

40314

T.C.
Çukurova Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Adli Tıp Anabilim Dalı

**ADLİ AMAÇLARLA LEWİS, KELL, KİDD, DUFFY ve LUTHERAN
ERİTROSİT ANTİJENLERİNİN MICROTYPING (MİKRO TİPLENDİRME)
YÖNTEMLERLE FENOTİPLENDİRİLMESİ**

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. SERPİL SALAÇIN

MASTER TEZİ
Bio. AYŞE ALTUN

T.C. YÜCESEKİDARETİ
DOKÜMANTASYON BÖLÜMÜ

Adana/1995

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ayşe ALTUN'nun MASTER tezi olarak hazırladığı "Adli Amaçlarla Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran Eritrosit Antijenlerinin Microtyping (Mikro Tiplendirme) Yöntemlerle Fenotiplendirilmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

11/1/1995

Üye: Prof.Dr. Serpil SALAÇIN



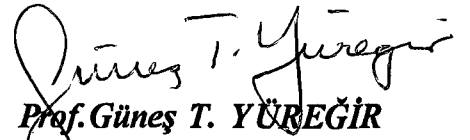
Üye: Doç.Dr. Kıymet AKSOY



Üye: Yard.Doç.Dr. Mete K. GÜLMEN



Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 18.1.1995gün ve 3/7-6 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Güneş T. YÜREĞİR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince değerli katkıları, tez konumun seçilmesinde ve oluşturulmasındaki yol göstericiliği için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanı, Sayın

Prof. Dr. Serpil SALAÇIN'e,

SBE 94.3 nolu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki maddi katkıları nedeniyle Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Bio. Ayşe ALTUN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
Lewis Kan Grup Sistemi	3
Kell Kan Grup Sistemi	8
Duffy Kan Grup Sistemi	11
Kidd Kan Grup Sistemi	12
Lutheran Kan Grup Sistemi	13
Hemagglütinasyon Yöntemleri	14
GEREÇ VE YÖNTEM	18
Deneyler	26
BULGULAR	29
TARTIŞMA ve SONUÇ	43
ÖZET	48
İNGİLİZCE ÖZET	49
KAYNAKLAR	50

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hücre membranının biyokimyasal yapısının moleküler düzeyde ortaya konmasıyla birçok antijenik özellik saptanmıştır. Kan grubu antijenleri eritrosit membranında yüzeye tutunmuş yapılardır. Bu antijenlerin klinik immunolojideki önemi nedeniyle bu konuda çalışmalar hızla artmış ve yaklaşık 600 farklı antijen tanımlanmıştır(20,36,55).

1901'den bu yana 93 yıllık bir geçmişe dayanan kan grubu antijeni araştırmalarında, antijenlerin tanımlanması başlangıçta basitçe hemagglütinasyon reaksiyonları ile gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda; moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelerin kullanımı ile, mikrokimyasal analiz teknikleri geliştirilerek antijenlerin moleküler yapısı daha güvenilir bir şekilde ortaya çıkarılabilmektedir(9,31,36).

Adli Serolojide eritrosit antijenlerinden, biyolojik sıvılar ile bunlara ait leke ve artıkların kimliklendirilmesinde ve paternite saptanmasında yararlanılmaktadır. Son yıllarda spesifik, hassas ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi ile eritrosit antijenlerinin daha ayrıntılı incelenebilmesi sağlanmıştır. Paternite saptanması ve kimliklendirmede ana kan grupları ve subgruplarının toplumda bulunma sıklığının bilinmesi gerekmektedir. Ancak ülkemiz genelinde ve yöremizde bu konuda veri tabanı oluşturabilecek bir çalışma bulunmamaktadır(9,20,75).

Adli Serolojide eritrosit antijenlerinin taze kan örneklerinde gösterilmesinde; bu antijenleri taşıyan eritrositlerin agglütinasyonu, serumda antikorların çeşitli yöntemlerle gösterilmesi prensiplerine dayanan çalışmalar, yeni teknolojilerin yöntemlere sokulmasıyla geliştirilmektedir. Özellikle zayıf antijenik özellikte olan bazı eritrosit antijenlerinin gösterilmesi oldukça güçtür. Bu nedenle daha hassas ve spesifik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Taze kanda bu antijenlerin gösterilebilmesi amacıyla microtyping gruplama sistemleri geliştirilmiştir. Microtyping gruplama yöntemlerinin hassas, spesifik, fotoğraf ve benzeri yöntemlerle görüntülenebilir olmalarının yanında; çok az miktarlardaki örneklerle zayıf antijenik subgrupların gösterilebilmesine olanak sağlaması nedeniyle Adli Serolojide tercih edilmesi gerektiği savunulmaktadır(24,30,53,75).

Bu çalışmada taze kanda Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antijenleri eritrosit agglütinasyonu prensibine dayanan Mikroplate ve Jel Test yöntemi ile fenotiplendirilerek, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Adli Tıp Anabilim Dalının kuruluş aşamasında olan Adli Seroloji laboratuvarında alışılabilirliğı araştırılacaktır. Ayrıca bu çalışmada saptanan antijen fenotipleri yöremiz için gen sıklığı çalışmalarının ön verilerini oluşturacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lewis Kan Grup Sistemi

Le^a antijeni, ilk kez 1939 yılında bazı Japon araştırmacılar tarafından non-sekretör bir bireyin tükürüğünde tanımlanmıştır. Ancak bu çalışma dil problemleri nedeniyle uzun bir süre batılı araştırmacıların gözünden kaçmıştır(14,55).

1946 yılında, hemolitik hastalık düşünülen yenidoğan bir bebeğin annesinin serumunda Mourant tarafından yeni bir antikor tanımlanmıştır. Saptanan bu antikoru o toplumdaki bireylerin yaklaşık % 25'inin eritrositlerini agglütine ettiği izlenmiştir. Bu yeni antikoru karşılığı olan antijene serumunda antikor bulunan kadının soyadı olan Lewis adı verilmiştir(14,55).

1947'de Andresen benzer karaktere sahip bir başka antikoru Anna Erikson isimli bir kadının serumunda bulmuştur. Tanımlanan antijen "L" olarak adlandırılmış ve yetişkinlerin yaklaşık % 21'inin L(+) olduğu bildirilmiştir. 1948'de Andresen, Mourant'ın anti-Lewis olarak adlandırdığı antikor ile Anna Erikson'da bulunan antikoru aynı olduğunu belirtmiştir. Mourant'ın Lewis, Andresen'in L₁ olarak adlandırdığı antijen Le^a olarak adlandırılmıştır.

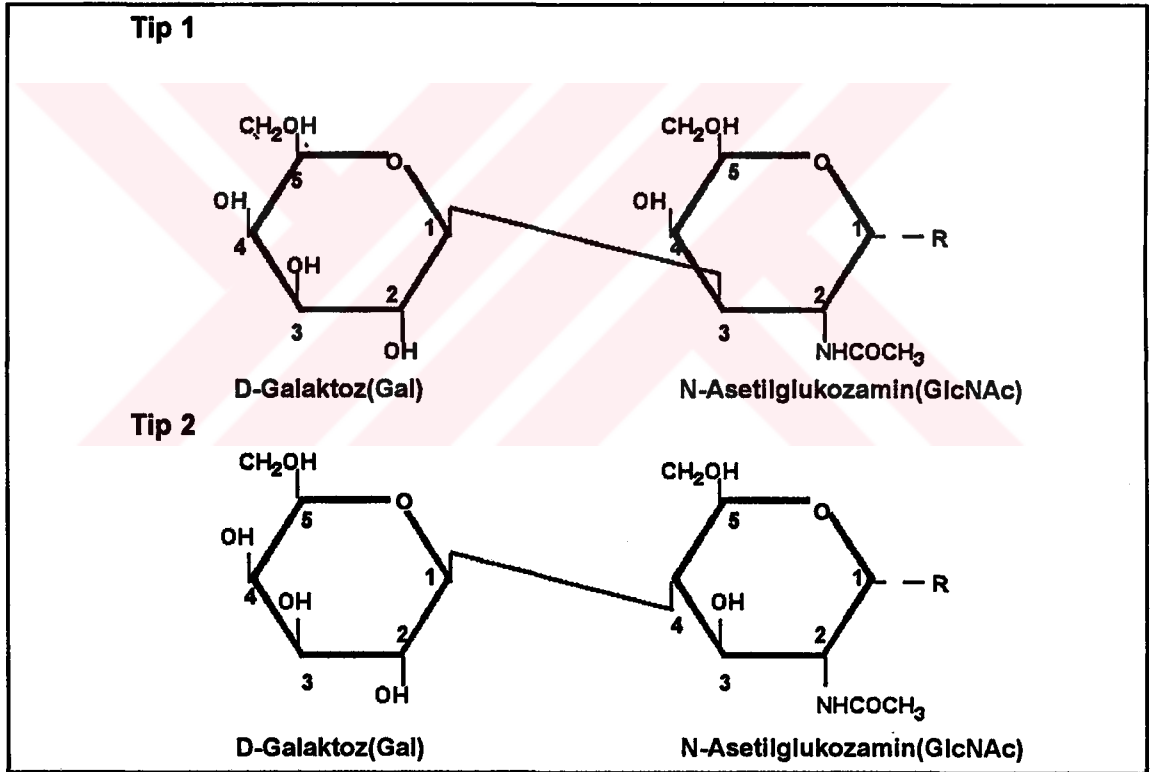
Daha sonra A ve MN antijenlerine sahip bir kişinin serumunda saptanan ve anti-L₂ olarak adlandırılan başka bir antikor gösterilmiş ve buna uyan antijen Le^b olarak adlandırılmıştır(14,55).

Lewis antijenleri ile ilgili genlerin 19. kromozom üzerinde bulunduğu ve iki alleli olduğu saptanmıştır. Dominant gen Le ve resesif gen le olarak isimlendirilmiştir(23,31).

Le^a ve Le^b antijenleri, fukoziltransferaz(alfa-4-fukoziltransferaz) enziminin sentezlediği ürünlerdir ve bu enzimin aktivitesi genetik olarak kontrol edilmektedir(14,19,31,73,74).

Lewis antijenlerinin ABH antijenlerinde olduğu gibi, dört tane primer şeker molekülü içeren öncül maddeden oluştuğu ileri sürülmektedir. Bu şeker moleküllerinden iki tanesinin D-galaktoz, diğerlerinin N-asetilgalaktozamin ile N-asetil-D-glukozamin

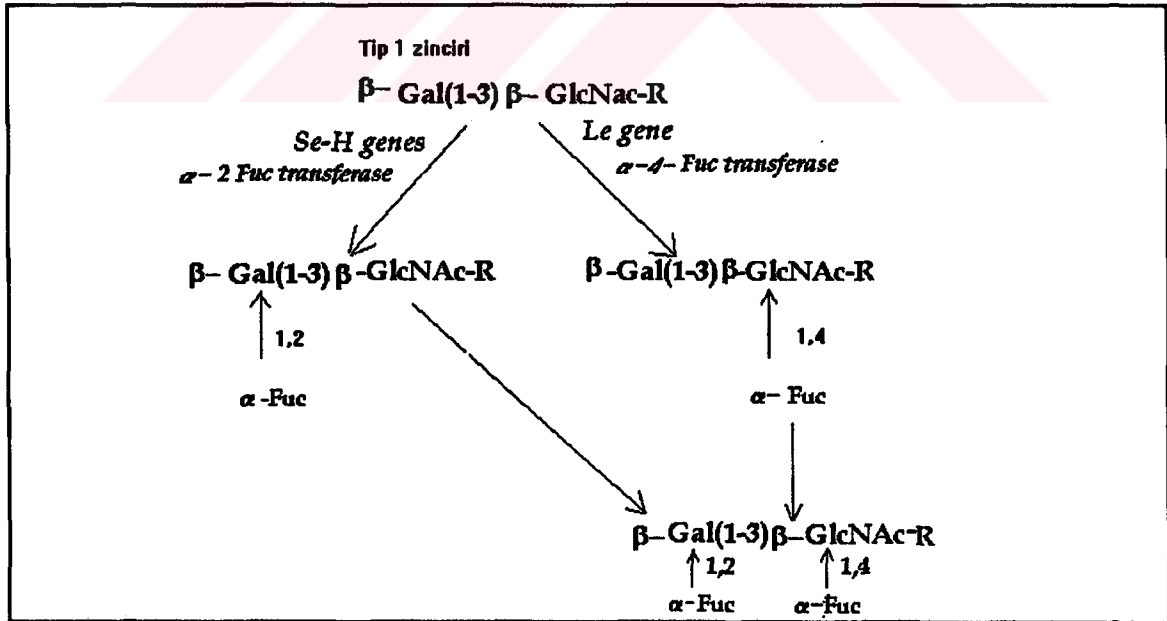
olduğu ve bunların öncül maddede D-galaktoz, N-asetilglukozamin, D-galaktoz ve N-asetilgalaktozamin şeklinde sıralandığı bildirilmektedir. Terminal galaktoz ile subterminal N-asetilglukozamin molekülü arasındaki bağlanma noktalarından birinin farklı olması nedeniyle iki tip öncül madde bulunduğu saptanmıştır. Tip 1 öncül maddenin oluşumunda, D-galaktoz'un subterminal N-asetilglukozamine $\alpha(1\rightarrow3)$ bağıyla bağlandığı; tip 2 öncül maddenin oluşumunda ise, aynı şeker molekülünün $\alpha(1\rightarrow4)$ bağıyla bağlandığı bildirilmektedir(60,64,71,72). Bu öncül maddeler Şekil 1'de gösterilmiştir.



