig Artic Ser 1988;23:291-293.
109. Spanos T, Karageorga M, Ladis V, Peristeri J, Hatziliami A, Kattamis C. Red cell alloantibodies in patients with thalassemia. Vox Sang 1992;62:190.
110. Schonewille H, van de Watering LM, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures? Transfusion. 2006;46:630-635.
111. Tardtong P, Ratanasirivanich P, Chiewsilp P, Hathirat P. Red cell antibodies in thalassemia hemoglobinopathy patients. Birth Defects Orig Artic Ser 1988;23:287-289.