

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ADLİ TIP ANABİLİM DALI

MİKROPLATE YÖNTEMİ İLE
KAN GRUPLARININ SAPTANMASI

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç.Dr. SERPİL SALAÇIN

Dr. NECMİ ÇEKİN

- UZMANLIK TEZİ

ADANA/1994

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Giriş	1
Genel Bilgiler	3
ABO Sistemi	
Antijenleri	4
Antikorları	18
Aglutinasyon Yöntemi	21
Mikroplate Yöntemi	21
Materyal ve Metod	24
Malzemelerin Hazırlanması	24
Kullanılan Malzeme ve Aletler	27
Deney	29
Bulgular	32
Sonuç	42
Tartışma	44
Özet	49
İngilizce Özet	50
Kaynaklar	51

GİRİŞ

İçinde bulunduğumuz yüzyılın ikinci yarısında teknolojinin hızlı gelişimi ile birlikte yeni bilgilerin ortaya konması, kan gruplarının kullanım alanını yaygınlaştırmıştır.

Populasyonlara göre önemli değişiklikler gösteren sıklıklar ve ırksal farklılıkların (ayrışma veya yaklaşma) ortaya konması, antropolojide yeni araştırma alanları meydana getirmiştir(30,41,79).

İkinci dünya savaşı ve sonrasında; total kan veya kan ürünlerinin tedavide kullanımı, immünizasyon, serodiagnostik testlerin prenatal tanıda kullanımı, doku ve organ greftlerinde doku tiplendirilmesi, otoimmün orjinli hastalıkların tanımlanması sonucu yoğunlaştırılan araştırma alanları ile, tedavi ve profilaksi yöntemlerinin geliştirildiği bilinmektedir(2,16,26,41).

Kan grupları ile ilgili çalışmalarda, kalıtsal kan hastalıklarının (Sickle cell, hemoglobinopatiler, vb.) tanımlanması ile moleküler genetik, insan genetiğinin ana bilim dallarından biri olmuştur(41).

Kan ve kan ürünleri, Adli Bilimlerde de; paternitenin saptanması, lekelerin ve biyolojik artıkların kimliklendirilmesinde çok önemli bir yer tutmaktadır.

Kan grupları ile ilgili çalışmalar, hukuk sistemini yönlendirecek nitelikte olumlu katkılar sağlayabilmektedir. Bir suçun araştırılmasında; olay yerinde, giysilerde veya suç aletleri üzerindeki kan veya lekelerinin, mağdur veya suçluya ait olup olmadığının saptanması, birden fazla suçlunun söz konusu olduğu durumlarda herbirinin kimliklendirilmesinde yardımcı olabilmektedir(43). Bununla birlikte günümüzde kan

gruplarının Adli Bilimlerde en sık kullanım alanının paternite tayini olduğu gör÷lmektedir(16,19,28,37,43).

÷lkemizde kan gruplarının Adli Tıp Bilimi uygulama alanına girişı oldukça yenidir. Henüz birkaç büyük ilimiz dışında, Adli amaçlı kan gruplarının ortaya konmasına yönelik çalışmaların yapılmadığı bilinmektedir(5,46,47,67,68,69).

Adli Serolojide; kan grup ve subgrupları ile polimorfik enzim sistemlerinin kullanımını takiben 1985'de Jeffrey tarafından ortaya konan DNA Fingerprint ve izleyen yıllarda yeni tekniklerin geliştirilmesi, bu alanda çok önemli ve hızlı adımların atılmasına yol açmıştır (35,53). Ancak genotipik özelliklerin DNA analizi ile ayırd edilmesi öncesinde, ana kan grupları ve subgruplarının o toplumda rastlanma sıklığının da saptanması gerekmektedir. Yazılı kaynaklar incelendiğinde; Türkiye genelinde ve yöremizde ana kan grupları ve subgrupları sıklığı ile ilgili sağlıklı veri tabanının bulunmadığı gör÷lmektedir.

Bu amaçla yöremizdeki ana kan gruplarına ve subgruplara rastlanma sıklığını saptamak amacıyla projeler başlatılması planlanmıştır. Ana kan grupları ve subgrupların saptanmasında kullanılan yöntemler gözden geçirilerek genel bilgiler bölümünde aktarılacak nedenlerden, microplate yöntemi ile aglutinasyon reaksiyonlarına dayanan yöntemin oturtulması planlanmıştır. Bu çalışma sözü edilen bir seri projenin ön basamağını oluşturmaktadır.

GENEL BİLGİLER

1901 yılında Landsteiner'in kendine Nobel ödülü kazandıran ABO kan gruplarını tanımlaması, bu alandaki en önemli basamaktır. 1908'de Ottenberg ve Epstein, kan gruplarının kalıtım yoluyla yeni kuşaklara aktarıldığını belirtmiş, 1910'da Von Dungen ve Hirsfeld kalıtımın Mendel kurallarına göre olduğunu göstermiş, 1924'de matematikçi Bernstein'in verileri ile kalıtsal geçiş kesinlik kazanmıştır(2,51,54).

Levin ve Stetson'un 1939'da, Landsteiner ve Wiener'in 1940'da, Rh gruplarını ve bu grupların yenidoğanın hemolitik hastalığındaki rollerini bulmaları; bu konudaki ikinci önemli basamağı oluşturmuştur(51).

1950'li yıllar ve 1960'ların ilk yıllarında Morgan, Watkins, Kabat ve meslektaşları; ABH ve Lewis kan grup sistemlerinin kimyasal yapıları üzerine geniş çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar, ABH ve Lewis antijenik yapılarının spesifik özelliklerinin ve karbonhidrat zincir dizilimlerinin ortaya konmasını sağlamıştır. Diğer taraftan bu çalışmalarda; bağlantılı iki antijenin öncül madde ve son ürün ilişkileri ortaya konmuştur. Karbonhidrat yapısını belirleyen gen ürününün de glikosiltransferazlar olduğu bulunmuştur. Bu kavram, sonradan Ginsburg, Watkins ve meslektaşları tarafından enzimatik çalışmalar ile kesinlik kazanmıştır(73). 1980'li yıllarda DNA analiz yöntemlerinin gelişmesine paralel olarak ABO kan gruplarının ve varyantlarının DNA dizilimi ve aralarındaki farklılıklar da ortaya konmuştur(73,74,75,76,77).

ABO kan grupları keşfinden sonra birçok kan grup sistemi ve alt grupları keşfedilmiştir. Major kan grup sistemleri(ABO, Rh, Lewis, MNSs, Duffy, Kidd, Kell,

Lutheran) yanısıra; yalnızca mongoloid insanlara karakteristik gibi gözüken Diego sistemi, sex geçişli xg sistemi, insanların büyük kısmında bulunabilen çok sayıda genel antijenler(Vel, Yt^a, Sm,...), tek veya birkaç ailede saptanmış özel antijenler(Levay, Wr^a, Be^a, By,...) tanımlanmış ve listeler halinde verilmiştir(20,51,60,65).

ABO KAN GRUPLARI

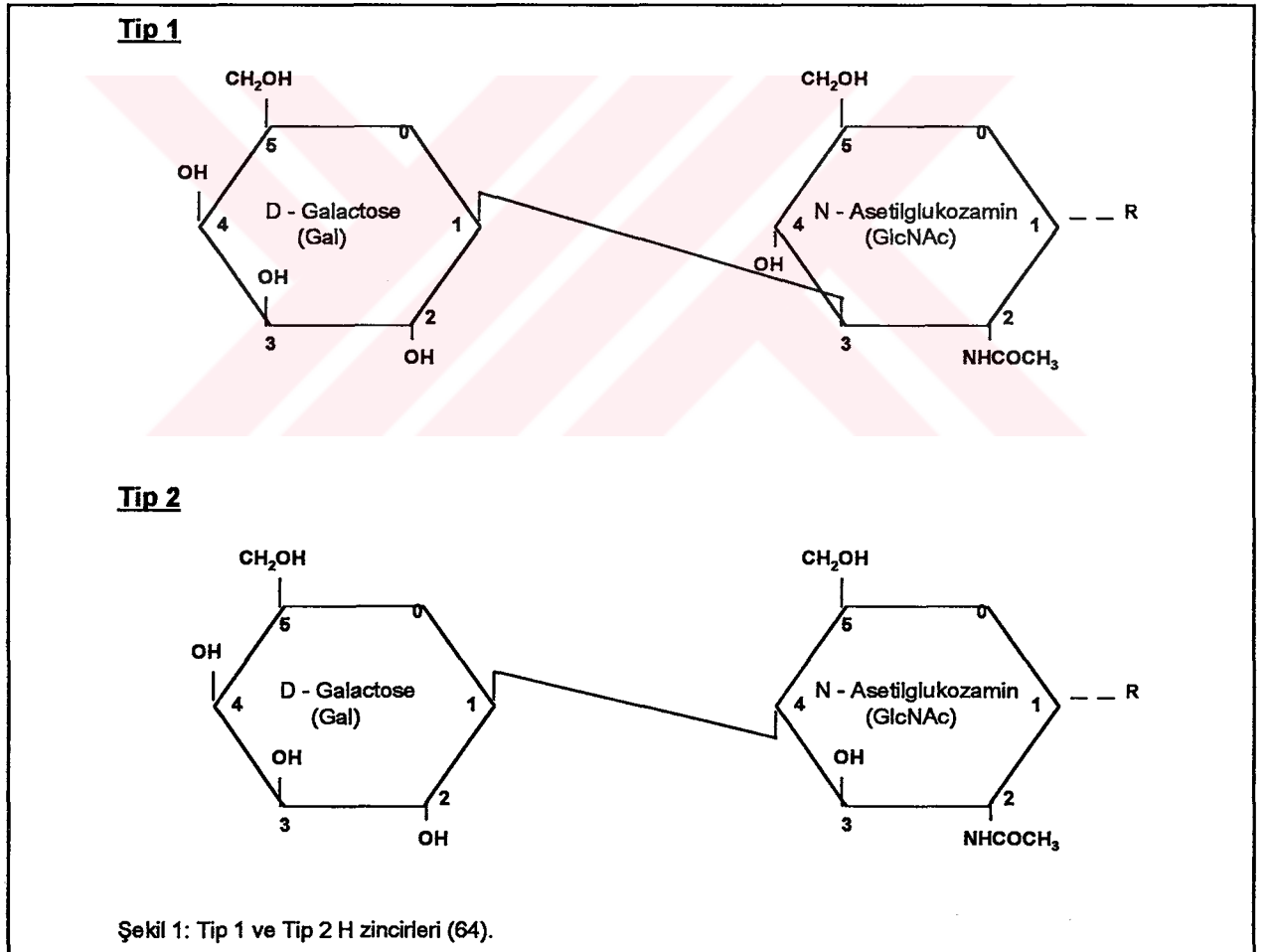
ABO KAN GRUBU ANTİJENLERİ:

1901 yılında Landsteiner, insanları eritrositlerindeki antijenik özelliklerine göre dört gruba ayırmıştır. Bunlarda eritrositlerinde A antijeni (aglutinojen) bulunduranlara A, B antijeni bulunduranlara B, her iki antijeni de bulunduranlara AB ve her ikisinden de yoksun olanlara O grubu adını vermiştir(2,10,16,20,26,51).

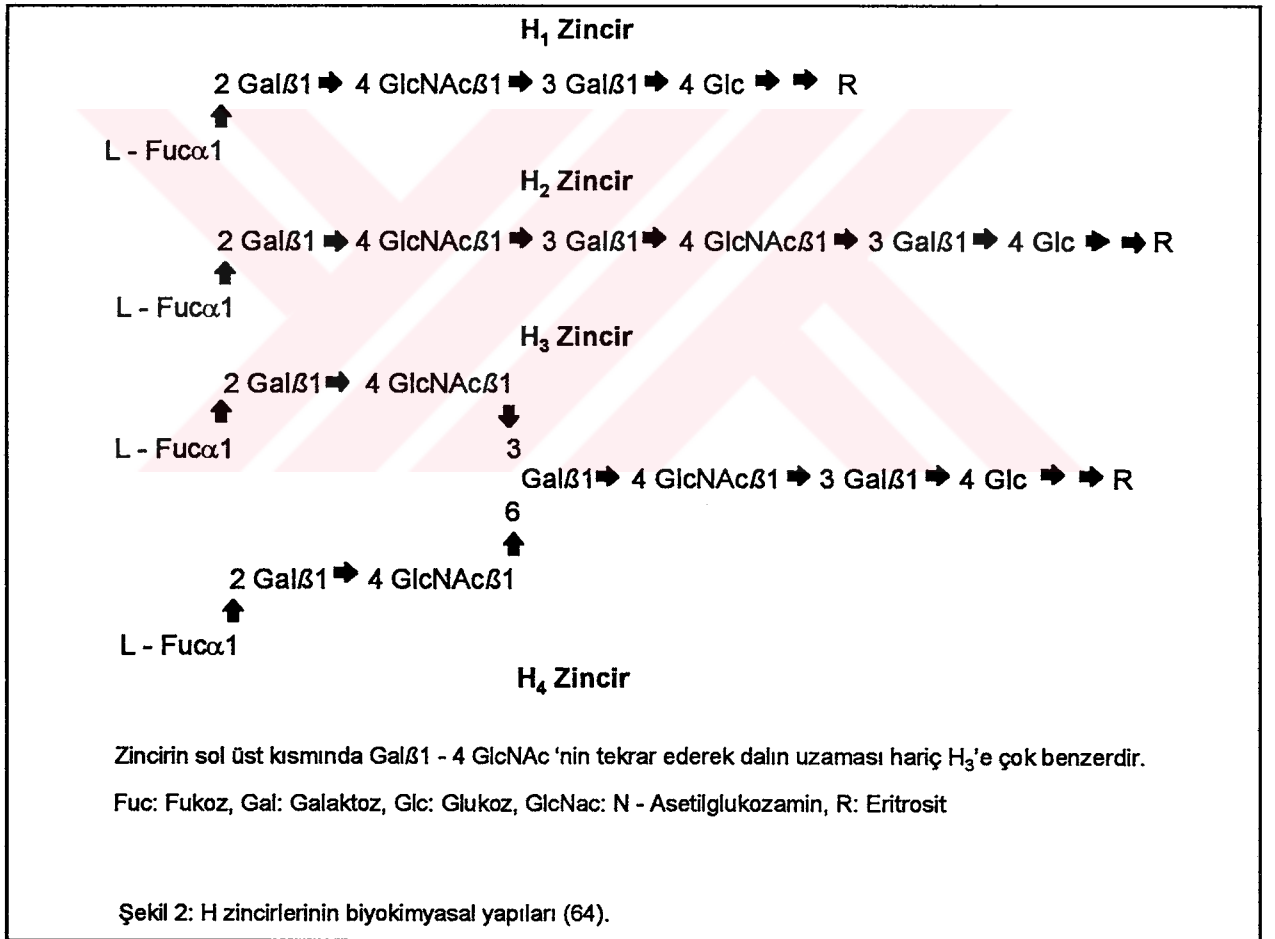
ABO kan grupları 9 nolu kromozomda 3 allel gen şeklinde bulunmakta ve Mendel kanunlarına göre kalıtılmaktadır(69,62). A, B ve O genleri 354 amino asitten oluşmaktadır. A ve B genleri arasındaki farkın 7 nükleotid yer değişikliği sonucu oluşan 4 amino asit farklılığı olduğu, O allellerin ise; N-terminal uca yakın tek baz delesyonu ile karakterize olduğu belirtilmektedir(64,73,74,75).

Eritrositlerin A, B veya H özgünlüğü hücrelerin gelişimi sırasında genetik olarak kontrol edilen enzimlerin aktivitesi ile oluşmaktadır. A,B ve H genlerinin ürünleri glikosiltransferaz olarak adlandırılan enzimlerdir. Glikosiltransferazlar hücre membranını değiştirerek A ve B antijenlerinin sentezine yol açarlar(60,62,64).

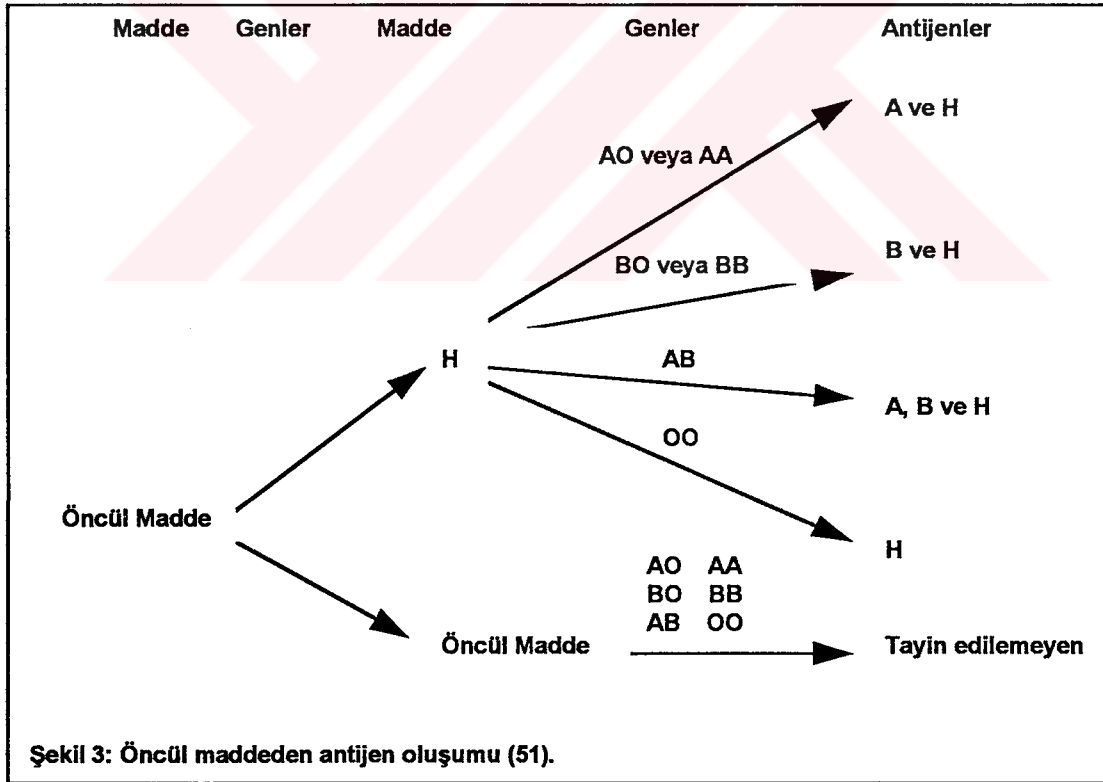
Öncül madde, membran glikosfingolipid ve glikoproteinleri ile ilgili bir oligosakkariddir. Eritrositler ve sekretör antijenlerin öncül maddesi, iki tiptir. Bu öncül maddelerin kimyasal özellikleri şekil 1'de gösterilmiştir. Tip 1 ve tip 2 olarak adlandırılan iki zincir arasındaki temel fark; terminal galaktoz ve subterminal N-asetilglukozamin arasındaki bağlantı nedeniyledir. Tip 1 zincirinde bağlantı N-asetilglukozaminin 3.karbonuydur (1 $\rightarrow$ 3). Tip 2 zincirinde bağlantı aynı şekerin 4. karbonuyla (1 $\rightarrow$ 4) yapılmaktadır(60,64).