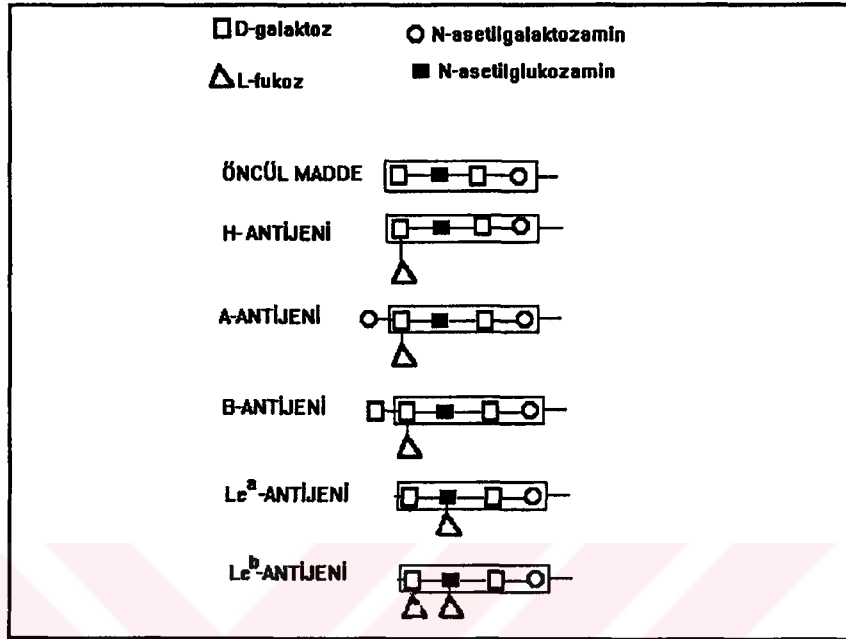
Şekil 1. Tip 1 ve Tip 2 öncül maddeler(64).

Suda eriyebilir ABH antijenleri ve Lewis antijenlerinin tip 1 öncül maddeden sentezlendiği gösterilmiştir. Le^a antijeninin, Lewis genlerinin ürünü alfa-4-L-fukoziltransferaz enzimi etkisiyle tip 1 zincirde subterminal N-asetilglukozaminin 4 no'lu karbonuna bir fukoz molekülünün $\alpha(1\rightarrow4)$ bağıyla bağlanması sonucu oluştuğu bildirilmektedir(14,19,31,50,72,74).

Le^b antijeninin oluşumunun iki basamakta gerçekleştiği bildirilmektedir. İlk basamakta; Sekretör gen ile H ve h allel genlerinin ürünü olan H transferaz (α -2-L-fukoziltransferaz) etkisi ile, Tip 1 öncül maddenin terminal galaktozuna bir fukozun bağlandığı ileri sürülmektedir. İkinci basamakta; aktivitesi Le geni tarafından düzenlenen α -4-L-fukoziltransferaz enziminin, ilk basamak ürününün subterminal N-asetilglukozaminine bir fukoz daha ilave etmesiyle Le^b antijeninin oluştuğu bildirilmektedir(14,19,31,50,72,74). Şekil 2'de antijen oluşumunun izledikleri biyokimyasal yol, Şekil 3'te bu antijenlerin yapıları şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2. Lewis antijenlerinin biyokimyasal yolu(31).



Şekil 3. A,B,H ve Lewis antijenlerinin terminal karbonhidrat zincirlerinin yapıları(59).

Lewis antijenlerinin eritrositlerde sentezlenmediği, sirkülasyon sırasında plazmadan absorblandığı bildirilmektedir. Lewis antijenleri eritrosit ve plazmanın yanı sıra tükürük salgısı, seminal ve vaginal sıvı, ovarial kist sıvısı gibi vücut sıvıları ve sekresyonları ile gastrik mukoza gibi vücut dokularında da gösterilmiştir(27-29,31,49,54,55,71,72,77).

Plazmada bulunan Lewis antijenlerinin glikosfingolipid yapıda olduğu, yüksek ve düşük dansiteli lipoproteinler ile taşındığı gösterilmiştir(14,21,72,77).

Vücut sıvıları ve dokularında, suda eriyebilir ABH ve Lewis antijenlerinin varlığının, Sekretör genlerin etkisiyle belirlendiği ileri sürülmektedir. Dominant Sekretör genlerin (Se/-) varlığında, bu antijenlerin vücut sıvı ve sekresyonları ile vücut dokularında bulunduğu; resesif sekretör genlerin (se/se) varlığında ise bu antijenlerin bulunmadığı bildirilmektedir(14,55,72).

Le geni beyazlarda % 95 oranında bulunmaktadır. le geni, beyazlarda % 5, siyahlarda ise % 22 oranında bulunmaktadır. Beyazlarda Le^a antijenine rastlanma sıklığı % 20, Le^b antijenine %75'tir. Oldukça nadir olarak bulunan Le(a-b-) ise % 5 oranında bulunmaktadır(31).

Lewis antijenlerinin hayatın ilk birkaç ayı içinde gelişmeye başladığı belirtilmektedir. Le^a ve Le^b'nin doğumda; tükürük ve serumda var olduğu, ancak eritrositlerde bulunmadığı bildirilmektedir. Eritrositlerde antijenlerin doğumdan sonra gösterildiği ve 3 aylık çocukların % 80'inden fazlasında Le(a+)'nın kuvvetli reaksiyon verdiği; yaklaşık 2 yaş civarında azalmaya başlayıp yetişkinlerde reaksiyon kuvvetinin % 20'ye kadar azaldığı ileri sürülmektedir. Diğer taraftan Le(b+)'nın, gençlerde yetişkinlerden daha az reaksiyon verdiği belirtilmektedir(14,55).

1955'te Sneath ve Sneath, Le(a-b+) fenotipli bir bireye Le(a+b+) hücreli kan transfüzyonu yapıldıktan sonra bireyin fenotipini Le(a+b+) olarak saptamışlardır. Böylece, transfüzyonla bir bireye Le^a antijeninin kazandırılabilceği saptanmıştır. Bu antijenlerin in vitro olarak da değişebilme özelliği gösterdikleri bildirilmiştir. Nakajima ve arkadaşları (1968), yetişkin ve yeni doğan eritrositlerinde Lewis antijenlerinin değişebilme özelliği açısından bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Buna karşılık aynı bireyde tükürükteki Lewis antijenlerinin değişmediği gösterilmiştir(14,55).

Tüm bu nedenlerle Adli Serolojide eritrosit antijenlerinin gösterilmesine dayanan çalışmalarda; Lewis antijenlerinin kullanımının sınırlı değeri olduğu, Lewis antijenlerinin vücut sıvılarında değişmemesi nedeniyle, antijenin vücut sıvılarında gösterilmesinin anlamlı olacağı düşünülmektedir.

Lewis antijenleri kurumuş kan lekeleri ve çeşitli sekresyon lekelerinde ABO sekretör durumunu göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Seksüel saldırı iddialarında, Le(a-b-) kadınların vaginal sıvısında sekretör veya non-sekretör semenin tanımlanması mümkün olabilmektedir. Lewis antijenlerinin çok az miktarlarda bulunması, kurumuş lekelerde gösterilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak bir yıllık kan lekelerinde, absorbsiyon-

elüsyon tekniği ile Le^a ve Le^b antijenlerinin gösterilebildiğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır(4,14,55,62,63,65,66).

Lewis sisteminin ayırt edilen diğer iki antijeni Le^e ve Le^d'nin orijini bilinmemektedir. Le^e antijeni, nonsekretör (se/se) lewis negatif (le/le) bireylerin eritrositlerinde; Le^d antijeni, sekretör (Se/-) lewis negatif (le/le) bireylerin eritrositlerinde gösterilmiştir. Bu kimyasal yapıların serolojik özellikleri henüz tartışmalıdır(14,49).

Lewis antikorlarının büyük bir kısmının doğal olarak oluştuğu ve genellikle IgM yapısında olduğu bildirilmektedir(31,55).

2.2.Kell Kan Grup Sistemi

1946 yılında, Coombs ve arkadaşları Rh uyumsuzluğu nedeniyle hemolitik hastalık saptadıkları 15 yenidoğan bebekte yaptıkları bir çalışmada, bilinen sistemlere ait olmayan bir antikoru annelerden birinin serumunda göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada bu antikoru rastgele seçilen bireylere ait kanların % 7'si ile reaksiyona girdiğini saptamışlardır. Antikora bu annenin soyadından esinlenerek anti-Kell adı verilmiştir(14,31,55).

1947'de, Wiener ve Sonn Gordon bilinen antikorları esas alarak yaptıkları çalışmada, Singer adında bir kadında saptadıkları hemolitik transfüzyon reaksiyonunda ayırdettikleri antikoru anti-Si olarak adlandırmışlardır(14,55).

Yapılan çalışmalarda anti-Si ile anti-Kell'in aynı olduğu saptanmış ve bu nedenle antijen Kell olarak adlandırılmıştır. Bu ad Wiener ve arkadaşları tarafından "K" olarak kısaltılmıştır(14,55).

1949'da Levine ve arkadaşları hemolitik hastalığı olan yenidoğan bir bebeğin annesinde yeni bir antikoru varlığını bildirmişlerdir. 37°C'de tuzlu suda reaksiyon veren ve o toplumdaki bireylerin çoğunluğunun eritrositlerini agglütine eden bu antikor anti-Cellano olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları Anti-K ve anti-Cellano ile yapılan aile çalışmalarında, Kell ile Cellano'yu tanımlayan allellerin birbirine yakın olduğu ileri

sürülerek, Cellano "k" olarak adlandırılmıştır(14,55).

Kell fenotiplerinin iki bağımsız gen etkileşimi sonucunda oluştuğu, bunlardan birinin otozomal, diğerinin X'e bağlı bir gen olduğu bildirilmektedir. Otozomal yapıdaki Kell geninin 7. kromozomun uzun kolu üzerinde bulunduğu, X'e bağlı genin X kromozomunun kısa kolu üzerinde yer aldığı bildirilmektedir(32,33,36,37,39).

Kell antijenlerinin tamamının 93 kDa'luk eritrosit hücre membranı glikoproteinlerinde bulunduğu bildirilmektedir. X'e bağlı genin kodladığı antijenin eksikliğinin de McLeod sendromundan sorumlu olduğu ileri sürülmektedir(32,33,35-37,78,79).

Kell antijenlerinin kimyasal yapısı hakkında sınırlı bilgiler bulunmaktadır. Kell antijenlerinin glikoprotein yapısında olduğu, eritrositlerin 56°C'de birkaç dakika ısıtılması, formaldehit solusyonunda enkübasyonu veya sülfidril bileşikleriyle indirgenmesiyle proteinlerin büyük bir kısmının denatüre olduğu ve Kell kan grubu antijenlerinin de büyük ölçüde inaktif hale geçtiği bildirilmektedir. Kell antijenlerinin, eritrosit membranına disülfid bağları ile tutunduğu saptanmıştır(1,33,36,38,56,57,58).

Marsh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda Kell antijenlerinin varlığının eritroid dokuyla sınırlı kaldığı saptanmıştır(32).

Kell antijenlerinin gelişiminin fetal hayatın yaklaşık 10. haftasından itibaren başladığı ve doğumda tamamiyle gelişmiş olduğu belirtilmektedir. Yetişkinlerde antijenlerin, eritrosit gelişiminin eritroblast evresinde meydana geldiği gösterilmiştir(14,33,36,37).

K(K1) antijeninin, beyazlarda rastlanma sıklığı % 90 , k(K2) antijeninin ise % 99.8 olduğu bulunmuştur. k(K2) antijeni ise siyahların hemen hepsinde bulunmuştur. Kell grubunun nadir antijenlerinden olan Jsⁿ'nin siyahlarda, Kpⁿ'nin ise beyazlarda daha yaygın olarak bulunduğu saptanmıştır(31).

Günümüze kadar 24 Kell antijeni tanımlanmıştır(36,37). Bu antijenlerin adları ve simgeleri Tablo I'de gösterilmiştir.

TABLO I. Kell kan grubu sisteminde, antijenlerin adları ve ve simgeleri(36).

<i>ADI</i>	<i>HARFİ</i>	<i>NUMARASI</i>
Kell	K	K1
Cellano	k	K2
Penny	Kp ^a	K3
Rautenberg	Kp ^b	K4
Peltz(Ko)	Ku	K5
Sutter	Js ^a	K6
Mathews	Js ^b	K7
	Kw	K8
Claas	KL	K9
Karhula	UI ^a	K10
Côté		K11
Bockman		K12
Sgro		K13
Santini		K14
	Kx	K15
	k-like	K16
Weeks	Wk ^a	K17
Marshall		K18
Sublett		K19
	Km	K20
Levay	Kp ^c	K21
Ikar		K22
		K23
Clis		K24

Eritrositlerde Kell antijenlerinin yokluğu Kell Null (Ko), zayıf Kell fenotipleri K_{mod} olarak adlandırılmaktadır(13,14,36,37,79).

Kell sistemi antijenleri iyi bir immunojenik potansiyele sahiptir. Ancak diğer majör kan grubu sistemlerine oranla daha az sayıda antijen bölgesine sahiptir. K1 yaklaşık 3500,

K2 2000-5000 antijen bölgesine sahiptir(36,37,56).

K antijeninin, 27-34 günlük kan lekelerinde absorbsiyon-elüsyon tekniğiyle gösterilebildiği bildirilmektedir. Mikroelüsyon yöntemi ile dört yıllık bir kan lekesinde K antijeninin gösterilebildiği de bildirilmiştir. K2 (k) antijeninin ise 9.5 aylık kan lekelerinde gösterilebildiği bildirilmektedir(14,15).

Genellikle doğal olarak oluşan Kell antikorları bazı durumlarda antijenik uyarıyla kişinin serumunda immun olarak gelişebilmektedir. Bu antikorlar genellikle IgG yapısındadır(2,12,14,31,35,36,73).

2.3. Duffy Kan Grup Sistemi

1950'li yılların başlarında, 20 yıl boyunca defalarca kan transfüzyonu yapılmış olan Duffy soyadlı bir kişinin serumunda yeni bir antikor bulunmuştur. Cutbush, Mollison ve Parkin tarafından gösterilen bu antikor, bu kişinin soyadından esinlenerek anti-Fy^a olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, bu antikora karşılık gelen antijen Fy^a olarak adlandırılmıştır(14,31,55).

Duffy antijenleri ile ilgili genlerin 1. kromozomda bulunduğu saptanmıştır(31).

Fy^a antijeninin eritrosit membran proteinlerinden sialoglikoprotein molekülü üzerinde bulunduğu ve eritrosit hücre membranının yapısına katıldığı bildirilmektedir. Duffy antijenlerinin eritrositlerdeki antijenik uç sayısının ortalama 17.000 kadar olduğu bildirilmektedir(40,43,48).

Duffy sistemi antijenlerinin 6-7 haftalık fetüste bulunabildiği, doğumda antijenik gelişimin tamamlanmış olduğu bildirilmektedir(14,55).

Fy^a ve Fy^b antijenlerinin az miktardaki kan lekelerinde dahi gösterilebildiği bildirilmektedir. Denault ve arkadaşları, Anti-human globulin kullanarak yaptıkları absorbsiyon-elüsyon yöntemi ile 1-2 haftalık kan lekesinde Fy^a antijenini gösterebilmişlerdir. Diğer taraftan, mikroelüsyon yöntemi ile dört yıllık bir kan lekesinde Fy^a antijeninin gösterilebildiği bildirilmektedir(14,15).

Bu antijen sisteminde Fy^a ve Fy^b antijenleri dışında $Fy3$ ve $Fy5$ antijenleri de bulunduğu, bu iki antijenin Fy^a ve Fy^b taşıyan bütün eritrositlerde bulunduğu gösterilmiştir(14,55).

Duffy antijenlerinden Fy^a ($Fy1$) ve Fy^b ($Fy2$)'nin beyazlarda, buna karşın Fy^x ($Fy4$)'ün siyahlarda daha yaygın olarak bulunduğu saptanmıştır. Beyazlarda Fy^a 'ya rastlanma sıklığının % 29, Fy^b 'ye rastlanma sıklığının % 42 olduğu saptanmıştır(31).

Duffy sistemi antikorlarının genellikle doğal olarak oluştuğu ve IgG yapısında olduğu saptanmıştır. Bu antikorlar komplemanı bağlayabilme özelliğindedir(2,14,31).

2.4. Kidd Kan Grup Sistemi

İlk olarak 1951 yılında Allen, Diamond ve Niedziela tarafından hemolitik hastalığı olan yenidoğan bir bebeğin annesinin serumunda yeni bir antikor ayırd edilmiştir. Kidd soyadlı annenin serumunda bulunan bu antikorun karşılığı olan antijen Jk^a olarak adlandırılmıştır(14,43,55).

Kidd antijenleri ile ilgili genlerin 18. kromozomda bulunduğu saptanmıştır(16,31).

Kimyasal yapıları hakkında fazla bir bilgi bulunmayan Kidd antijenlerinin eritrosit yüzeyindeki antijenik uç sayısının ortalama 14.000 olduğu bildirilmektedir(40).

Jk^a ($JK1$) ve Jk^b ($JK2$) olmak üzere iki yaygın antijeni bulunan Kidd kan grubu sisteminin $Jk3$ olarak adlandırılan ve Jk^a veya Jk^b fenotipine sahip bireylerin eritrositlerinde bulunan üçüncü bir antijen ayırd edilmiştir. Eritrositlerde Kidd antijenlerinin yokluğu Kidd null olarak adlandırılmaktadır(13,14,26,47,55).

Kidd antijenlerinin gelişiminin fetüste başladığı, Jk^a antijeninin fetal hayatın 11. haftasından itibaren, Jk^b antijeninin fetal hayatın 7. haftasından itibaren gelişmeye başladığı, yeni doğanda tamamiyle gelişmiş olduğu bildirilmektedir(14,55).

Kidd antijenlerinin kan lekelerinde gösterilmesine dayanan fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, Jk^a antijeninin bir haftalık kan lekelerinde gösterilebildiği bildirilmektedir(14,15).

Beyazlarda Jk^aya rastlanma sıklığının yaklaşık % 76, Jk^bye rastlanma sıklığının da % 74 olduğu bulunmuştur. Bu oran Asyalılar için yaklaşık % 50 olarak saptanmıştır(31).

Kidd antikorlarının IgG veya IgM yapısında olabildiği ve genellikle doğal olarak bulundukları saptanmıştır. Bu antikorlar komplemanı bağlayabilme özelliğindedir. Bu antikorların oda sıcaklığında aktivite gösterebildikleri, ancak en iyi aktivite gösterdikleri ısının 37°C olduğu bildirilmektedir(14,31,55).

2.5. Lutheran Kan Grup Sistemi

1945'te birçok kez transfüzyon yapılmış Diffüz Lupus Eritematosus'lu bir hastanın kanında gösterilen yeni bir antikora, transfüzyon için kan veren kişi olan Lutheran'ın adı verilmiştir(14,31,55).

Lutheran antijenleri ile ilgili genlerin 9.kromozomda bulunduğu saptanmıştır(31).

Lutheran antijenlerinin kimyasal yapısı hakkında henüz güvenilir bilgilerin elde edilemediği belirtilmektedir. Lu^b antijenlerinin 80 kDa'luk eritrosit membranı glikoproteinlerinde bulunduğu belirtilmektedir. Lutheran antijenlerinin bölge sayılarının dominant kalıtım gösteren Lu(a-b-) fenotipli bireylerin eritrositlerinde ortalama 450, Lu(a-b+) ve Lu(a+b+) fenotipli bireylerin eritrositlerinde ortalama 1.000 ve Lu(a+b-) fenotipli bireylerin eritrositlerinde ise ortalama 480 olduğu bildirilmektedir(40,41,51, 67,68,69).

Kaynaklarda Lutheran antijenlerinin lekelerde gösterilmesiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Lutheran antijenlerinin gelişiminin fetuste başladığı, Lu^a antijeninin en erken olarak 12 haftalık fetus kanında gösterilebildiği bildirilmektedir. Doğumda tamamiyle gelişmemiş olan heterozigot Lu^a antijeninin 15 yaşına kadar gelişimini devam ettirdiği; Lu^b antijeninin ise, fetal hayatın 10-12. haftasında nadir olarak görülmeye başladığı, gençlerde yetişkinlerden daha zayıf antijenik aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Bu özellikleri

nedeniyle Lutheran antijenlerinin paternite çalışmalarında kullanılması anlamlı bulunmamaktadır(14,55).

Lu^a antijeninin toplumda rastlanma sıklığının % 4, Lu^b antijeninin ise % 96 olduğu bildirilmektedir. Lu(a-b-) fenotipinin ise nadir olduğu belirtilmektedir(31)

Yapılan çalışmalarda, Lutheran antijen sistemine dahil edilen antijen sayısının 20'ye kadar ulaştığı, ancak bunlardan bir kısmının yayınlanmadığı bildirilmektedir(55).

Lu(a-b-) fenotipi Lutheran null olarak adlandırılmaktadır. İki tipi tanımlanmıştır. Bunlardan birisi, otozomal resesif olarak oluşmaktadır. Bu eritrositlerde, Lu^a ve Lu^b antijeni bulunmamaktadır. Diğer Lu(a-b-) fenotipi otozomal dominant olarak In(Lu) geni tarafından kontrol edilmektedir. Bu fenotipe sahip eritrositlerde zayıf Lu^a ve Lu^b antijenleri bulunmaktadır(14,46,55).

Oldukça zayıf immunojeniteye sahip olan Lutheran antikorları doğal olarak kazanılmaktadır. IgG veya IgM yapısında olabilmektedir. Anti-Lu^a'nın optimum 12-18°C'de, anti-Lu^b'nin 20°C'de tuz aglütinasyon testiyle iyi reaksiyon verdiği belirtilmektedir(14,31,55).

2.6. Hemagglütinasyon Yöntemleri

Eritrosit antijenlerinin spesifik antikorları ile karşılaşmaları sonucunda, hemagglütinasyon reaksiyonları meydana gelmektedir. Antijen ile ilgili antikorun bu özelliğinden faydalanılıp, in vitro olarak gerçekleştirilebilen hemagglütinasyon reaksiyonları ile aranan antijen veya antikoru gösterebilmek mümkün olmaktadır. Agglütinasyon reaksiyonları tüp, lam v.b. ortamlarda gerçekleştirilirken, son yıllarda bu temel reaksiyonun gerçekleştirilebileceği ortamlar tekniğe hassasiyet ve güvenilirlik kazandırmak amacıyla geliştirilmiştir. Yenilerde geliştirilen bu yöntemler microtyping yöntem olarak isimlendirilmekte ve agglütinasyonlar mikropate yada özel jelli mikrotüplerde gerçekleştirilmektedir(7,8,20,22,24,30,34,52,59).

Az miktardaki materyalle çalışılabilmesi amacıyla geliştirilen mikropate

yönteminin, diğer klasik yöntemlere göre teknik hataların daha az olduğu, zaman ve kullanılan malzemede ekonomi sağladığı, ayrıca reaksiyonların fotoğrafla görüntülenebilir özellikte olduğu bildirilmektedir(7,20,53,60,61,75,76).

İlk kez 1962 yılında Sever tarafından tanısal virolojide kullanılmak üzere geliştirilen mikroplate yönteminin kan grubu serolojisinde kullanımı, 1966 ve 1968 yılları arasında Wegmann ve Smithies tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunu takip eden yıllarda yöntemin zaman ve kullanılan malzeme yönünden ekonomik olması, teknik hataların az olması gibi nedenlerle kullanımı giderek artmıştır. Daha sonraki yıllarda agglütinasyonlar spektroskopik okuma ile değerlendirilmiştir. Ardından bilgisayar sistemlerinin biyoteknolojiye katılımı ile yöntemin otomasyonu sağlanarak, okuma kolaylığı ile birlikte insan emek gücü azaltılmıştır(20,60,61,75,76).

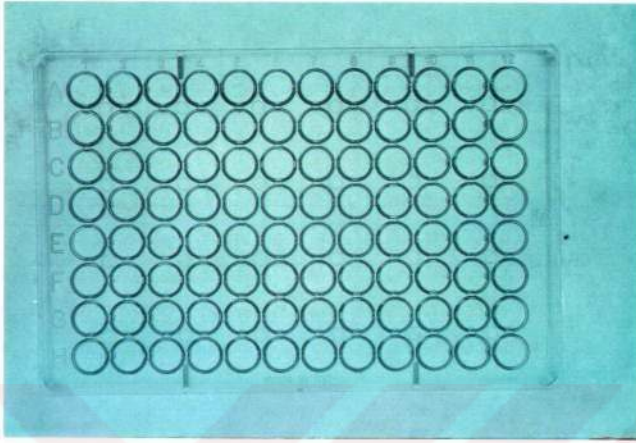
Mikroplate yönteminde kullanılan plateler yaklaşık 7.5cm.x10.5cm. boyutlarındadır. Polistiren, polibren veya polivinil'den yapılmış olan plate üzerinde 8 sıra ve 12 kolondan oluşan kuyucuklar bulunmaktadır. Kuyucuklar yaklaşık 10mm. yükseklikte ve 4mm. çapındadır. Kuyucukların dişi U, V veya düz olarak üretilmektedir. Plate üzerinde her bir sırada A'dan H'ye kadar harfler, her bir kolon üzerinde 1'den 12'ye kadar sayılar bulunmaktadır. Üzerinde toplam 96 adet kuyucuk bulunan platede aynı anda 96 ayrı reaksiyon oluşturulabilmektedir. Şekil 4'de U-dipli bir mikroplate gösterilmiştir(5,20,42,53,70).

Mikroplate yönteminde eritrositlerin %0.9'luk NaCl, enzim veya LISS (Low Ionic Strength Solution) ile hazırlanan %1-3'lük süspansiyonları kullanılmaktadır(20,44,45,70).

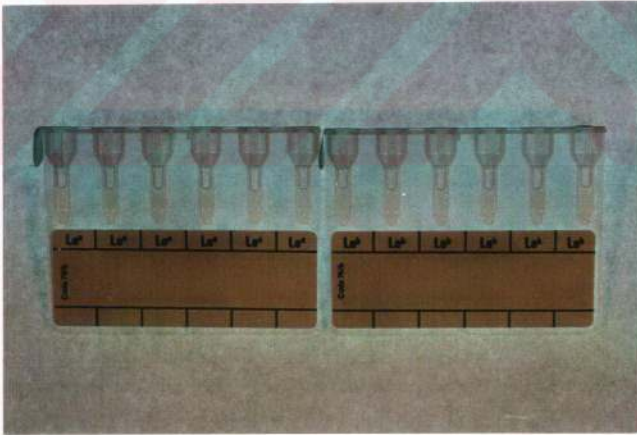
Kan grubu antijenlerinin tanımlanmasında henüz oldukça yeni sayılan bir diğer yöntem Jel Test yöntemidir. Jel test ilk kez Y. Lapiere tarafından geliştirilerek, 1986 yılında patenti alınmıştır. Yöntemin agglütinasyon reaksiyonlarını standartlaştırdığı, hassas, güvenilir ve kolay bir okumaya olanak tanıdığı, bunların yanısıra reaksiyonun fikse edilmesi, fotoğraf ve hatta fotokopi ile görüntülenebilmesi gibi özellikleri olduğu bildirilmektedir. Bu yöntemde, plastik kartlara altışarlı yerleştirilmiş özel mikrotüpler

kullanılmaktadır. Yapılacak testin türüne göre, nötral, spesifik veya antiglobulinli olmak üzere üç tip jel hazırlanmıştır. Nötral jel içeren mikrotüplerde herhangi bir spesifik ayıraç bulunmamaktadır. Bu tür jeller genellikle antikor arama, enzim muamele edilmiş veya edilmemiş hücrelerin identifikasyonu ve ABO reverse tiplendirme amacıyla kullanılmaktadır. Spesifik jelli mikrotüplerde, jel karışımı içerisinde spesifik ayıraç (anti-A,-B gibi) bulunmakta ve antijen arama amacıyla kullanılmaktadır. Antiglobulinli jellere eritrosit süspansiyonu ve spesifik antiserum eklendikten sonra kartlar 37°C'de enkübe edilmekte, daha sonra santrifüj edilmektedir. Şekil 5'te bir ID-Kart örneği gösterilmiştir(10,25,30).

Bu çalışmada Mikroplate ve Jel test yöntemi ile Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antijenleri fenotiplendirilerek; her iki yöntemin Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalının kuruluş aşamasında olan Adli Seroloji Laboratuvarında kullanılabilirliği araştırılmıştır.



Şekil 4. U-dipli bir mikroplate.



Şekil 5. ID-kart.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmanın hazırlanan projesi ve gönüllü kan vericileri için hazırlanan rıza ve bilgilendirme formları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kuruluna sunularak görüş alındı. Form l'de Rıza ve Bilgilendirme Formu gösterilmektedir. Etik açıdan uygun görüş alındıktan sonra proje Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonuna sunularak parasal destek sağlandı(SBE 94/3).

Form 1. Vericileri bilgilendirme ve rıza formu.

BİLGİLENDİRME FORMU

Bu çalışmanın amacı; kan gruplarına rastlanma sıklığını ortaya koymaktır.