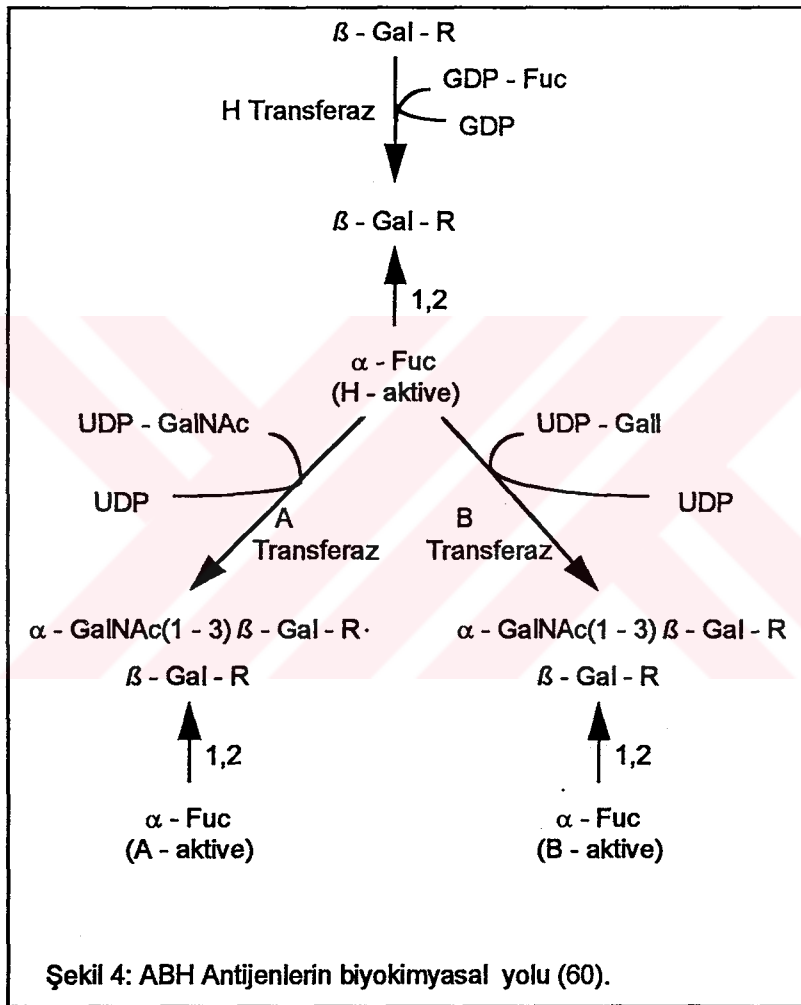


Eritrosit ABH antijenleri genelde tip 2 öncül maddesinden oluşurlar. Sekresyonlar ise, tip 1 ve tip 2 'nin her ikisini içermektedir(60,64,73). Eritrositlerde tip 1 zincirleri bulunduğu zaman, plazmadan alınmış olduğu belirtilmektedir(64). Hakomori, öncül maddeleri 4 gruba ayırmıştır; H1 ve H2 'nin her ikisi de düzdür, ancak H2 daha uzundur. H3 ve H4 ise dallanmış zincirlerdir, ancak H4 daha komplekstir(29,64,73). Şekil 2 'de görülen ve zincirin eritrosite girdiği yer arasındaki yapı; düz bir zincir olabilir, diğerlerinden biraz daha uzun veya değişen oranlarda dallara ayrılmış olabilir.

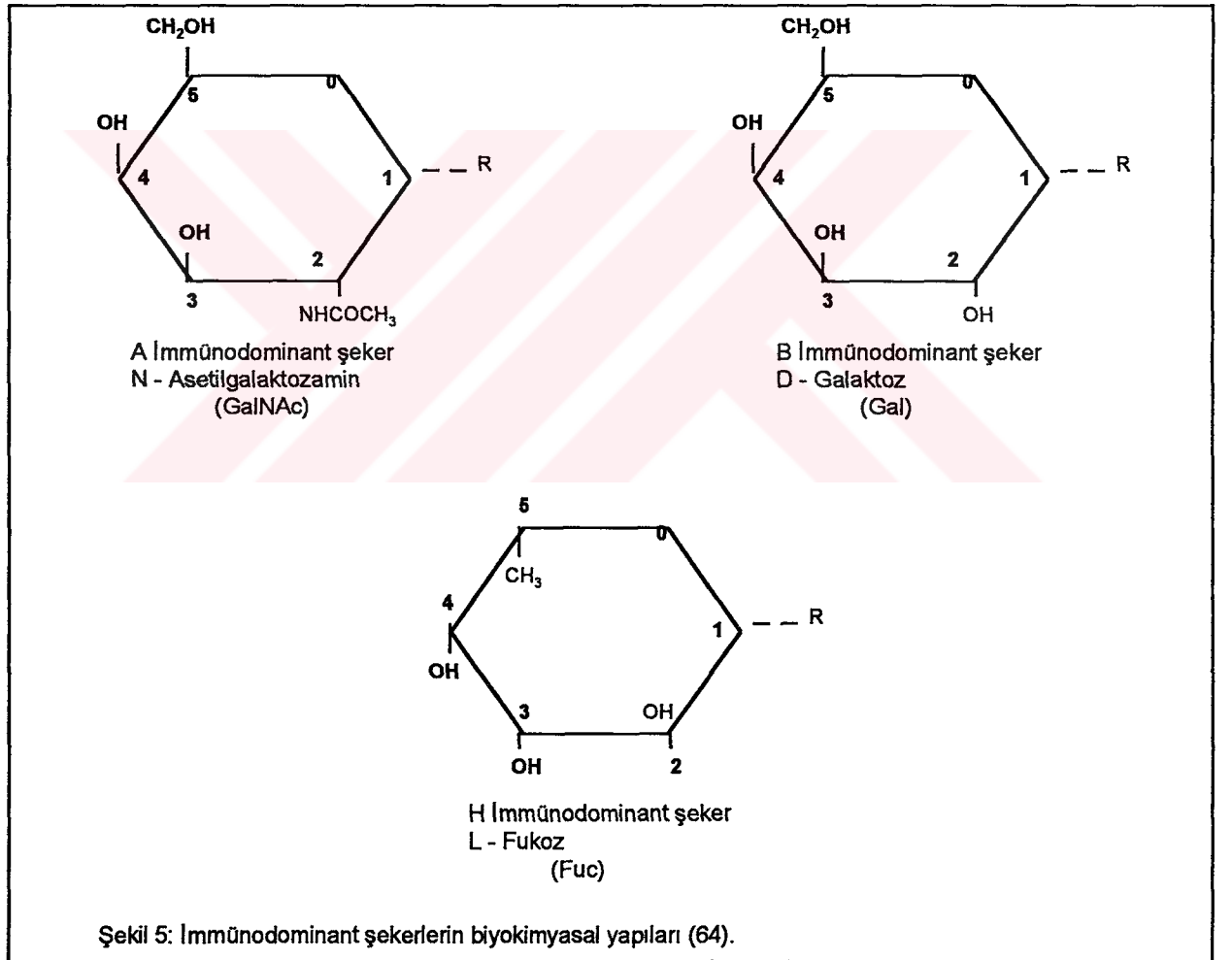


H ve h allellerinin ürünü olan H transferaz, öncül maddeyi H maddesine dönüştürür. H maddesi A ve B antijenlerinin öncül maddesidir. A veya B allelinin varlığı ise, A veya B transferaz oluşumunu sağlar(29,60,62,73). H transferaz (alfa 2-L-fukosiltransferaz), tip 1 veya tip 2 öncül maddenin terminal galaktozuna bir fukoz ekleyerek H maddesini oluşturur. A transferaz (alfa 3-N asetilgalaktozamin transferaz), tip 1 veya tip 2 H maddesinin terminal galaktozuna N-asetil galaktozamin ilave ederek A antijenini, B transferaz ise (alfa 3-D-galaktoziltransferaz) aynı pozisyona bir galaktoz ekleyerek B antijenini oluşturur. Şekil 3'de öncül maddeden antijen oluşumu şematize edilmektedir. Şekil 4, antijen oluşumunun biyokimyasal yolunu göstermektedir.

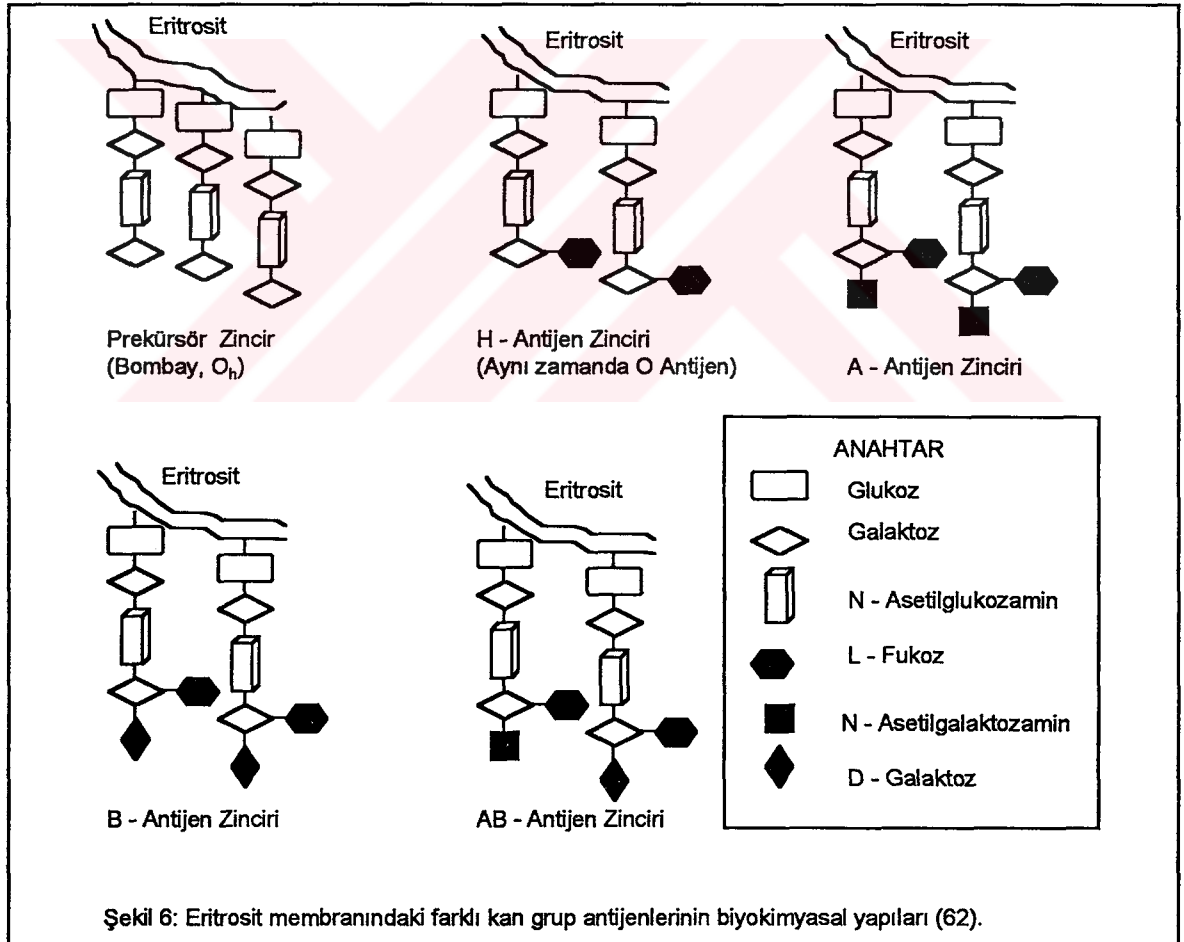




ABO sistem antijenleri; D-galaktoz, L-fukoz, N-asetilgalaktozamin ve N-asetilglukozaminden oluşan oligosakkaridlerdir. İmmunodominant şekerler, genellikle antijenik determinant olarak adlandırılırlar. A antijenik determinantın immunodominant şekeri N-asetilgalaktozamin ve B'ninki ise D-galaktozamindir. Şekilde görüldüğü gibi A ve B'nin immünodominant şekerleri 2. karbon noktasında farklılık göstermektedirler(64). Şekil 5, immünodominant şekerlerin kimyasal yapısını göstermektedir.



A ve B antijenleri eritrosit hücre membranının, diğer vücut sıvılarının ve özellikle de epitelial hücre membranlarının integral parçalarını oluşturan kimyasal yapılardır(29,64). A, B, AB veya O olarak eritrositlerin serolojik tanımlamaları bu monosakkaridlerin özel dizilimlerine bağlıdır. Spesifiklik sadece herbir kan grubunun tek immunodominant şeker özelliğine değil, aynı zamanda dizilim ve immunodominant şekerin bağlanacağı terminal şekerlerin bağlantısına da bağlıdır. A ve B grup eritrositler arasındaki major fark, bu iki şeker molekülü arasındaki yapısal farklılığın sonucudur(60,62,64). Şekil 6, ABO antijenlerinin biyokimyasal yapısını göstermektedir.



A ve B antijenleri eritrosit membran yüzeyinde yerleşmiştir. Grup A hücreler yaklaşık 800.000 - 1.200.000 uç sayısına sahiptir. B grup hücreler yaklaşık 600.000 - 800.000 B antijenik uca, AB hücreler 400.000 - 600.000 AB antijenik uca sahiptir. O grup eritrositler yaklaşık 1.700.000 H uca sahiptir(60).

ABO sistemi antijenlerinin erken intrauterin hayatta geliştiği ve 37 günlük fetüste gösterildiği belirtilmektedir(20,51). Doğumdan sonra A ve B gruplarının antijenik gücünün arttığı, yaklaşık 3 yaşındaki antijenik gücün yaşam boyunca stabil kaldığı belirtilmektedir(51). Tablo 1, Yenidoğan döneminden erişkin döneme doğru eritrosit yüzeyinde var olan antijenik uç sayısındaki artışları göstermektedir(26,51).

<u>Erişkinlerde Antijenik uç sayısı</u>		<u>Yenidoğanda antijenik uç sayısı</u>	
A ₁ (Erişkin)	810.000-1.170.000	A ₁	kord 250.000-370.000
A ₁ B(Erişkin)	460.000-850.000	A ₁ B	kord 220.000
A ₂ (Erişkin)	240.000-290.000	A ₂	kord 140.000

Tablo 1: Yenidoğan döneminden erişkin döneme doğru eritrosit yüzeyindeki antijenik uç sayısındaki artışı göstermektedir.

Yeni doğanlarda transferaz düzeyleri yetişkinler kadar yüksektir. Ancak antijen yoğunluğu sınırlıdır. Çünkü eritrositlerin H zincirleri daha kısadır ve büyük kısmı dallanmamıştır. Bu koşullar altında, A₁ transferaz, sınırlı sayıda A şekerleri bağlayabilir. Yaşamın ilk birkaç haftası içinde dallanma başlar ve erişkin mature eritrositlerine geliştiğinde yaygın dallanma meydana gelir(29,64).

A grubunun çok sayıda varyantı ($A_1, A_2, A_3, A_4, A_5, A_x, A_m, A_0, A_{el}, \dots$) bilinmektedir(2,20,23,26,51,60). Bu antijenler varyant A allellerinin düzenlediği varyant transferazların etkisiyle oluşmaktadır(60). Bunların çoğuna nadir olarak rastlanmaktadır. En yaygın bulunan ve A grubunu gösteren A_1 ; diğerlerine dominant olup kuvvetli bir antijendir. A_1 , A grubu bireylerin %80'inde, A_2 %20'sinde bulunurken; zayıf grup A varyantları ($A_3, A_x, A_m, A_{end}, A_{el}, A_y$ ve diğerleri) A grup fenotipinin %1'inden daha azını oluşturmaktadır. Bu varyantlarda antijenik uç sayısı azalmaktadır. Varyantlar karşılaştırıldığında; A_2 , 200.000 - 300.000 antijenik uç taşıırken, A_3 yalnızca 30.000, diğerleri daha da az antijenik uca sahiptir(60).