Gönüllü olarak katılacak kişilerden 10 cc venöz kan alınarak, taze kanda kan grupları belirlenecektir. Bu çalışmada elde edilecek bilgiler ile, toplumdaki ana kan grupları sıklığı saptanacaktır. Elde edilen sonuçlar, Adli Tıp Anabilim Dalınca yapılacak çalışmalarda "Kişilerin adı, soyadı veya onları tanıttıcı herhangi bir işaret belirtilmeden" veri olarak kullanılabilir. Kan grup sonuçları çalışmaya katılan kişilere istedikleri takdirde kendilerine yazılı kağıt verilerek bildirilecektir.

Kan alma işlemi öncesi, bu çalışmaya gönüllü olarak katılmak istediğinize dair bir evrak imzalamanız gerekmektedir.

RIZA FORMU

Aşağıda imzası bulunan ben, kan gruplarına rastlanma sıklığının saptanması çalışması hakkında tam olarak bilgi aldım.

Gönüllü olarak kol damarımdan vereceğim 10 cc kanda yapılacak kan grupları sonuçlarının; adım, soyadım veya beni tanıttacak herhangi bir işaret belirtilmeden yayınlanabileceği ve istediğim takdirde kendim ile ilgili sonuçları öğrenebileceğim bildirildi.

Bu bilgileri aldıktan sonra, bu çalışmaya gönüllü olarak katıldığımı beyan ederim.

Gönüllünün Adı ve Soyadı:
Yaşı:

Tarih:
İmza:

Bilgi için:
Ç.Ü.T.F.Adli Tıp Anabilim Dalı
Tlf: 338 6060/3429

Çalışılan kan örnekleri: Bu çalışmada 70'i gönüllü verici, 4'ü Adli Tıp Anabilim Dalına babalık tayini için gelen kişilerden olmak üzere 74 kişiden alınan taze kan örneği kullanılmıştır. Gönüllü vericilerden steril plastik enjektörlerle 3'er cc venöz kan örneği alınarak, 5 cc'lik steril, plastik kapaklı EDTA (Etilendiamintetraasetikası)'lı cam tüplere konuldu ve her kan örneğine bir protokol numarası verildi.

Kullanılan antiserumlar:

A-) Mikroplate yönteminde;

Anti-Le ^a	(Ortho Diagnostic, 5 ml., MLA112A)
Anti-Le ^b	(Ortho Diagnostic, 5 ml., MLB212A)
Anti-K	(Ortho Diagnostic, 5 ml., KS135D)
Anti-k	(Ortho Diagnostic, 3 ml., LK147B)
Anti-Jk ^a	(Ortho Diagnostic, 3 ml., JAB205A)
Anti-Jk ^b	(Ortho Diagnostic, 3 ml., JBB311A)
Anti-Fy ^a	(Ortho Diagnostic, 3 ml., FA182A)
Anti-Fy ^b	(Ortho Diagnostic, 3 ml., FYB30A)
Anti-Lu ^a	(Diamed, 1 ml., 15124AO)
Anti-Lu ^b	(Diamed, 1 ml., 52022A)

B-) Jel test yönteminde; Fy^a ve Fy^b antijenlerinin gösterilmesinde ID-kartlara spesifik antiserumlar sonradan ilave edilmektedir. Bu amaçla kullanılan antiserumlar;

Anti-Fy ^a	(Diamed, 007270)
Anti-Fy ^b	(Diamed, 007280)

Kullanılan Jel Test ID-Kartları:

ID-Anti-Le^a (Diamed, 007221)
ID-Anti-Le^b (Diamed, 007231)
ID-Anti-K (Diamed, 002114)
ID-Anti-Fy^a (Diamed, 007270)
ID-Anti-Fy^b (Diamed, 007280)
ID-Anti-Jk^a (Diamed, 007321)
ID-Anti-Jk^b (Diamed, 007331)
ID-Anti-Lu^a (Diamed, 007351)
ID-Anti-Lu^b (Diamed, 007361)

Kullanılan bovin albumin: %30'luk, 10ml'lik hazır sıvı albumin kullanıldı.
(Immucor, 0T2G5235-1)

Kullanılan anti-human globulin: C3d spesifik anti-human globulin kullanıldı.
(Dominion Biologicals, 10 ml., NAHGO1202)

Deneyler için kullanılan araç ve gereçler:

Mikroplate: Polistyrenden yapılmış U dipli, üzerinde 96 adet kuyu bulunan mikroplate kullanıldı.

Plate örtücüsü: Sert plastikten yapılmış plate örtücüleri kullanıldı.

Tüpler: 1.1 cm. x 10 cm. boyutlarında, plastik kapaklı, steril cam tüpler kullanıldı.

Santrifüj: Maksimum 5500 devir/dakika hıza ulaşabilen, zaman ve hız ayar göstergesi ile

mikroplate santrifügasyonuna uygun rotor başlığı bulunan santrifüj kullanıldı.
(Hettich Universal 30 F) (Şekil 6)

Mikropipet: Mikroplate yönteminde 20 ve 200 µl kapasiteli, ayarlanabilir özellikte mikropipetler (Gilson P20 ve P200), Jel Test yönteminde ise 10,25 ve 50 µl 'ye ayarlanabilen ID-mikropipet (ID-Pipetor FP-1, 009630) kullanıldı.

Pipet uçları: Mikroplate yönteminde maksimum 200 µl hacimde sarı pipet uçları, Jel Test yönteminde 300 µl hacim kapasitesinde şeffaf beyaz pipet uçları kullanıldı.

ID-Santrifüj: Hızı 1175 rpm ve süresi 10 dakikaya ayarlı, maksimum 12 kart santrifüj edilebilen santrifüj kullanıldı (ID-Centrifuge 12 MTC, 009500)(Şekil 7).

ID-Enkübatör: 37°C'ye ayarlı enkübatör kullanıldı.(ID-Incubator 37 LM) (Şekil 8)

Eritrosit süpansiyonu hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar:

Serum fizyolojik: % 0.9'luk NaCl içeren serum fizyolojik kullanıldı.

ID-Diluent I: Jel test yöntemi için modifiye bromelin solusyonu kullanıldı.
(ID-Diluent I, 009154)

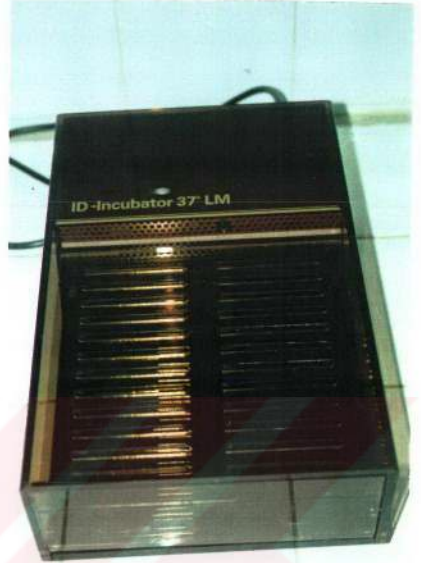
ID-Diluent II: Jel test için modifiye LISS kullanıldı.
(ID-Diluent II, 009254)



Şekil 6. Tüp ve mikroplate taşımaya uygun rotor başlığı olan santrifüj.



Şekil 7. ID-Santrifüj.



Şekil 8. ID-Enkübatör.

Kullanılan eritrosit süspansiyonunun hazırlanması:

Eritrositlerin yıkanması

3 cc'lik steril EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Serumu ayrılan hücreler üzerine 3 cc % 0.9'luk NaCl çözeltisi eklenerek tüpler hafifçe aşağı yukarı çevrilerek karıştırıldı ve 3000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı(8).

Mikroplate yöntemi için; % 3'lük eritrosit süspansiyonu hazırlamak amacıyla, temiz bir tüpe 1000 µl % 0.9'luk NaCl çözeltisi konuldu. Üzerine yıkanmış eritrositlerin bulunduğu tüpten 30 µl eritrosit pelleti ilave edilerek tüp hafifçe çalkalandı(8,71).

Jel test yönteminde; Lewis, Kell, Kidd ve Lutheran antijenleri için bir tüpe 500 µl

ID-Diluent I (Bromelin solusyonu) konuldu. Üzerine yıkanmış eritrosit hücrelerinden 25 µl ilave edildi ve hafifçe çalkalanarak % 5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon 10 dakika oda ısısında enkübe edildi. Duffy antijenleri için bir tüpe 1000 µl ID-Diluent II (LISS) konuldu. Üzerine 10 µl yıkanmış eritrosit pelleti eklenerek %1'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı(11,24,30).

Kullanılan bovin serum albuminin (BSA) hazırlanması: Bir tüpe 1350 µl SF konuldu ve üzerine % 30'luk bovin serum albuminden 150 µl ilave edilerek %3'lük bovin serum albumin hazırlandı(8).

Kullanılan antiserumların sulandırılması

Mikroplate yönteminde kullanılan tüp antiserumları (anti-Le^a, anti-Le^b, anti-K, anti-k, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-Lu^a ve anti-Lu^b) % 0.9'luk NaCl çözeltisi (SF) ve Bovin Serum Albumin (BSA) ile 1/2, 1/4 ve 1/8 oranlarında sulandırıldı(8).

Mikroplate'te işaretlenmiş kuyucuklara sırasıyla tam antiserum, 20 µl antiserum + 20 µl SF, 10 µl antiserum + 30 µl SF, 5 µl antiserum +35 µl SF damlatılarak sulandırma yapıldı.

1/1: 40 µl antiserum

1/2 : 20 µl antiserum + 20 µl SF

1/4 : 10 µl antiserum + 30 µl SF

1/8 : 5 µl antiserum + 35 µl SF

BSA ile aynı şekilde ve aynı mikroplate üzerinde sulandırma yapıldı. Yapılan sulandırmada yine işaretlenmiş kuyucuklara sırasıyla 20 µl antiserum + 20 µl BSA, 10 µl antiserum + 30 µl BSA, 5 µl antiserum +35 µl BSA damlatıldı.

1/2 : 20 µl antiserum + 20 µl BSA

1/4 : 10 µl antiserum + 30 µl BSA

1/8 : 5 µl antiserum + 35 µl BSA

3.1. Deneyler

3.1.1. Mikroplate yöntemi

Deneylerde tüp antiserumları kullanılmıştır. Agglütinasyonlar tüp yerine mikroplate'te gerçekleştirilmiştir. Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antijenlerinin 37°C ısıda enkübasyonla eritrositlerin agglütine edilebilmesi nedeniyle bu antijenlerin gösterileceği deneyler bir mikroplate'te, Lewis antijenlerinin gösterileceği deneyler ayrı bir mikroplate'te yapılmıştır(3,20).

3.1.1.1. Lewis antijenlerinin gösterilmesi

Tüp antiserumları kullanılarak çalışılan Mikroplate yönteminde, deney klasik tüp yönteminde belirtildiği gibi yapılmıştır. Ancak reaksiyonlar tüp yerine mikroplate kuyucuklarında gerçekleştirilmiştir(70,71).

Mikroplate'in işaretlenmiş kuyucuklarına sırasıyla 40 µl anti-Le^a ve 40 µl anti-Le^b antiserumu damlatıldı. Antiserum bulunan her bir kuyucuğa SF ile hazırlanan % 3'lük eritrosit süspansiyonundan 40'ar µl ilave edildi. Mikroplate hafifçe çalkalanarak 10 dakika oda ısısında enkübe edildi. Enkübasyondan sonra 1000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen mikroplate hafifçe çalkalandı ve reaksiyon sonuçları makroskopik olarak değerlendirildi.

Antiserumlar SF ve BSA ile 1/2, 1/4, 1/8 oranlarında dilüe edilerek aynı deneyler tekrarlandı ve sonuçlar karşılaştırıldı.

3.1.1.2. Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antijenlerinin gösterilmesi

Tüp antiserumları kullanılarak yapılan deneylerde, klasik tüp yönteminden farklı olarak reaksiyonlar tüp yerine mikroplate'lerde gerçekleştirildi.

Mikroplate'in işaretlenmiş kuyucuklarına sırasıyla anti-K, -k, -Jk^a, -Jk^b, -Fy^a, -Fy^b, -Lu^a ve -Lu^b antiserumlarından 40'ar µl damlatıldı. Antiserum damlatılan bütün kuyucuklara SF ile hazırlanan % 3'lük eritrosit süspansiyonundan 40'ar µl ilave edildi. Mikroplate hafifçe çalkalanarak etüvde 37°C'de 15 dakika enkübe edildi. Enkübasyonun

ardından her kuyucuğa 100'er µl SF konuldu ve 3000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atıldı ve bu şekilde yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Son yıkamanın ardından üst kısım atıldı ve bütün kuyucuklara 80'er µl anti-human globulin damlatılıp hafifçe çalkalanarak 1000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra mikropate hafifçe çalkalanarak sonuçlar makroskopik olarak okundu. Sonuçta; kuyu dibinde çökelti oluşturanlar pozitif, homojen süspansiyon haline gelenler negatif olarak değerlendirildi ve reaksiyon sonuçları fotoğraflandı.

SF ve BSA ile 1/2, 1/4, 1/8 oranlarında dilüe edilen antiserumlar aynı yöntem uygulanarak deneyler tekrarlandı.

3.1.2. Jel test yöntemi

Testin uygulanmasında kit protokolüne bağlı kalınmıştır. Kit protokolünde testin tam kan ile çalışılabileceği belirtilmektedir. Bu çalışmada yıkanmış eritrositlerden hazırlanan hücre süspansiyonları kullanılmıştır.

3.1.2.1. Lewis, Kell, Kidd ve Lutheran antijenlerinin gösterilmesi

Lewis, Kell, Kidd ve Lutheran antijenleri için hazırlanmış olan ID-Kartlara ID-Diluent I (Bromelin Solusyonu) ile hazırlanan % 5'lik eritrosit süspansiyonundan 10'ar µl damlatıldı. ID-Santrifüjde 10 dakika santrifüj edilerek sonuçlar makroskopik olarak okundu.

3.1.2.2. Duffy antijenlerinin gösterilmesi

Üretici firma tarafından, Duffy antijenleri için hazırlanmış olan ID-kartlara antiserum ilave edilmemiştir. ID-kartları üreten firmanın önerdiği şekilde, antiserumlar kartlara sonradan ilave edilmiştir.