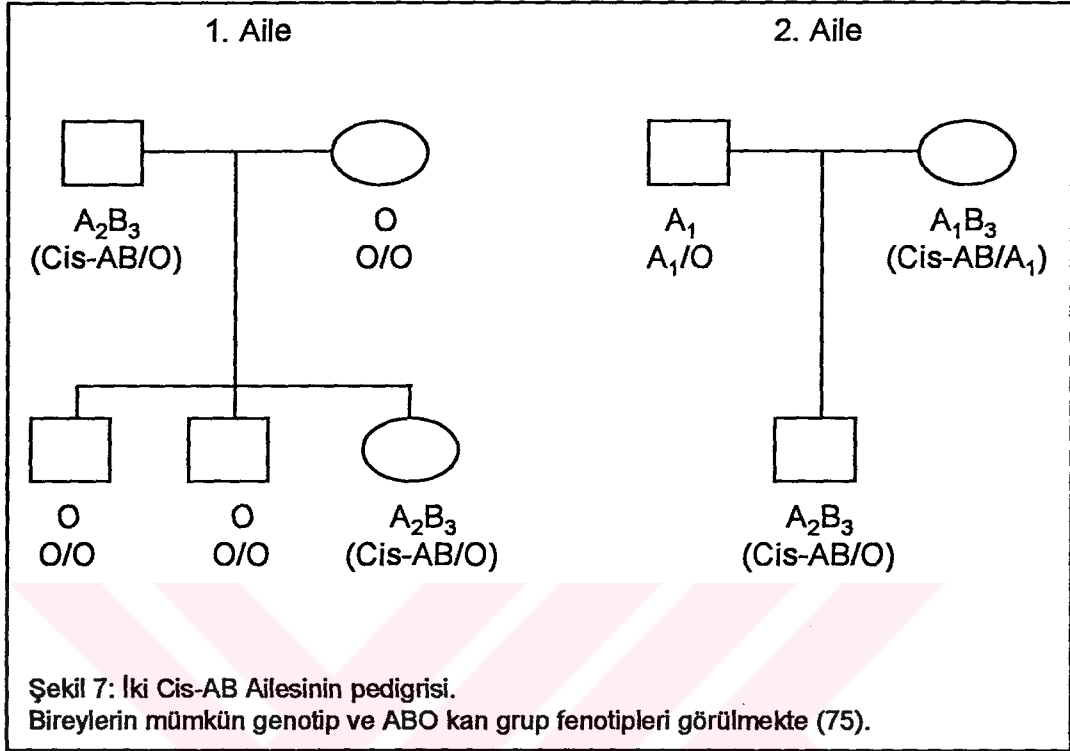
Yapılan çalışmalarda, subgruplar arasındaki nükleotid dizi farklılıkları da ortaya konmuştur(74,75,76,77). A_3 allellerinin A_1 den farkının; 871. nükleotidde (Guanin → Adenin) tek baz yer değişikliği olduğu belirtilmektedir. Bu da 291. amino asitde (aspartik asid → asparajin) yer değişikliğiyle sonuçlanmaktadır. B_3 allellerinin B_1 den farkının; 1054. nükleotidde (Sitozin → Timin) tek baz yer değişikliği nedeniyle 352. amino asitde (arginine → triptofan) bir yer değişikliği olduğu saptanmıştır(74). A_x 'de, 646. nükleotidde (Timin → Adenin) yer değişikliği sonucu; 216. amino asitde (fenilalanin → isoleucine) yer değişikliği olduğu belirtilmektedir(76). Diğer taraftan, mutasyonların A ve B transferaz enzim aktivitelerini belirgin olarak azalttığı kabul edilmektedir(77).

A_1 ve A_2 genli bireyler kinetik özellikleri farklı N-acetylgalaktosaminyl transferaza sahiptir. A_1 enzim aktivitesinin A_2 transferazdan 5-10 kez daha güçlü olduğu belirtilmektedir(60,64,78). A_2 transferazın kendi şekerini düz zincirlere ilave ettiği, dallı

zincirlere ilave edemiyor gibi görüldüğü veya, A_2 transferaz için uygun substratın bazı dallı zincirlerde olmayabileceği ileri sürülmektedir(64). A subgrupların serolojisine katkıda bulunan bir diğer faktör, B geninin baskılayıcı etkisidir. Tüm A subgrupları, B ile eşleştikleri zaman, O grubu ile eşleştiklerine oranla daha zayıf bir hale gelmektedir (64). A_2 'nin önemi zayıf antijen olması nedeniyle yanlış O olarak tiplendirilebilmesidir. A_2B grup bireylerde A_2 , B antijenin varlığı nedeniyle ileri derecede zayıflatılmaktadır(20,23,51,60,78). A_2 'nin zayıf antijenik yapısı ve B'nin baskılayıcı etkisi nedeniyle yanlış tiplendirmelere ve babalık tayinlerinde hatalı reddetmelere yol açabileceğinin altı çizilmelidir.

Benzer olarak B antijenlerinin de varyantlarının bulunduğu, B antijeninin daha az değişken olduğu ve varyantlarının ($B_1, B_2, B_3, B_x, B_w, B_m...$) daha az olduğu belirtilmektedir(9,16,20,41,51).

AB kan gruplu bireylerde A ve B allellerinin her ikisi bulunmaktadır, her iki transferaz aktiftir, ve aynı glikosfingolipid molekülü üzerinde A ve B antijenik yapı varolmaktadır. Nadir AB allelleri; aynı kromozom üzerinde A ve B allellerinin kalıtıldığı "cis-AB" fenotipinden sorumludur. Normalde A ifade edilmektedir, B zayıftır ve H maddesi bu eritrositlerde fazla miktardadır. A ve B transferaz aktivitesi ile 2 ayrı enzim bulunurken, bazı ailelerde bir tek enzim N-asetilgalaktozamin ve galaktozun her ikisini ilave etme yeteneğine sahiptir. Bu küçük klinik öneme sahip olan bilgi adli amaçla kimliklendirme ve paternite çalışmalarında önemli olabilmektedir (49,60,75). Şekil 7'de 2 Cis-AB aile pedigrisi sunulmaktadır.



Bombay fenotipi nadir olarak görülmektedir. Bu bireylerin eritrositleri ve sekresyonları; A, B veya H antijeni göstermez. Böyle bir durumda; A ve/veya B alleli bulunmasına rağmen, A ve B antijenlerinin bulunmadığı ve bu kişilerin serumunda anti-A, anti-B ve anti-H antikorlarının bulunduğu gösterilmiştir(2,16,26,41,54). Bu kişiler fenotip olarak O gruptur. Genelde O_h olarak ve onların ABO genotipine bağlı olarak O_h^A , O_h^B , O_h^{AB} olarak tanımlanmaktadırlar. Bombay fenotip h allel(h/h) homozigotluğu ile ilgilidir. H transferaz olmadığından öncül madde, sekresyon ve eritrositlerde değişmeden kalmaktadır. A ve B transferazlar bulunmasına rağmen, öncül madde H maddesine

dönüşemediğinden A ve B antijenleri yapılamaz. Böyle şahısların çocukları diğer ebeveynnden bir H geni aldığıında, A veya B antijenini normal olarak gösterebilir. Böylece O grup olarak görünen bir O_h birey A veya B çocuk sahibi olabilir(20,23,51,60,62). Paternite çalışmalarında yanlış fenotipleme, ilk basamakta ABO sistemi ile hatalı reddetmeye yol açabilir. Bunu önlemek için; yalnızca A ve B antijenik yapısı aranmayıp, Bombay fenotipi atlamamak için mutlaka H antijeni de aranmalıdır.

A, B ve H antijenileri; genital, respiratuar, gastrointestinal sistemin müköz glandları ve sekresyonlarında yaygın olarak dağılmıştır. Kan grup antijenleri sadece eritrositler ve tükürük sıvısında değil; bazı epitelyal hücreler santral sinir sistemi ve bağ dokusu dışındaki tüm doku ve vücut sekresyonlarında ayırd edilmiştir(51,60). Benzer yapılar tükürükte ve vücut sıvılarında eriyebilir antijenler olarak bulunurlar. ABO kan grup maddeleri kişilerin yaklaşık %78 inde vücut sıvılarının çoğunda solubl olarak bulunmaktadır. Böyle insanlar sekretör olarak tanımlanmaktadır. Sekretör durum Mendel kurallarına bağlı dominant Se geni (Se/Se veya Se/se) kontrolündedir. Homozigot se/se geni taşıyanlar ise non-sekretördürler(2,16,20,26,41,51). Sekretör sistem bir kan grup sistemi değildir. Sekresyonlarda antijenlerin varlığı, Se ve se allellerinin bir çifti ile tayin edilmektedir. Dominant Se alleli, belirli gland ve sekresyonlarda H transferaz varlığını düzenler. Nonsekretörlerin (se/se) plazma ve eritrositlerinin özgünlüğü, ABO ve H genleri kontrolü ile oluşmaktadır. Fakat tükürük ve diğer doku sıvıları, H transferaz içermediğinden A, B veya H maddesi yoktur. Öncül madde değişmeden kalmaktadır. Tüm sekretörler sekresyonlarında H antijenine sahiptir. Sekretörler arasında (Se/Se veya Se/se),

sekresyonlardaki A, B ve H substanslarının konsantrasyonu ABO tip tarafından etkilenmektedir. A veya B substanslarını salgılamayan O grup kişiler, A ve B grup kişilerden daha fazla H sekrete ederler(60). Tablo 2, eritrosit ve sekretör fenotipin genotipik ilişkisini göstermektedir.

<u>Genotip Kombinasyonu</u>	<i>Antijenler</i>					
	<i>Eritrositlerde</i>			<i>Sekresyonlarda</i>		
	<u>ABH</u>	<u>Le^a</u>	<u>Le^b</u>	<u>ABH</u>	<u>Le^a</u>	<u>Le^b</u>
ABO,H-,Se-,Le-	+	-	+	+	+	+
ABO,H-,sese,Le-	+	+	-	-	+	-
ABO,H-,Se-,lele	+	-	-	+	-	-
ABO,H-,sese,lele	+	-	-	-	-	-
*ABO,hh,Se_ veya sese,Le_	-	+	-	-	+	-
*ABO,hh;Se_ veya sese,lele	-	-	-	-	-	-

Tablo 2: Eritrosit ve sekretör fenotipin genotipik ilişkisi. (*Bombay fenotipler)(23)

A,B ve H substansların insan vücudu dışında doğada da yaygın olarak dağıldığı, birçok hayvan, bitki ve bakteride bulunduğu belirtilmektedir. Örneğin; bakteriel polisakkaritlerde ve belirli bitkilerin polenlerinde bulunurlar(20,51).

Hastalıklar ile kan grup sistemleri arasında ilişki olduğu saptanmıştır. A grubu kişilerde; safra taşları, siroz, tükürük bezi, pankreas ve over tümörlerine, O grubu kişilerde ise, duodenal ülser daha çok rastlandığı belirtilmektedir(41). Anne ile fetüs arasındaki ABO uyumsuzluklarına bağlı prezigotik seleksiyon, fertilizasyonun engellenmesi veya fetal ölüm meydana gelebilmektedir(2).

Bazı malign hastalıklarda eritrosit fenotiplerinde değişiklikler görülmektedir. Örneğin lösemide A_1 antijeni suprese olur veya tamamen kaybolabilir. Bu değişiklik sadece eritrositlere kısıtlıdır ve A_1 antijeni azalırken H antijeninin arttığı görülür. Yine malign hastalıklarda ve enfeksiyonlarda B'ye benzer antijenlerin ortaya çıktığı gözlenmiştir(3,26,41,51). Lösemi veya lenfomalı hastalar değişen düzeylerde transferaz düzeyine sahiptir. Lösemili hastaların A antijenlerini kaybetmeleri, transferaz düzeylerinin değişmesi ile açıklanabilir. Bu hastalık koşullarında A ve/veya B transferazları azaltılmaktadır(64).

Koşullar, değişik şekillerde transferaz aktivite düzeyini değiştirebilir. Hamilelikte A ve/veya B enzimleri çok düşük olabilir ve aynı zamanda H transferaz bir dereceye kadar azaltılır. Özellikle neoplastik hastalıklar ve hamilelik koşullarında, antijenlerin zayıf karakter göstermeleri veya fenotipin ifadesinde değişiklikler; Adli serolojide sonuçların değerlendirilmesinde gözönünde bulundurulmalı.

ABO KAN GRUBU ANTİKORLARI

Eritrosit yüzeyinde hangi antijen varsa, serumda onunla reaksiyon vermeyen diğer antikor bulunmaktadır. ABO sistem antikorlarının çoğu natürelidir. Natürel antikorlar genellikle ağır moleküllü olup (900.000) IgM tipindedir. IgM antikorları pentavalan ve 1000° (10 nm) uzunluğunda olduğundan zeta potansiyelini aşarak iki eritrosit arasında daha kolay köprü yaparlar(16). IgM antikoruna iki değerli, tam aglutinasyon yapan, presipitasyon yapan antikor denir(2,16,26). Serum fizyolojikte süspansiyonu yapılmış eritrositleri aglutine edebildikleri için eskiden beri komplet antikor olarak bilinmektedir(2). Bu antikor ısıya oldukça hassastır. En kuvvetli reaksiyonu 4-20 °C'da (Soğuk aglutinin) verirler(2,16).

Yetişkinlerde tahminen bitki ve bakteriyel antijenlerin stimülasyonu ile doğal olarak oluşan IgM anti-A ve/veya anti-B bulunduğu belirtilmektedir. İnfan serumu yetişkindeki IgM seviyesinin %10'unu içerir. IgM biyosentezinin doğumun birkaç günü içinde başladığı, antikorların çoğu kişide 3-6 ay civarında geliştiği ve yıllarla titresinin giderek arttığı belirtilmektedir(23). ABO antikorları, infantın immün sistem gelişimi gibi doğum ve 6 ay arasında gelişir. Bu antikorlar intravasküler sirkülasyonun içinde natürel olarak oluşmaktadır. Onların intravasküler hemoliz ve komploment aktivasyonu yeteneğinde IgM immünglobulinler olduğu belirtilmektedir(62). IgM antikorlar, plasentayı geçemediklerinden yenidoğanda hemolitik hastalık meydana getiremezler(2,16). O grup annelerde, anti-A ve anti-B spesifitesi ile maternal IgG bulunabildiği ve yenidoğanın hemolitik hastalığına yol açabildiği belirtilmektedir(41). Bu antikorların

konsantrasyonunda bir artış, transfüzyon veya fetomaternal hemoraji veya benzer kimyasal maddelere maruz kalmayla stimüle edilebilmektedir. Bu şekilde immün olarak oluşan anti-A ve anti-B, özellikle O grup bireylerde IgM den çok IgG dir(41).

Aşağıda sunulan tablolarda Türkiye ve Kıbrıs'da yaşayanlar ile Türkiye'ye göçeden Türklerin kan grup dağılımları verilmiştir.

1- O Rh(+)	451.190	% 29.98
2- O Rh(-)	65.125	% 4.32
3- A Rh(+)	542.136	% 36
4- A Rh(-)	68.788	% 4.57
5- B Rh(+)	210.615	% 13.99
6- B Rh(-)	33.879	% 2.25
7- AB Rh(+)	116.134	% 7.71
8- AB Rh(-)	17.129	% 1.13

Tablo 3: 1989-1992 yıllarında Kızılay kan merkezlerinde değerlendirilen toplam 1.504.966 adet kanın gruplara göre dağılımı.

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>O</u>	<u>AB</u>	<u>Toplam</u>
Bulgaristan	610 % 39.97	257 % 16.84	543 % 35.58	116 % 7.60	1526
Romanya	79 % 36.74	44 % 20.46	60 % 27.90	32 % 14.88	215
Yugoslavya	1821 % 42.81	726 % 17.07	1424 % 33.48	282 % 6.63	4253
Yunanistan	348 % 48.19	87 % 12.04	247 % 34.21	40 % 5.54	722

Tablo 4: Çeşitli Ülkelerden Türkiye'ye Göç eden Türklerin Kan grupları dağılımı(13).

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>O</u>	<u>AB</u>	<u>Muayene edilen</u>
Türk(1953-1958)	46.26	15.66	31.25	8.81	2.304
Türk(1971-1978)	44.22	13.80	32.45	6.08	-
Rum(1953-1958)	46.36	12.25	35.36	6.05	73.63

Tablo 5: Kıbrıs Türk ve Rum toplumlarının kan grupları dağılımı(4).

Kan Grubu	<u>Negatif(%)</u>	<u>Pozitif(%)</u>	<u>Toplam(%)</u>
A	3.46	35.74	39.20
B	1.61	15.43	17.04
AB	0.61	4.94	5.55
0	4.58	33.63	38.21

Tablo 6: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kan Merkezi verilerine göre kan grup dağılım sıklığı (n:43557) (36).

Kan Grubu	<u>Negatif(%)</u>	<u>Pozitif(%)</u>	<u>Toplam(%)</u>
A	5.5	31.5	37
B	1	13.5	14.5
AB	0.5	6	6.5
0	4	38	42

Tablo 7: ÇÜTF. Adli Tıp ABD'da yapılan çalışmada saptanan kan grup yüzdeleri (n:200).

	<u>O</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>AB</u>
Beyaz-Newyork	45.6	36.4	13.5	4.5
Zenci-Newyork	44.2	30.3	21.8	3.7
Sioux yerlileri-S.Dakota	91.0	7.0	2.0	0.0
Pekin-Çin	30.7	25.1	34.2	10.0
İngiliz-Londra	44.4	42.8	9.6	3.2
Galler	47.9	32.8	16.2	3.1
Okinawa-Japonya	63.9	17.3	13.6	4.9
Alman-Berlin	40.0	39.5	15.1	5.4
Filipinler	41.6	23.1	30.3	5.0
İtalyanlar	46.7	40.8	8.9	3.6

Tablo 8: Farklı popülasyonlardaki kan grup dağılımı(37).