Duffy için hazırlanmış ID-kartlara anti-Fy^a ve anti-Fy^b antiserumundan 50'şer µl damlatıldı. Üzerine ID-Diluent II (LISS) ile hazırlanan % 1'lik eritrosit süspansiyonundan

50'şer µl damlatıldı. ID-Enkübatörde 37°C'de 15 dakika enkübe edilen kartlar ID-Santrifüjde 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan reaksiyonlar makroskopik olarak okundu ve reaksiyon sonuçları fotoğraflandı. Reaksiyonlar agglütinasyonun derecesine göre +1, +2, +3 , +4 ve negatif (-) olarak değerlendirildi.

Sonuçların değerlendirilmesinde üretici firmanın önerdiği okuma yöntemi kullanılmıştır. Bu şekilde mikrotüpün iki eşit parçaya bölündüğü düşünülerek; üst yarının üst kısmında oluşan agglütinasyon +4, jel içinde mikrotüpün yarısına kadar inen agglütinasyon +3, mikrotüpün yarısından dip kısmına kadar uzanan agglütinasyon +2, dibe yakın kısımda oluşan agglütinasyon +1 ve dibe çökmüş eritrosit hücreleri negatif olarak değerlendirilmiştir. Jel test yöntemiyle Kidd ve Lutheran fenotipleri 74 örnekte çalışılmıştır. Ancak parasal sıkıntılar nedeniyle Lewis fenotipleri 73 örnekte, Kell fenotipleri 38 örnekte, Duffy fenotipleri 63 örnekte Jel Test yöntemi ile çalışılabilmiştir.

Tüp antiserumları kullanılarak yapılan mikropate yönteminde antiserumların 1/1, 1/2, 1/4 ve 1/8 oranlarında % 3'lük bovin serum albumin ve % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile sulandırılarak saptanan hemagglütinasyon sonuçları Jel Test yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Anti-Le^a, -Le^b, -K, -k, -Jk^a, -Jk^b, -Fy^a, -Fy^b, -Lu^a ve -Lu^b tüp antiserumlarının mikropate'te hangi dilüsyonlarda kullanılabileceğini ortaya koymak amacıyla yapılan deneylerde; antiserumların 1/4 ve 1/8 oranlarında SF ve BSA ile sulandırıldığı kuyucuklarda bilinen kan grupları ile agglütinasyon ayırt edilemedi. Bu nedenle fazla miktarda antiserum sarfetmemek için örnek sayısı çoğaltılmadı. 1/1 (tam) ve 1/2 oranında SF ve BSA ile sulandırılmış antiserum kullanılarak 10 örnekte yapılan deneylerde; sulandırmada SF veya BSA kullanılmasının agglütinasyonların izlenebilmesinde bir farklılık göstermediği saptandı. Ucuzluğu nedeniyle SF'in tercih edilmesine karar verildi. Çalışmaya örnek sayısı artırılarak devam edildiğinde, antiserumun 1/2 oranında SF ile sulandırılmasının Lewis antijenlerini göstermede problemlere neden olduğu görüldü. 94/16 protokol nolu kan örneğinde antiserumun 1/2 oranında sulandırıldığı kuyucukta Le(a-) fenotipi izlenirken, tam antiserumla çalışılan kuyucukta Le(a+) fenotipi saptandı. Bu nedenle Lewis antijenlerinin gösterilmesinde deneylere 16. kan örneğinden itibaren 74. kan örneğine kadar toplam 58 kan örneğinde tam antiserum kullanılarak devam edildi.

Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antijenlerinin gösterilmesi için 20 kan örneğinde, 1/1 (tam) ve 1/2 oranında SF ile sulandırılan antiserum kullanılarak yapılan çalışmalarda; fenotipik bir farklılık saptanmamıştır. Bu nedenle 20. kan örneğinden itibaren diğer 54 örnekte yalnızca 1/2 oranında SF ile sulandırılan antiserum kullanarak deneyler yapılmıştır.

Lewis için sulandırılmamış tüp antiserumu, Kell, Kidd, Duffy, Lutheran için 1/2 oranında SF ile sulandırılmış tüp antiserumu ile mikropate'te yapılan agglütinasyon deneylerinin sonuçları ile aynı eritrosit antijenlerinin Jel Test ID-kart kullanarak elde edilen fenotipleri karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar Tablo II, III, IV, V ve VI'da gösterilmiştir.

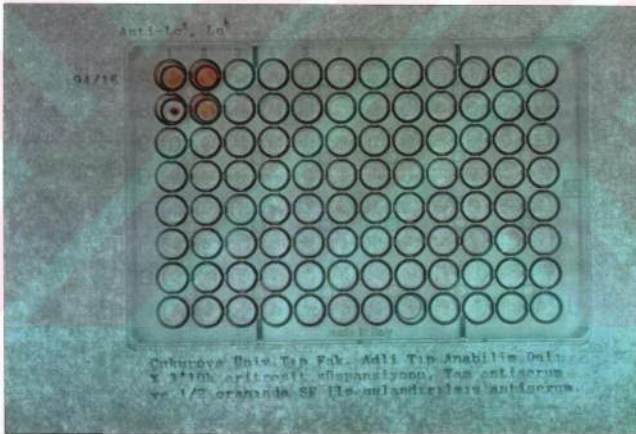
74 kan örneğinde Mikropate, 73 kan örneğinde Jel Test yöntemiyle yapılan Lewis antijenlerinin fenotiplendirilmesinde elde edilen bulgular Tablo II'de gösterilmiştir.

TABLO II. 74 kan örneğinde Mikroplate, 73 kan örneğinde Jel Test yöntemi ile saptanan Lewis fenotipleri.

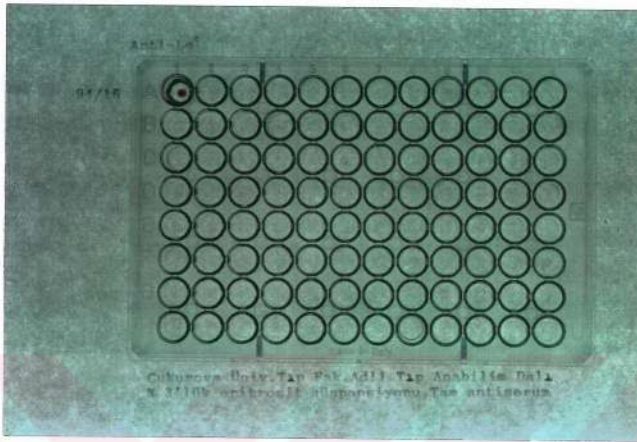
<i>Prot. No</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>	<i>Prot. No</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>
94/1	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/38	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/2	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)	94/39	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)
94/3	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/40	Le(a+ ,b -)	Le(a+1,b -)
94/4	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/41	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/5	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)	94/42	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/6	Le(a+ ,b -)	Le(a+1,b -)	94/43	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/7	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)	94/44	Le(a+ ,b -)	Le(a+1,b -)
94/8	Le(a+ ,b+)	Le(a+2,b+2)	94/45	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/9	Le(a+ ,b -)	Le(a+1,b -)	94/46	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+1)
94/10	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/47	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/11	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+1)	94/48	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/12	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)	94/49	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/13	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)	94/50	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/14	Le(a+ ,b -)	Le(a+1,b -)	94/51	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/15	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/52	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/16*	Le(a+ ,b-)	Le(a- ,b -)	94/53	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/17	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/54	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/18	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/55	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/19	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/56	Le(a+ ,b -)	Le(a+1,b -)
94/20	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/57	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/21	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/58	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/22	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/59	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/23	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/60	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/24	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/61	Le(a+ ,b -)	Le(a+1,b -)
94/25	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/62	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/26	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/63	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/27	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/64	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/28	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/65	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/29	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/66	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)
94/30	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/67	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)
94/31	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)	94/68	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/32	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)	94/69	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)
94/33	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/70	Le(a- ,b+)	
94/34	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+2)	94/71	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)
94/35	Le(a+ ,b -)	Le(a+2,b -)	94/72	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/36	Le(a- ,b -)	Le(a- ,b -)	94/73	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)
94/37	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)	94/74	Le(a- ,b+)	Le(a- ,b+3)

* Mikroplate ve Jel Test yöntemi ile Lewis fenotiplerinde farklılık saptanan kan örneği.

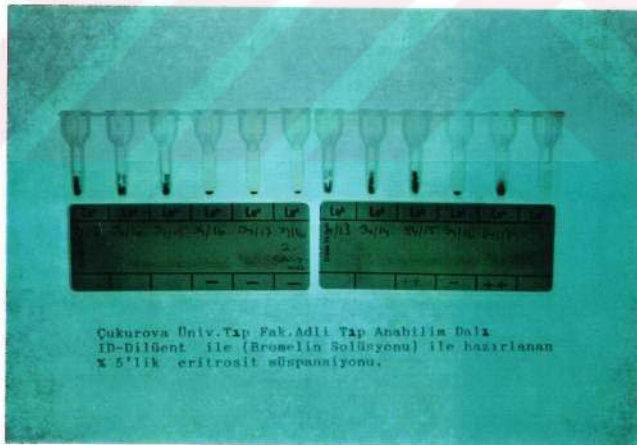
Çalışılan 73 aynı kan örneğinin 72'sinde Mikroplate ve Jel Test yöntemi ile saptanan Lewis fenotipleri aynı bulunmuştur. 94/16 protokol nolu kan örneği mikroplate yöntemi ile yapılan çalışmada tüp antiserumunun 1/2 sulandırımı ile Le(a-) bulunurken, tam antiserum kullanımında Le(a+) olarak saptanmıştır. Aynı kan örneği jel test yöntemi ile iki kez çalışılmıştır. Jel test yöntemi ile yapılan her iki çalışmada da Le(a-) fenotipi saptanmıştır. Şekil 9, 10 ve 11'de 94/16 protokol nolu kan örneğinin mikroplate ve Jel Test yöntemi ile saptanan sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 9. 94/16 prot. nolu örneğin Mikroplate yöntemi ile yapılan 1.çalışma sonucu.



Şekil 10. 94/16 prot. nolu örneğin mikropate yöntemi ile yapılan 2. çalışma sonucu.



Şekil 11. 94/16 prot. nolu örneğin Jel test yöntemi ile yapılan 1. ve 2. çalışma sonucu.

74 kan örneğinde Mikroplate, 38 kan örneğinde Jel Test yöntemiyle yapılan Kell antijenlerinin fenotiplendirilmesinde elde edilen bulgular Tablo III'te gösterilmiştir.

TABLO III. 74 kan örneğinde Mikroplate, 38 kan örneğinde Jel Test yöntemiyle saptanan Kell fenotipleri.

<i>Prot.no</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>	<i>Prot.no</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>
94/1	K-,k+	K-	94/38	K-,k+	K-
94/2	K-,k+	K-	94/39	K-,k+	
94/3	K-,k+		94/40	K-,k+	
94/4	K-,k+		94/41	K-,k+	K-
94/5	K-,k+	K-	94/42	K-,k+	
94/6	K-,k+	K-	94/43	K-,k+	K-
94/7	K-,k+	K-	94/44	K-,k+	K-
94/8	K-,k+	K-	94/45	K-,k+	K-
94/9	K-,k+	K-	94/46	K-,k+	
94/10	K-,k+	K-	94/47	K-,k+	
94/11	K-,k+	K-	94/48	K-,k+	
94/12	K-,k+	K-	94/49	K-,k+	
94/13	K-,k+	K-	94/50	K-,k+	K-
94/14	K-,k+	K-	94/51	K-,k+	K-
94/15	K-,k+	K-	94/52	K+,k+	
94/16	K-,k+	K-	94/53	K-,k+	
94/17	K-,k+	K-	94/54	K-,k+	
94/18	K-,k+	K-	94/55	K-,k+	
94/19	K-,k+	K-	94/56	K-,k+	
94/20	K-,k+	K-	94/57	K-,k+	
94/21	K-,k+	K-	94/58	K-,k+	
94/22	K-,k+	K-	94/59	K-,k+	
94/23	K+,k+	K+4	94/60	K-,k+	
94/24	K-,k+	K-	94/61	K-,k+	
94/25	K-,k+	K-	94/62	K-,k+	
94/26	K-,k+	K-	94/63	K-,k+	
94/27	K-,k+	K-	94/64	K-,k+	
94/28	K-,k+		94/65	K-,k+	
94/29	K-,k+	K-	94/66	K-,k+	
94/30	K-,k+		94/67	K-,k+	
94/31	K-,k+	K-	94/68	K-,k+	
94/32	K-,k+		94/69	K-,k+	
94/33	K-,k+		94/70	K-,k+	
94/34	K-,k+		94/71	K-,k+	K-
94/35	K-,k+	K-	94/72	K-,k+	K-
94/36	K-,k+		94/73	K-,k+	K-
94/37	K-,k+		94/74	K-,k+	K-

Çalışılan 38 aynı kan örneğinde Kell fenotiplerinin Mikroplate ve Jel Test yöntemi ile elde edilen sonuçları aynıdır.

74 kan örneğinde, Mikroplate ve Jel Test yöntemi ile yapılan Kidd antijenlerinin fenotiplendirilmesinde elde edilen bulgular Tablo IV'te gösterilmiştir.

TABLO IV. 74 kan örneğinde, Mikroplate ve Jel Test yöntemi ile saptanan Kidd fenotipleri.

<i>Prot. No</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>	<i>Prot. No</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>
94/1	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/38	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)
94/2	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/39	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)
94/3	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/40	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+2)
94/4	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/41	Jk(a+,b+)	Jk(a+3,b+2)
94/5	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/42	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/6	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/43	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)
94/7	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/44	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)
94/8	Jk(a+,b+)	Jk(a+3,b+2)	94/45	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)
94/9	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/46	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/10	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/47	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)
94/11	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/48	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)
94/12	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/49	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)
94/13	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/50	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/14	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/51	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)
94/15	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/52	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)
94/16	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/53	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)
94/17	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/54	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)
94/18	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)	94/55	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+4)
94/19	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/56	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/20	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/57	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)
94/21	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/58	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/22	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/59	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/23	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)	94/60	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)
94/24	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)	94/61	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+4)
94/25	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/62	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)
94/26	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/63	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)
94/27	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+2)	94/64	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/28	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/65	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+4)
94/29	Jk(a+,b+)	Jk(a+3,b+2)	94/66	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/30	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/67	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+4)
94/31	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/68	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/32	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)	94/69	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)
94/33	Jk(a+,b -)	Jk(a+4,b -)	94/70	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+4)
94/34	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/71	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)
94/35	Jk(a+,b -)	Jk(a+3,b -)	94/72	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+3)
94/36	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)	94/73	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)
94/37	Jk(a- ,b+)	Jk(a- ,b+3)	94/74	Jk(a+,b+)	Jk(a+4,b+2)

Çalışılan 74 kan örneğinde, mikrolate ve jel test yöntemi ile aynı Kidd fenotipleri saptanmıştır.