TAZE KANDA KAN GRUPLARININ SAPTANMASINDA KULLANILAN, AGLUTİNASYON YÖNTEMİ

Eritrositler üzerinde hangi antijenin bulunduğunu ortaya koymak için; eritrositlerin anti serumlar ile karşılaştırılması ve aglutinasyon meydana gelip gelmediğine dayanarak tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu amaç için; önceden hazırlanmış üzerinde spesifik antikorun bulunduğu kartlar veya eritrosit ve antiserumu biraraya getirmekte farklı ortamlar(lam, tüp, mikropate,...) kullanılabilir(9,21,22,26,32,39,40,43).

AGLUTİNASYONDA MİKROPLATE YÖNTEMİ

Küçük miktardaki antijenleri incelemek için uygun bir hemaglutinasyon sistemi araştırılırken geliştirilen mikropate yöntemi, tüplerde yapılan standart tekniklere kıyasla hassaslığını kaybetmeksizin önemli oranda düzenden, ayıraçtan ve zamandan ekonomi sağlamanın yanı sıra; fotograflanabilmesi nedeniyle tekrar istendiğinde kullanılmak üzere saklanabilmekte ve mahkemelere delil olarak sunulabilmektedir. Bu özellikleri nedeni ile Adli Serolojide kullanım üstünlüğüne sahip olduğu bildirilmektedir(43).

Günümüzde birçok merkezde araştırma ve rutin çalışmalarda kullanılan mikropate formatı, ilk olarak 1962 yılında Sever tarafından viral serolojik incelemelerde kullanılmıştır(7,15,50). Sever'in çalışmasının kan gruplama alanına adaptasyonu, 1966 ve 1968 yılında Wegman ve Smithies tarafından yapılmıştır(71,72). Ardından gelen yayınlar (Tablo 9), U ve V kuyulu mikropatelerde; ayıraçların geniş bir hacim ve konsantrasyon dizisinde kullanılabileceğini göstererek sistemin çok yönlülüğünü desteklediler (3,7,43,48,50,59,70).

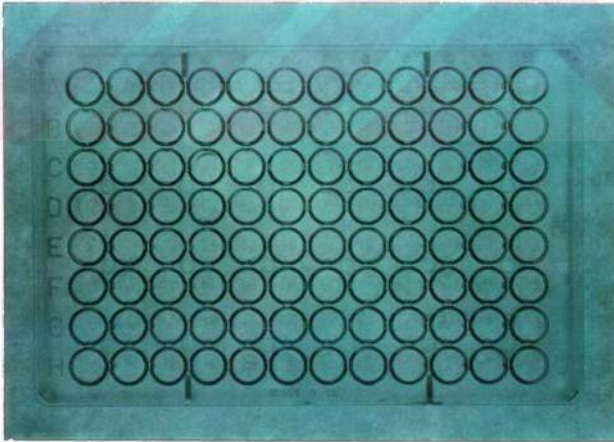
<u>Araştırmacılar</u>	<u>Teknik</u>
Wegmann ve Smithies,1966	ABO, Rh
McCloskey ve Zmijewski,1967	Ab titresi, IAT
Crawford ve arkadaşları,1970	ABO, Rh, Ab tarama
Parker ve arkadaşları,1978	ABO, Rh, D ^u , Ab tarama
Warlow ve Tills,1978	ABO, Rh
Depew ve arkadaşları,1978	ABO, Rh, Ab tarama ve ID

Tablo 9: Yıllara göre bildirilen Mikroplate aglutinasyon tekniklerini göstermektedir(50).

1982 yılında Innocenti ve Nieri, mikroplate test sonuçlarını spektrofotometre ile okumuşlardır. İzleyen yıllarda, birçok araştırmacı yoğun emek sarfını azaltmak için fotometrik okumaya dayalı yarı otomatik sistemler geliştirmişlerdir(1,11,38,55). Daha sonraları bilgisayar sistemlerinin devreye girmesiyle aglutinasyon sonuçlarını okuyan ve onları kan gruplarına yorumlayan tam otomasyon sistemleri kurulmuştur (10,31,57,58,59,66). Hızla geliştiği gözlenen mikroplate sisteminde bu gelişmenin devam edeceği belirtilmektedir.

Bu prosedürlerin temelinin her reaksiyonun bir tüpte yer aldığı geleneksel kan gruplamadaki birçok test tüpü yerine bir plate kullanımı olduğu belirtilmektedir(43). Plate yaklaşık 7.5x10.5 cm. boyutlarında, üzerinde 4 mm. çapta, 10 mm. derinlikte küçük kuyular basılmış bir plastik dörtgendir. Kuyular 8 sıra ve 12 sütun olmak üzere toplam 96 adettir. Kullanılan plateler kuyu diplerine göre U, V ve düz tipli olmak üzere üç tiptir.

Düz diplerin ELISA teknolojisi için kullanışlı olduğu ve sıvı faz kan teknolojisi için uygun olmadığı belirtilmektedir. Tuz, enzim ve antiglobulin serolojik testlerinin U ve V kuyulu platelerde yapılabildiği ifade edilmektedir. U kuyulu plateler, okuma öncesi resüpsansiyonun kolay olması nedeniyle V kuyulu platelere tercih edilmektedir(7,70). Kuyuların tanımlamasını sağlamak üzere plate kenarına sayılar ve harfler basılmıştır. Her kuyuda bir reaksiyon oluştuğu için bir kezde bir plate üzerinde 96 ayrı reaksiyon oluşturulabilmektedir (7,12,43,50). Resim 1'de U dipli bir plate gösterilmektedir.



Resim 1.

MATERYAL VE METOD

Çalışma öncesi, gönüllü kan vericilerini bilgilendiren ve rızalarının alındığını gösteren form örnekleri hazırlandı. Bu formlar Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun görüşüne sunulurak onayları alındı. Form 1'de Rıza ve Bilgilendirme formu gösterilmektedir.

Reaksiyon sonuçları üzerine etkili faktörlerin saptanması için belirli parametreler sabit tutularak deneylerin tekrarlanması düşünüldüğünden, elde bulunan antiserum miktarı da gözönüne alınarak 200 gönüllü verici ile çalışılması planlandı.

Gönüllü vericilere gerekli açıklamalar yapılarak izin verdiklerine dair bilgilendirme ve rıza formları imzalatıldı.

Kan alınması: Vericilerin üst ekstremité periferik venlerinden 3 cc kan, EDTA'lı steril tüpler içerisine alındı. Her vericiye bir protokol numarası verilerek tüpler üzerine kaydedildi. Alınan kanlar bekletilmeden 10 dakika süreyle 3000 rpm'de santrifüj edilerek serumundan ayrıldı.

Eritrositlerin yıkanması: Serumunu ayrılan hücrelerin üzerine 3 cc %0.9 NaCl eklenerek tüp birkaç kez başaşağı çevrilerek karışmaları sağlandıktan sonra; 2 dakika süreyle 3000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı enjektör yardımıyla alındı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.

Eritrosit süspansiyonlarının hazırlanması: Yıkanmış hücrelerden %1, %2 ve %3'lük eritrosit süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyonlar serum fizyolojik ve 1/1'den 1/1000'e kadar değişik konsantrasyonlarda hazırlanan bromelin solüsyonları ile oluşturuldu.

990 mikrolitre serum fizyolojik veya dilüe bromelin üzerine 10 mikrolitre yıkanmış eritrosit eklenerek %1'lik eritrosit süspansiyonu, 980 mikrolitre serum fizyolojik veya dilüe bromelin üzerine 20 mikrolitre yıkanmış eritrosit eklenerek %2'lik eritrosit süspansiyonu, 970 mikrolitre serum fizyolojik veya dilüe bromelin üzerine 30 mikrolitre eritrosit eklenerek %3'lük eritrosit süspansiyonu oluşturuldu.

Bromelin dilüsyonu: Ticari olarak elde edilen hazır sıvı bromelin serum fizyolojik(SF) ile 1/1, 1/10, 1/25, 1/50, 1/70, 1/100, 1/250, 1/500, 1/750, 1/1000 oranlarında dilüe edildi.

1/1: 1000 mikrolitre sıvı bromelin

1/2: 500 mikrolitre sıvı bromelin + 500 mikrolitre SF

1/5: 200 " + 800 "

1/10: 100 " + 900 "

Bovın albuminin hazırlanması: Ticari olarak elde edilen %30'luk sıvı bovin albuminin 150 mikrolitresi üzerine 1350 mikrolitre serum fizyolojik eklenerek %3'lük konsantrasyona getirildi.

Antiserumların dilüsyonu: Antiserumlar, serum fizyolojik(SF) ve %3'lük bovin albumin(BA) kullanılarak 1/2, 1/4, 1/6, 1/8 ve 1/16 oranlarında dilüe edildi.

1/2: 20 mikrolitre antiserum + 20 mikrolitre SF veya BA.