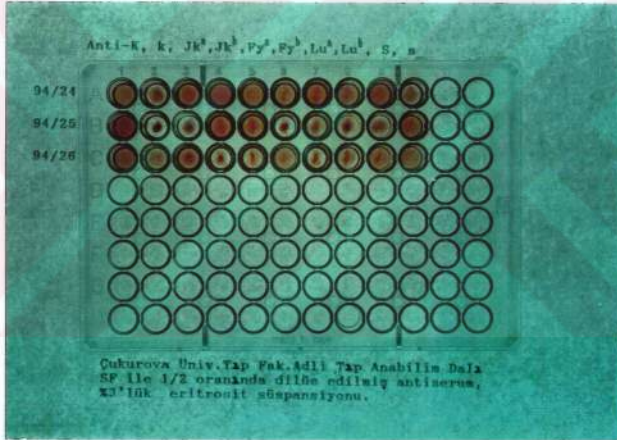
74 kan örneğinde mikrolate, 63 kan örneğinde jel test yöntemiyle yapılan Duffy antijenlerinin fenotiplendirilmesinde elde edilen bulgular Tablo V'te gösterilmiştir.

TABLO V. Mikrolate ile 74, Jel Test ile 63 kan örneğinde saptanan Duffy fenotipleri.

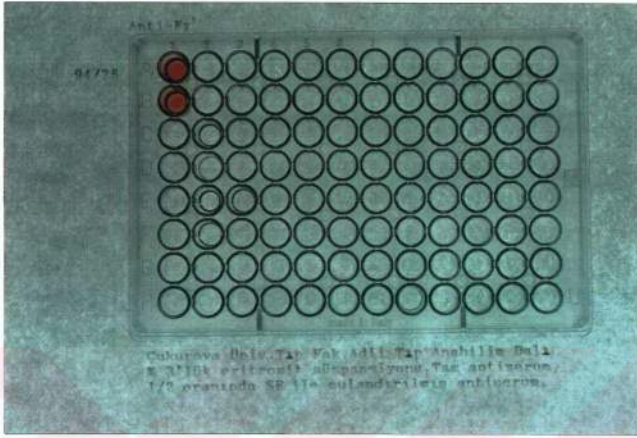
<i>Prot. No</i>	<i>Mikrolate</i>	<i>Jel Test</i>	<i>Prot. No</i>	<i>Mikrolate</i>	<i>Jel Test</i>
94/1	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/38	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/2	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/39	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/3	Fy(a+,b+)	Fy(a+4,b+4)	94/40	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/4	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+4)	94/41	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/5	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/42	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/6	Fy(a+,b+)	Fy(a+4,b+4)	94/43	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/7	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/44	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/8	Fy(a+,b -)	Fy(a+3,b -)	94/45	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+4)
94/9	Fy(a+,b -)	Fy(a+3,b -)	94/46	Fy(a+,b -)	Fy(a+3,b -)
94/10	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/47	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/11	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/48	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/12	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/49	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+2)
94/13	Fy(a+,b+)	Fy(a+4,b+4)	94/50	Fy(a+,b -)	Fy(a+3,b -)
94/14	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/51	Fy(a+,b -)	Fy(a+4,b -)
94/15	Fy(a+,b -)	Fy(a+3,b -)	94/52	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/16	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/53	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+2)
94/17	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/54	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/18	Fy(a+,b+)	Fy(a+2,b+3)	94/55	Fy(a+,b+)	Fy(a+4,b+3)
94/19	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+2)	94/56	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/20	Fy(a+,b+)	Fy(a+2,b+2)	94/57	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/21	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/58	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)
94/22	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/59	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/23	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/60	Fy(a- ,b+)	
94/24	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/61	Fy(a+,b+)	
94/25	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+4)	94/62	Fy(a+,b+)	
94/26*	Fy(a- ,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/63	Fy(a- ,b+)	
94/27	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/64	Fy(a+,b+)	
94/28	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/65	Fy(a+,b+)	
94/29	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/66	Fy(a- ,b+)	
94/30	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/67	Fy(a+,b+)	
94/31	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/68	Fy(a+,b+)	
94/32	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+3)	94/69	Fy(a- ,b+)	
94/33	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+4)	94/70	Fy(a+,b+)	
94/34	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/71	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/35	Fy(a- ,b+)	Fy(a- ,b+4)	94/72	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/36	Fy(a+,b -)	Fy(a+3,b -)	94/73	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)
94/37	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)	94/74	Fy(a+,b+)	Fy(a+3,b+3)

*Mikrolate ve Jel Test yöntemiyle Duffy fenotiplerinde farklılık saptanan kan örneği.

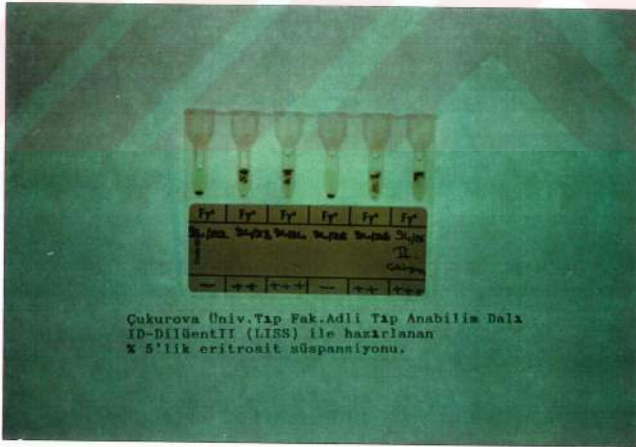
Her iki yöntemle çalışılan 63 kan örneğinden 62'sinde saptanan fenotipler aynı iken, örneklerden birinde farklı fenotip saptanmıştır. Her iki yöntemle farklı fenotip gözlenen bu kan örneği (94/26 protokol nolu kan) mikrolate yönteminde, 1/2 'lik antiserum dilüsyonunda ve tam antiserum ile Fy(a-) fenotipinde bulunmuştur. Jel Test Yöntemi ile yapılan çalışmada örnek kanın Fy(a+3) fenotipinde olduğu saptanmıştır. Jel Test ile yapılan ikinci çalışmada da sonuç yine Fy(a+3) olarak saptanmıştır. Şekil 12, 13 ve 14'de 94/26 protokol nolu kan örneğinde saptanan sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 12. 94/26 prot. nolu örneğin mikrolate yöntemi ile yapılan 1. çalışma sonucu.



Şekil 13. 94/26 protokol nolu örneğin mikropate yöntemi ile yapılan 2. çalışma sonucu.



Şekil 14. 94/26 protokol nolu örneğin Jel Test ile yapılan 1. ve 2. çalışma sonucu.

74 kan örneğinde Mikroplate ve Jel Test yöntemiyle yapılan Lutheran antijenlerinin fenotiplendirilmesinde elde edilen bulgular Tablo VI'da gösterilmiştir.

TABLO VI. 74 kan örneğinde Mikroplate ve Jel Test yöntemi ile saptanan Lutheran fenotipleri.

<i>Prot. No</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>	<i>Prot. No</i>	<i>Mikroplate</i>	<i>Jel Test</i>
94/1	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/38	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/2	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/39	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/3	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/40	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/4	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/41	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/5	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+1)	94/42	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/6	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/43	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/7	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/44	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/8	Lu(a+,b-)	Lu(a+2,b-)	94/45	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/9	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/46	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/10	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/47	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/11	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/48	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/12	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/49	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/13	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/50	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/14	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/51	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/15	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/52	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+1)
94/16	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/53	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/17	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/54	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/18	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/55	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/19	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/56	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/20	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/57	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/21	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/58	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/22	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/59	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/23	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/60	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/24	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/61	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/25	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/62	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/26	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/63	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/27	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/64	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/28	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/65	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/29	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/66	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/30	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/67	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/31	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/68	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/32	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/69	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)
94/33	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/70	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/34	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/71	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/35	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)	94/72	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/36	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/73	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)
94/37	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+2)	94/74	Lu(a-,b+)	Lu(a-,b+3)

Çalışılan 74 kan örneğinde mikrolate ve jel test yöntemlerinin her ikisi ile de saptanan Lutheran fenotipleri aynıdır.

Bu çalışmada ayrıca 74 kan örneğinde mikrolate yöntemi ile gösterilen Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antijenlerinin fenotipik dağılımları ile bu antijenlere rastlanma sıklığı hesaplanmıştır. Bu sonuçlar sırasıyla Tablo VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV ve XVI'da gösterilmiştir.

Mikrolate yöntemiyle 74 kan örneğinde saptanan Lewis fenotipik dağılımı ile bu antijenlere rastlanma sıklığı sırasıyla Tablo VII ve VIII'de gösterilmiştir.

Tablo VII. Mikrolate yöntemi ile çalışılan 74 Kan örneğinde saptanan Lewis fenotip dağılımları.

<i>Fenotipler</i>	<i>Kişi sayısı</i>	<i>%</i>
Le(a-b-)	17	23.00
Le(a-b+)	38	51.50
Le(a+b-)	18	24.41
Le(a+b+)	1	1.09

Tablo VIII. Mikrolate yöntemi ile çalışılan 74 kan örneğinde Lewis antijenlerine rastlanma sıklığı.

<i>Lewis antijenleri</i>	<i>%</i>
Le ^a	25.67
Le ^b	52.83

Mikrolate yöntemi ile 74 kan örneğinde saptanan Kell antijenlerinin fenotipik dağılımı ve bu antijenlere rastlanma sıklığı sırasıyla Tablo IX ve Tablo X'da gösterilmiştir.

Tablo IX. Mikroplate yöntemi ile çalışılan 74 kan örneğinde Kell antijenlerinin fenotip oranları.

<i>Kell fenotipleri</i>	<i>Kişi sayısı</i>	<i>%</i>
K-k-	0	0.00
K-k+	72	97.30
K+k-	0	0.00
K+k+	2	2.70

Tablo X. Mikroplate yöntemi ile çalışılan 74 kan örneğinde, Kell antijenlerine rastlanma sıklığı.

<i>Kell antijenleri</i>	<i>%</i>
K	2.70
k	100.00

Mikroplate yöntemi ile 74 kan örneğinde saptanan Kidd antijenlerinin fenotipik dağılımı ve bu antijenlere rastlanma sıklığı sırasıyla Tablo XI ve XII'de gösterilmiştir.

Tablo XI. Mikroplate yöntemiyle 74 kan örneğinde saptanan Kidd fenotip oranları.

<i>Kidd fenotipleri</i>	<i>Kişi Sayısı</i>	<i>%</i>
Jk(a-b-)	0	0.00
Jk(a-b+)	20	28.30
Jk(a+b-)	20	28.30
Jk(a+b+)	34	43.40

Tablo XII. Mikroplate yöntemiyle çalışılan 74 kan örneğinde Kidd antijenlerine rastlanma sıklığı.

<i>Kidd antijenleri</i>	<i>%</i>
Jk ^a	73.00
Jk ^b	73.00

Mikroplate yöntemi ile 74 kan örneğinde saptanan Duffy antijenlerinin fenotipik dağılımı ve bu antijenlere rastlanma sıklığı sırasıyla Tablo XIII ve XIV'te gösterilmiştir.

Tablo XIII. Mikroplate yöntemi ile çalışılan 74 kan örneğinde saptanan Duffy fenotip oranları.

<i>Duffy fenotipleri</i>	<i>Kişi sayısı</i>	<i>%</i>
Fy(a-b-)	0	0.00
Fy(a-b+)	25	33.30
Fy(a+b-)	9	1.20
Fy(a+b+)	40	66.50

Tablo XIV. Mikroplate yöntemi ile çalışılan 74 kan örneğinde Duffy antijenlerine rastlanma sıklığı.

<i>Duffy antijenleri</i>	<i>%</i>
Fy ^a	66.21
Fy ^b	87.83

Mikroplate yöntemiyle 74 kan örneğinde saptanan Lutheran antijenlerinin fenotipik dağılımı ile bu antijenlere rastlanma sıklığı sırasıyla Tablo XV ve Tablo XVI'da gösterilmiştir.

Tablo XV. Mikroplate yöntemiyle 74 kan örneğinde saptanan Lutheran fenotip oranları.

<i>Lutheran fenotipleri</i>	<i>Kişi sayısı</i>	<i>%</i>
Lu(a-b-)	0	0.00
Lu(a-b+)	73	99.00
Lu(a+b-)	1	1.00
Lu(a+b+)	0	0.00

Tablo XVI. Mikroplate yöntemiyle 74 kan örneğinde Lutheran antijenlerine rastlanma sıklığı.

<i>Lutheran antijenleri</i>	<i>%</i>
Lu ^a	1.00
Lu ^b	99.00

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yöntem karşılaştırmaları, yöntemler arasında amaca uygun kullanılabilecek en iyi yöntemi belirlemeye yönelik olarak yapılmaktadır. Gelişmiş ülkeler yöntemlerin hassasiyet ve spesifikliğini belirleyebilmek amacıyla, farklı ülkelere ve bölgelere gönderilen deney materyalleri ile yapılan çalışmaları değerlendirmekte, böylece yöntemin hassasiyetini ve spesifikliğini daha objektif bir şekilde değerlendirmeye çalışmaktadır. Böyle bir değerlendirmede, hataların teknik hatalardan çok, kişisel hatalardan kaynaklandığı belirtilmektedir. Bu hataların çoğunluğunun okuma hatası olduğu, bir kısmının ise tüplerin yer değiştirmesi, yanlış kayıt ve etiketleme hatası olduğu bildirilmektedir. Bu tür çalışmaların çoğu kan bankalarının günlük çalışmalarıyla ilgilidir. Kaynaklarda; yapılan çalışmalarda teknik hata oranının majör kan grubu antijenleri için % 4'e kadar ulaştığı bildirilmektedir. Üzerinde çalıştığımız zayıf antijenlerle ilgili bu tür bir çalışmaya kaynaklarda rastlanmamıştır(6,18,25,70).

Adli Seroloji laboratuvarlarında fenotiplendirmede yapılan bir hata, paternite ve kimliklendirmede suçlu bir kişinin suçsuz, suçsuz bir kişinin suçlu sayılabilesine neden olacaktır. Bu göz önünde bulundurulduğunda, Adli Seroloji laboratuvarında fenotiplendirme için seçilecek yöntemin hassas, güvenilir ve hata payını tamamen ortadan kaldıracak özellikte olması gerekmektedir. Diğer taraftan, bu laboratuvarların çalışacağı materyaller çoğunlukla az miktarda ve bazende istenmeyen koşullarda alınmış, saklanmış, ambalajlanmış yada taşınmış olmaktadır. Bunun yanında elde edilen sonuçların delil olarak saklanmaya uygun özellikte olması da avantaj olacaktır. Hassasiyet ve spesifiklikleri yanı sıra fotoğraf ve benzeri yöntemlerle sağlıklı görüntülenebilme özelliği olduğu ileri sürülen mikropate ve jel test yöntemleri bu nedenle çalışmada yöntem olarak seçilmiştir(11,20,24,30).

Adli açıdan kişisel kaynaklı hataların ortadan kaldırılma zorunluluğu göz önünde bulundurulduğunda, jel test yönteminin mikropate yöntemine göre daha avantajlı olduğu görülmüştür. Bu yöntemde her bir antijen sistemi için ayrı ayrı hazırlanmış olan ID-

kartlara sadece eritrosit süspansiyonu hazırlanarak ilave edilmektedir. Ancak üretilen kartların kalite kontrollerinin sağlıklı yapılması ve kartların kullanım sürelerinde kullanılması güvenilirliğin artmasında önemli bir nokta olacaktır.

Antiserum üreten firmalarca kan örneklerinin farklı antikoagülanlar ile pıhtılaşması önlenerek 28 güne kadar kullanılabileceği belirtilmektedir. Bununla beraber yapılan çeşitli çalışmalarda kan örneklerinin taze olarak kullanılması önerilmekte, örneklerin 12 saat içinde çalışılmayacağı durumlarda +4°C'de saklanması uygun olacağı belirtilmektedir(20,70).

Bu çalışmada bekletilmekten kaynaklanabilecek olan kontaminasyon ve benzeri etkilerle antijenik aktivite değişikliğini tamamen ortadan kaldırmak amacıyla örnekler bekletilmeden çalışılmıştır.

Kaynaklarda yıkanmamış eritrosit kullanımının yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği belirtilerek, artefaktları ortadan kaldırmak amacıyla eritrositlerin yıkanarak kullanılması önerilmektedir. Bu nedenle Jel test yönteminde üretici firma tarafından yıkanmamış eritrosit hücrelerinin kullanılabileceği belirtilmiş olduğu halde, bu çalışmada yıkanmış eritrositler kullanılmıştır(17,60).

Bu çalışmada mikropate ve jel test yöntemiyle Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran olmak üzere 5 antijen sisteminin major antijenlerinden bazıları çalışılmıştır. Tüp antiserumları kullanılarak yapılan mikropate yönteminde, deney klasik tüp yönteminde belirtildiği gibi yapılmakla birlikte, reaksiyonlar tüp yerine mikropate kuyucuklarında gerçekleştirilmiştir. Böylece birçok tüp kullanımı yerine bir tek mikropate üzerinde birden fazla reaksiyon gerçekleştirilerek, tüplerin yer değiştirmesi gibi karışıklıklar önlenmiştir. Bir paternite çalışmasında en az üç kişiden alınacak kan örnekleri ile bakılması gereken antijenler göz önünde bulundurulursa, yaklaşık 50 tüple çalışmak gerekecektir. Bu tür bir çalışmada karışıklık ve teknik basamak hatasını önlemek daha zor olacaktır. Bu problem mikropate kullanarak en aza indirilmiş olmaktadır.

Antiserumların sulandırılması maliyetin düşürülmesi açısından önem kazanmaktadır.

Bu amaçla kaynaklarda önerilen sulandırıcılar SF ve BSA'dır. Bu çalışmada antiserumların sulandırılarak kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla tüp antiserumları 1/2, 1/4 ve 1/8 oranlarında SF ve BSA ile sulandırılmıştır. Antiserumların hem SF hem de BSA ile 1/4 ve 1/8 oranlarında sulandırıldığı kuyucuklarda agglütinasyonlar ayırt edilememiştir. Antiserumların 1/2 oranında SF ve BSA ile sulandırıldığı çalışmalarda SF veya BSA ile sulandırmanın agglütinasyonların değerlendirilmesinde bir farklılık yaratmadığı izlenmiştir. Bu nedenle sulandırma amacıyla maliyet açısından daha uygun olan SF ile çalışmaya devam edilmiştir. Ancak deneyler örnek sayısı artırılarak sürdürüldüğünde; Lewis antijenlerinin gösterilebilmesi için 1/2 oranında SF ile sulandırılan antiserumların, agglütinasyonların ayırd edilebilmesi açısından yetersiz olduğu belirlenmiştir(20,70).

Mikroplate yöntemi ile Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antijenlerinin gösterilmesinde ilk 20 örnekte tam ve 1/2 oranında SF ile sulandırılan antiserum kullanılarak yapılan çalışmada agglütinasyonların değerlendirilebilmesi açısından fenotipik bir farklılığın saptanmaması sebebiyle 54 kan örneği 1/2 oranında SF ile sulandırılarak çalışılmıştır.

Mikroplate'te yapılan deneylerde, çalışılan zayıf antijenlerin çıplak gözle elde edilen sonuçları, bu mikroplateden çekilen fotoğraflarda gösterilememiştir. Bu özellik nedeniyle zayıf antijenik grupların fotoğraflanarak saklanması mikropate yönteminde başarılı olamayacağı kanısına varılmıştır. Bu yöntemin ileri sürülen iyi görüntülenebilme özelliğinin belki de bazı özel ışıklandırma sistemleri geliştirilerek gerçekleştirilebileceği düşünülmüştür.

Jel teste çalışılan ID-kartların fotoğrafları başarılı sonuçlar vermiş ve bu yöntemin saklanabilir delil için yararlı olacağı düşünülmüştür.

94/16 protokol nolu kan örneğinde mikroplate yöntemi ile Le(a+) fenotipi saptanırken, jel test yönteminde Le(a-) fenotipi saptanmıştır. Bununla birlikte; 94/26 protokol nolu kan örneğinde Fy^a antijeni mikroplate yöntemi ile negatif bulunurken, jel test yöntemi ile yapılan çalışmada Fy(a+3) olarak saptanmıştır. Deneyler her iki yöntemle tekrarlandığında sonuçlar yine aynı şekilde elde edilmiştir. Bu iki farklı sonuç eritrosit

antijenlerinin Adli Serolojide gösterilmesi açısından tek bir yöntemin yetersiz kaldığını, çalışmaların en az iki farklı yöntemle yapılmasının gerekliliği konusunu bir kez daha vurgulamamıza neden olmuştur.

Mikroplate yöntemiyle saptanan Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran antigenlerinin fenotipik dağılımları ile kaynaklarda beyazlarda saptandığı bildirilen sıklık karşılaştırıldığında farklılık saptanmıştır. Bu farklılığın yöresel bir özelliği yansıttığı düşünülmüştür(31). Bu sonuçlar sırasıyla Tablo XVII'de gösterilmiştir.

Tablo XVII. Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran fenotiplerinin çalışma sonuçları ve kaynaklarda belirtilen sonuçlar(31).

<i>Kan Grupları</i>	<i>Fenotipler</i>	<i>Çalışma Sonuçları(%)</i>	<i>Kaynaklar(%)</i>
Lewis	Le(a-b-)	23.00	5
	Le(a-b+)	51.50	75
	Le(a+b-)	24.41	20
	Le(a+b+)	1.09	-
Kell	K-k-	0.00	-
	K+k-	0.00	2
	K+k+	2.70	8
	K-k+	97.30	92
Kidd	Jk(a-b-)	0.00	-
	Jk(a-b+)	28.30	24
	Jk(a+b-)	28.30	26
	Jk(a+b+)	43.40	50
Duffy	Fy(a-b-)	0.00	-
	Fy(a-b+)	33.30	33
	Fy(a+b-)	1.20	20
	Fy(a+b+)	66.50	9
Lutheran	Lu(a-b-)	0.00	-
	Lu(a-b+)	99.00	92
	Lu(a+b-)	1.00	2
	Lu(a+b+)	0.00	-

Gelişmiş ülkelerin Adli Seroloji laboratuvarlarında kimliklendirme ve paternite saptamada çeşitli polimorfik enzim ve proteinler araştırılmakla birlikte DNA analizleri de yapılmaktadır. Ülkemizde ise bu çalışmalar henüz deneysel aşamadadır. Bu nedenle Adli Seroloji laboratuvarımızda en azından antijenlerin gösterilmesinde daha spesifik ve hassas hemagglütinasyon yöntemlerinin kullanılması gerektiği görüşündeyiz.



6. ÖZET

Adli Serolojide eritrosit antijenlerinden biyolojik sıvılar ile bunlara ait leke ve artıkların kimliklendirilmesinde ve paternite saptanmasında yararlanılmaktadır.

Bu amaçla eritrosit antijenleri lam, tüp gibi klasik yöntemlerin yanı sıra mikropate ve jel test yöntemleri gibi yeni yöntemlerle gösterilmektedir. Klasik yöntemlerle bazı eritrosit antijenlerinin gösterilmesi güç olmaktadır. Bu nedenle yeni yöntemlerin klasik yöntemlere göre bir takım avantajları bulunmaktadır. Bu yöntemlerin spesifik, hassas, görüntülenebilir özellikte olmalarının yanında; zayıf antijenik özellikte olan bazı eritrosit antijenlerini gösterebilmesi gibi üstünlükleri bildirilmektedir.

Bu çalışmada taze kanda Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran eritrosit antijenleri mikropate ve jel test yöntemleri ile fenotiplendirilerek, bu yöntemlerin Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalının kuruluş aşamasında olan Adli Seroloji Laboratuvarında çalışılabilirliği araştırılmıştır.

Bu çalışmada 74 kişiden alınan taze kan örneği kullanılarak, Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran eritrosit antijenleri mikropate ve jel test yöntemi ile fenotiplendirilmiştir. Yapılan tüp antiserumu sulandırması ile ilgili deney sonuçları tartışılmıştır. Bu çalışmada ayrıca, 74 kan örneğinde elde edilen Lewis, Kell, Kidd, Duffy, Lutheran fenotiplerine rastlanma sıklığı kaynaklarda belirtilen rastlanma sıklıkları ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

SUMMARY

Blood group antigens are used in Forensic Serology for identification and individualization of the blood and the body fluids and also paternity testing.

The classical hemagglutination methods such as tube and slide methods are used to demonstrate erythrocyte antigens. These classic methods are insufficient to demonstrate some weak antigens. Some new microtyping methods such as microplate and gel test methods are preferred because of their some advantages.

Materials of this study are composed of 74 fresh blood samples taken from donors. In this study, Lewis, Kell, Kidd, Duffy and Lutheran antigens are phenotyped by using microplate and gel test methods. Tube antiseras are also studied to evaluate to convenient dilutions for microplate methods.

Obtained results showed that 1/2 diluted tube antiseras with SF convenient for microplate methods to detect all weak antigens except Lewis antigens.

The revealed phenotypic frequencies of Lewis, Kell, Kidd, Duffy and Lutheran antigens are compared with the literatures.

KAYNAKLAR

- 1- Advani H, Zamor J, Judd WJ, Johnson CL, Marsh WL: Inactivation of Kell Blood Group Antigens by 2-aminoethylisothiuronium Bromide. *British J Haemat* 51:107-115,1982.
- 2- Algora M, Barbolla L, Contreras M: Naturally Occuring Anti-D, Anti-K, Anti-Fy^a, and anti-Le^{ab}. *Vox Sang* 61:141,1991.
- 3- Arndt P, Garraty G: Evaluation of the Optimal Incubation Temperature for Detecting Certain IgG Antibodies with Potential Clinical Significance. *Transfusion* 28: 210-213,1988.
- 4- Basler G: Determination of the Lewis Blood Group Substances in Stains of Forensically Relevant Body Fluids. *Forensic Sci Int* 30:29-35,1986.
- 5- Bowley AR, Dorald W, Gordon I, Pirie B, Ross DW: Microplate Reader for Blood Grouping. *Med Lab Sci* 45:19-27,1988.
- 6- Cooper ES, Ryden SE, Schmidt PJ, Walker RH: CAP Comprehensive Blood Bank Survey-1985. *Arch Pathol Lab Med* 111:899-903,1987.
- 7- Crawford MN, Gottman CA: Microplate System for Routine Use in Blood Bank Laboratories. *Transfusion* 10:258-263,1970.
- 8- Çekin N: Mikroplate Yöntemi ile Kan Gruplarının Saptanması.Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1994.
- 9- Dodd BE, London PJ: Blood Group Topics. Edward-Arnold Ltd, London, 1975, p:65-90.
- 10- Donald M, Marcus MD: The ABO and Lewis Blood Group Systems. *New Engl J Med* 280:994-1006,1969.
- 11- Erbaş O, Işık E, Acar Y, Acar N, Soydinç J, Onaran L: Kan Gruplarının Saptanmasında Yeni Bir Yöntem: Jel Sentrifigasyon Testi. *Ank Hst Tıp Bül* 26: 147-150,1991.
- 12- François A, Sansonetti N, Mollicone R, Le Pendu J, Galton J, Jaulmes B, Oriol R: Heterogeneity of Lewis Antibodies. A Comparison of the Reaction of Human and

- Animal Reagent with Synthetic Oligosaccharides. *Vox Sang* 50:227-234,1986.
- 13- Fred H, Allen JR: Null Types of the Human Erythrocyte Blood Groups. *A.J.C.P.* 66:467-474,1976.
- 14- Gaensslen RE: Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. US Government Printing Office, Washington, 1984, p:329-387.
- 15- Gaensslen RE, Lee HC, Pagliaro EM, Bremser JK, Carroll-Reho J: Evaluation of Antisera for Bloodstain Grouping:II.Ss, Kell, Duffy, Kidd and Gm/Km. *J Forensic Sci* 30:655-676,1985.
- 16- Geitvik GA, Hoyheim B, Gedde-Dahl T, Grzeschik KH, Lothe R, Tomter H, Olaisen B: The Kidd (JK) Blood Group Locus Assigned to Chromosome 18 by Close Linkage to a DNA-RFLP. *Hum Genet* 77:205-209,1987.
- 17- Greendyke RM, Corner JC: Introduction to Blood Banking. Medical Examination Publishing Company, New York,1970, p:75-84.
- 18- Grindon AJ, Eska PL: Error Rate, Precision, and Accuracy in Immunohematology. *Transfusion* 17:425-430,1977.
- 19- Grollman EF, Kobato A, Ginsburg V: An Enzymatic Basis for Lewis Blood Types in Man. *J Clin Invest* 48:1489-1494,1969.
- 20- Grunbaum BW: Handbook for Forensic Individualization of Human Bloodstains. Sartorius GmbH, Göttingen,1981, p:147-176.
- 21- Hanfland P, Kordowicz M, Peter-Katalinic J, Prannschidt G, Crawford RJ, Graham A, Egge H: Immunochemistry of the Lewis Blood Group System: Isolation and Structure of Lewis-c Active and Related Glycosphingolipids from the Plasma of Blood Group O(Lea-b-) Nonsecretors. *Arc Biochem and Biophy* 246:655- 672,1986.
- 22- Hedley GP, Doughty RW, Gilins AK: Microplate Blood Grouping with Computer-Controlled Reading and Data Interpretation. *Med Lab Sci* 43:199-200,1986.
- 23- Hein HO, Sorenson H, Suadicani P, Gyntelberg F: The Lewis Blood Group -a New Genetic Marker of Ischaemic Heart Disease. *J Int Med* 232:481-487,1992.
- 24- Hitzler W, Schöming-Brecker H, Mathias D: Gel Centrifugation Test-A New Micro

- Method for Blood Group Typing and Antibody Screening. *Artzl Lab* 35:89-92,1989.
- 25- Holburn AM: The UK National External Quality Assessment Scheme in Blood Group Serology. ABO and D Grouping and Antibody Screening 1982-1983. *Clin Lab Haemat* 8:243-256,1986.
 - 26- Issit PD, Obarski G, Hartnett RL, Wren MR, Prewitt PL: Temporary Suspension of Kidd system Antigen Expression Accompanied by Transient Production of anti-Jk3. *Transfusion* 30:46-50,1990.
 - 27- Kimura H, Matsuzawa S: Lewis Blood Group Determination in Bloodstains by Planimetric Measurement of Eluted Monoclonal Antibodies. *J Forensic Sci* 36:999-1009,1988.
 - 28- Kotowski TM: Typing of Urine in the ABO and Lewis Systems. *J Forensic Sci* 32:1065-1068,1987.
 - 29- Langkilde NC, Wolf H, Orntoft TF: Lewis Antigen Expression in Benign and Malignant Tissues from RBC Le(a-b-) Cancer Patient. *British J Haem* 79: 493-499,1991.
 - 30- Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, Drat C: The Gel Test: A New Way to Detect Red Cell Antigen-Antibody Reactions. *Transfusion* 30: 109-113,1990.
 - 31- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Wintrobe's Clinical Hematology. Lea and Febiger, Philadelphia, 1993, p:620-629.
 - 32- Lee S, Zambas ED, Marsh WL, Redman CM: Molecular Cloning and Primary Structure of Kell Blood Group Protein. *Proc Natl Acad Sci* 88:6353-6357,1991.
 - 33- Lee S, Zambas ED, Marsh WL and Redman CM: The Human Kell Blood Group Gene Maps to Chromosome 7q33 and Its Expression is Restricted to Erythroid Cells. *Blood* 81:2804-2809,1993.
 - 34- Marsh WL: Scoring of Hemagglutination Reactions. *Transfusion* 12:352-353,1972.
 - 35- Marsh WL, Nichols ME, Oyen R, Thayer RS, Decere WL, Freed PJ, Schemelter SE: Naturally Occurring Anti-Kell Stimulated by E. coli enterocolitis in a 20-Day-Old

- Child. *Transfusion* 28:210-213,1988.
- 36- Marsh WL, Redman CM: The Kell Blood Group System: A Review. *Transfusion* 30:158-167,1990.
- 37- Marsh WL, Redman CM: Recent Developments in the Kell Blood Group System. *Transfusion* 1:4-20,1987.
- 38- Marsh WL, Redman CM, Kessler CA, Dinapoli J, Scarborough AL, Philips AG, Mody KM: K23 A-Low Incidence Antigen in the Kell Blood Group System Identified by Biochemical Characterization. *Transfusion* 27:36-40,1987.
- 39- Marsh WL, Redman CM, Scarborough AL, Johnson CL, Rabin BI, Overbeeke M: Biochemical Studies of McLeod Phenotype Red Cells and Isolation of Kx Antigen. *British J Haem* 68:131-136,1988.
- 40- Masouredis SP, Sudora E, Mahan L, Victoria EJ: Quantitative Immunoferritin Microscopy of Fy^a, Fy^b, Jk^a, U and Di^b Antigen Site Numbers on Human Red Cells. *Blood* 56:969-977,1980.
- 41- Merry AH, Gardner B, Parsons SF, Anstee DJ: Estimation of the Number of Binding Sites for a Murine Monoclonal Anti-Lu^b on Human Erythrocytes. *Vox Sang* 53: 57-60,1987.
- 42- Moniri M: Gm/Km Typing of Bloodstains in U-Bottom Microtiter Plates. *J Forensic Sci* 35:181-185,1990.
- 43- Moore S, Woodrow CF, McClelland DBL: Isolation of Membrane Components Associated with Human Red Cell Antigens Rh(D), (c), (E) and Fy^a. *Nature* 295: 529-531,1982.
- 44- Mudd JL: A Microplate Method for Reverse ABO Typing of Bloodstains. *J Forensic Sci* 31:418-425,1986.
- 45- Mudd JL, Adams DE: A Modification of the Microplate Method for Reverse ABO Typing of Bloodstains and Additional Validation Studies. *J Forensic Sci* 35: 447-451,1990.

- 46- Norman PC, Tippet P, Beal RW: An Lu(a-b-) Phenotype Caused by X-Linked Recessive Gene. *Vox Sang* 45:349-358,1983.
- 47- Okubo Y, Yamaguchi H, Nagao N, Tomita T, Seno T, Tanaka M: Heterogeneity of Phenotype Jk(a-b-) Found in Japanese. *Transfusion* 26:237-239,1986.
- 48- Oreskovic RT, Dumaswala UJ, Greenwalt TJ: Expression of Blood Group Antigens on Red Cell Microvesicles. *Transfusion* 32:848-849,1992.
- 49- Oriol R, Pendu IL, Mollicone R: Genetics of ABO, H, Lewis, X and Related Antigens. *Vox Sang* 51:161-171,1986.
- 50- Orntoft TF, Holmes EH, Johnson P, Hakamori SI, Clausen H: Differential Tissue Expression of Lewis Blood Group Antigens: Enzymatic, Immunohistologic, and Immunochemical Evidence for Lewis a and b Antigen Expression in Le(a-b-) Individuals. *Blood* 77:1389-1396,1991.
- 51- Parsons SF, Mallinson G, Judson PA, Anstee DS, Tanner MSA, Daniels GL: Evidence That the Lu^b Blood Group Antigen is Located on the Red Cell Membrane Glycoproteins of 87 and 78 kd. *Transfusion* 27:61-63,1987.
- 52- Pendu JL, Lemiux RU, Dalix AM, Lambert F, Oriol R. Competition Between ABO and Le Gene Specified Enzymes. *Vox Sang* 45:349-358,1983.
- 53- Plapp PV: New Techniques for Compatibility Testing. *Arc Pathol Lab Med* 113: 262-269,1989.
- 54- Pour PM, Tempero MM, Takasaki H, Uchida E, Takiyama Y, Burnett DA, Steplewski Z: Expression of Blood Group-Related Antigens ABH, Lewis A, Lewis B, Lewis X, Lewis Y, and CA 19-9 in Pancreatic Cells in Comparison with the Patient's Blood Group Type. *Cancer Research* 48:5422-5426,1988.
- 55- Race RR, Sanger RS: Blood Group in Man. 6.th ed. Blackwell Scientific Publication, London, 1975; p:261- 369.
- 56- Redman CM, Avellino G, Pfeffer SR, Mukherje TK, Nickols M, Rubinstein P, Marsh WL: Kell Blood Group Antigens are Part a 93000 Dalton Red Cell Membrane Protein. *J Biol Chem* 261:9521-9525,1986.

- 57- Redman CM, Marsh WL, Mueller KA, Avellino G, Johnson CL: Isolation of Kell-Active Protein from the Red Cell Membrane. *Transfusion* 24:176-178,1987.
- 58- Redman CU, Lee S, Huinink TB, Rabin BI, Johnson CL, Oyenn R, Marsh W: Comparison of Human and Chimpanzee Kell Blood Group Systems. *Transfusion* 29:486-490,1989.
- 59- Salaçin S: Kan Gruplarının Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması Üzerine Bir Çalışma. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 1980.
- 60- Sallander S, Pegert S: A Semiautomated Method for Erythrocyte Antigen Typing on Microtitration Plates. *Vox Sang* 63:215-219,1992.
- 61- Severns ML, Schoepper SL, Cozart MJ, Friedman LL, Schanfield MS: Automated Determination of ABO/Rh in Microplates. *Vox Sang* 47:293-303,1984.
- 62- Sallee PJ, Metzger DA, Storolow MD: Attempts to Determine the Lewis Phenotype of Dried Bloodstains. *J Forensic Sci* 29:75-79,1984.
- 63- Soyza K, Garland DG: Studies and Observations on Lewis Grouping of Body Fluids and Stains. *Forensic Sci Int* 38:129-137,1988.
- 64- Stroup M: ABO Typing Using Monoclonal Technology, Ortho Educational Series, New Jersey, 1991, p:5-21.
- 65- Takatori T, Tutsbuchu Y, Terazawa K: Lewis Typing of Human Bloodstains by Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) Using Monoclonal Anti-Le^a and Anti-Le^b. *J Forensic Sci* 32:900-905,1987.
- 66- Takatori T, Tutsbuchu Y, Terezawa K, Nagao M, Akabame H, Miami H: Lewis Typing of Human Saliva Stains by Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) Using Monoclonal Anti-Le^a and Anti-Le^b Antibodies. *Forensic Sci Int* 47: 261-268,1990.
- 67- Telen MJ, Green AM: Human Red Cell Antigens V. Expression of In(Lu)-Related p80 Antigens by Recessive Type Lu(a-b-) Red Cells. *Transfusion* 28:430-434,1988.
- 68- Telen MJ, Green AM, Young T: Serological and Biochemical Characterization of Monoclonal Antibodies Against Red Cell Markers Related to Expression of Lutheran

- Blood Group Antigens. *Rev Franc Trans* 421-428,1988.
- 69- Telen MJ, Palker TJ, Haynes BF: Human Erythrocytes Antigens: II.The In(Lu) Gene Regulates Expression of on Antigen on an 80-Kilodalton Protein. *Blood* 64: 599-606,1984.
 - 70- Voak D, Napier CAF, Boulton FE,Conn R, Finney RD, Fraser ID, Wagstaff W, Waters AH, Wood JK: Guidelines for Microplate Techniques in Liquid-Phase Blood Grouping and Antibody Screening. *Clin Lab Haemat* 12:437-460,1990.
 - 71- Walker RH, Hoppe PA, Judd WJ, Ness P, Polesky HF, Rolih SD, Snyder EL, Vengelen-Tyler V, Ward M: Technical Manual 10.th Ed. American Association of Blood Banks, Arlington, 1990, p:173-238.
 - 72- Watkins WM: Biochemistry and Genetics of ABO, Lewis and P Blood Group Systems. *Adv Hum Genet* 10:1-136,1980.
 - 73- Watkins WM: Monoclonal Antibodies as Tools in Gene Studies on Carbonhydrate Blood Group Antigens. *Biochimie* 17:259-276,1990.
 - 74- Watkins WM, Greenwell P, Yates AD, Johnson PH: Regulation of Expression of Carbonhydrate Blood Group Antigens. *Biochimie* 70:1597-1611,1988.
 - 75- Wegmann TG, Simithies O: A Simple Hemagglutination System Requiring Small Amounts of Red Cell and Antibodies. *Transfusion* 8:67-73,1966.
 - 76- Wegmann TG, Simithies O: Improvement of the Microtiter Hemagglutination Method. *Transfusion* 8:47,1968.
 - 77- Who:Glycosphingolipids with Lewis Blood Group Activity: Uptake by Human Erythrocytes. *Science* 164:553-555,1969.
 - 78- Wimer BM, Marsh WL, Taswel HF, Galey WR: Haemetological Changes Associated with The McLeod Phenotype of the Kell Blood Group System. *British J Haemat* 36:219-224,1977.
 - 79- Winkler MM, Beattie KM, Cisco SL, Sigmund KE, Johnson CL, Rabin BI, Marsh WL: The K_{mod} Blood Phenotype in a Healhty Individual. *Transfusion* 29: 642-645,1989.

BİO. AYŞE ALTUN'UN ÖZGEÇMİŞİ

1969 yılında İçel'in Anamur ilçesinde doğdum. 1975-1980 yılları arasında ilkokulu Anamur'a bağlı Emirşah Köyü İlkokulu'nda; ortaokulu, 1980-1983 yılları arasında Anamur Ortaokulu'nda okudum. 1983-1986 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Koleji'nde hemşirelik eğitimimi tamamlayarak, aynı Üniversiteye bağlı Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'nde hemşirelik görevine başladım. 1987-1991'de Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde okudum ve bu bölümden mezun oldum.

1991-1992 eğitim yılında Ç.Ü. Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nın açmış olduğu Adli Seroloji Master Programına katıldım. Master program çerçevesi içinde 1991-1992'de Ç.Ü. Yabancı Diller Eğitim Merkezi'nde (YADEM) İngilizce eğitimini, 1992-1993'te master derslerini tamamlayarak, 1993-1995'de "Adli Amaçlarla Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran Eritrosit Antijenlerinin Microtyping (Mikro Tiplendirme) Yöntemlerle Fenotiplendirmesi" başlıklı tezimi hazırladım. 11 Ocak 1995'de tez savunmamı yaptım. İngilizce biliyorum. Halen Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Göğüs, Kalp ve Damar Cerrahisi Servisinde hemşire olarak görev yapmaktayım.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**