1/4: 10 " + 30 "

1/6: 6.7 " + 33.3 "

1/8: 5 " + 35 "

1/16: 2.5 " + 37.5 "

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;

Dr.Necmi Çekin'den 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

Form 1.

KULLANILAN MALZEME VE ALETLER

Santrifüj: 5500 devir/dakika maksimum hıza çıkabilen, zaman ve devir ayar ve göstergesi bulunan Hettich Universal 30F marka santrifüj kullanıldı. Resim 2,3 ve 4'de kullanılan santrifüj gösterilmektedir.

Pipetler: Gilson, Pipetman P20 ve P200; 0-20 ve 0-200 mikrolitre ayarlanabilir hacime sahip mikropipetler ve bunlara uygun sarı plastik pipet uçları kullanıldı.

Mikroplate: Polystrene yapıda, U dipli, üzerinde 8 sıra ve 12 sütun olmak üzere 96 kuyu bulunan, kenar sıralar yanına harf ve sayılar basılmış plate kullanıldı.

Plate örtücü: Yapışabilen, parlak yüzeye sahip, emici vasfı olmayan kağıt örtücü ve sert plastikten yapılmış plate üzerine kapak şeklinde olan 2 tür örtücü kullanıldı.

Tüp: EDTA içeren 5cc'lik steril, plastik kapaklı cam tüp.

Enjektör: Yeşil uca sahip 5cc'lik steril enjektör.

Antiserumlar:

Anti-A 10 ml, Diagast (70107Q), mikroplate kullanımına uygun.

Anti-B 10 ml, Diagast (70207U), mikroplate kullanımına uygun.

Anti-AB 10 ml, Diagast (70307Y), mikroplate kullanımına uygun.

Anti-H 10 ml, Diagast (70517L), mikroplate kullanımına uygun.

Neutral AB 10 ml, Diagast (59028F), mikroplate kullanımına uygun.

Bovine Albumin: 10 ml, Immucor (LOT2G5235-1), %30'luk, koruyucu olarak %0.1 Sodyum Azide içeren hazır sıvı bovine albumin.

Bromelin: 500 ml, Diagast (69020U), mikroplate kullanımına uygun hazır sıvı bromelin.



Resim 2,3 ve 4: Kullanılan santrifüj.

DENEY

Yapılan çalışmada; kaynaklarda önerilen yöntemler çeşitli parametreleri açısından incelendi(7,12,15,43,70,72).

İşaretlenmiş microplate kuyucuklarına konan 40 mikrolitre antiserum üzerine 30 mikrolitre eritrosit süspansiyonu ilave edildi. 2 dakika orta hızda çalkalanarak karışımları sağlandı. Mikroplateler, plate örtücüsü ile kapatılarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Santrifüje microplate taşımaya uygun rotorlar takılarak plateler 30 saniye 1000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası orta şiddette 2 dakika çalkalanan plateler, 30 dakika oda sıcaklığında bırakıldıktan sonra tekrar 2 dakika çalkalandı. Çalkalama hız ve şiddeti için kontrol hücrelerin resüspansiyonu baz olarak alındı. Plate üzerinde, negatif ve pozitif sonuçlar aglutinasyon varlığına göre değerlendirildi.

Gereken hassasiyet ve en ekonomik reaksiyonun hangi şartlarda elde edilebildiğini saptamak için parametrelerden bir tanesi değiştirilerek diğerleri sabit tutuldu. Aşağıdaki deneyler 220 gönüllüden alınan kan ile yapıldı.

1- Santrifüjle çevirme süresi ve enkübasyon süreleri sabit tutularak; plate kuyucuklarına konan 40 mikrolitre antiserum üzerine, yıkanmamış eritrosit hücrelerinden serum fizyolojik ile hazırlanan %2'lik eritrosit süspansiyonundan 30 mikrolitre ilave edilerek 24 deney yapıldı. Aynı işlem yıkanmış eritrositlerden hazırlanan %2'lik eritrosit süspansiyonu ile tekrar edildi. Sonuçlar karşılaştırıldı.

2- Eritrosit süspansiyonlarını bromelin ile oluşturma reaksiyon üzerine etkisi araştırıldı. Antiserum miktarı, eritrosit süspansiyonu, santrifüj süre ve enkübasyon süreleri

sabit tutuldu. Hazır sıvı bromelin serum fizyolojik ile 1/1, 1/10, 1/25, 1/50, 1/70, 1/100, 1/250, 1/500, 1/750, 1/1000 oranlarında dilüe edildi. Yıkanmış eritrositlerden, değişik oranlarda dilüe edilmiş bromelin ile, ve bromelinsiz olarak %1, %2 ve %3'lük eritrosit süspansiyonları hazırlanarak 24 deney yapıldı.

3- Bromelin dilüsyonunun 1/100 konsantrasyon ve daha yağın olduğu durumlarda reaksiyon üzerine olumlu etki yaptığının saptanması üzerine; net etkinin görüldüğü yoğunluk araştırıldı. Hazır sıvı bromelin serum fizyolojik ile 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 oranlarında dilüe edildi. Yıkanmış eritrositlerden, farklı oranlarda hazırlanmış bromelin solüsyonları ile %2'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Serum fizyolojik ile %3'lük konsantrasyona getirilen bovin albumin ile antiserumlar 1/4 oranında dilüe edilerek 32 deney yapıldı.

4- Eritrosit süspansiyonu oluşturulmasında; 1/5 ve 1/10 dilüsyonda hazırlanan bromelin kullanımı karşılaştırıldı. Yıkanmış eritrositlerden, 1/5 ve 1/10 konsantrasyonda hazırlanan bromelin solüsyonu ile %2'lik süspansiyonlar oluşturuldu. %3 konsantrasyonda hazırlanan bovin albumin ve serum fizyolojik ile 1/6 oranında dilüe edilen antiserumlar ile 24 deney yapıldı.

5- Eritrosit süspansiyonu oluşturulmasında; 1/10 konsantrasyonda hazırlanan bromelin kullanılması üzerinde yoğunlaştırıldı. Yıkanmış eritrositlerden, 1/10 dilüsyonda hazırlanan bromelin solüsyonu ile %2'lik süspansiyonlar oluşturuldu. %3 konsantrasyonda hazırlanan bovin albumin ile, 1/4 oranında dilüe edilen antiserumlar ile 40 deney yapıldı.

6- Eritrosit süspansiyon oranlarının plate kuyu diplerindeki görünüm üzerine etkisi

ve antiserum dilüsyonunun reaksiyon üzerine etkisi araştırıldı. Yıkanmış eritrositlerden, 1/100 dilüsyonda hazırlanan bromelin solüsyonu ile %1, %2 ve %3 lük eritrosit süspansiyonları hazırlandı. Serum fizyolojik ile 1/2, 1/4 ve 1/6 konsantrasyonda dilüe edilen antiserumlar ile 40 deney yapıldı.

7- Reaksiyon üzerine olumsuz etki oluşturmayacak antiserum dilüsyon oranı araştırıldı. Serum fizyolojik ve %3 konsantrasyonda hazırlanmış bovin albumin ile 1/2, 1/4, 1/6, 1/8 ve 1/16 oranında dilüe edildi. Yıkanmış eritrositlerden, 1/100 oranda hazırlanmış bromelin solüsyonu ile %2lik eritrosit süspansiyonları oluşturularak 24 deney yapıldı.

8- Antiserumların dilüe edilmesinde; serum fizyolojik ve bovin albumin kullanılmasının etkisi ve ikisi arasında fark olup olmadığı araştırıldı. Yıkanmış eritrositlerden, 1/10 konsantrasyonda hazırlanan bromelin solüsyonu ile %2'lik süspansiyonlar oluşturuldu. %3 konsantrasyonda hazırlanan bovin albumin ve serum fizyolojik ile 1/2, 1/3 ve 1/4 oranlarında dilüe edilen antiserumlar ile 96 deney yapıldı.

9- Antiserumlar, %3 konsantrasyonda hazırlanan bovin albumin ve serum fizyolojik ile 1/4 ve 1/6 oranlarında dilüe edildi. Reaksiyon ortamındaki sıvı miktarı artırılarak resüspansiyon üzerine etkisi incelendi. Kuyulara 30 mikrolitre yerine 60 mikrolitre eritrosit süspansiyonu kondu. Miktarın artması nedeniyle %2 konsantrasyondakine eşdeğer hücre miktarını sağlamak amacıyla; 1/100 konsantrasyonda hazırlanan bromelin solüsyonu ile yıkanmış eritrositlerden %1'lik süspansiyonlar oluşturuldu. 40 deney yapıldı.

10- Santrifüj süresinin reaksiyon üzerine etkisi araştırıldı. Antiserumlar, serum

fizyolojik ile 1/4 oranında dilüe edildi. Yıkanmış eritrositlerden, 1/100 konsantrasyonda hazırlanan bromelin ile %2'lik süspansiyonlar ouşturuldu. Santrifüj çevirme süresi 1 dakika, 30 saniye, 15 saniye olarak ve santrifüj yapılmadan 24 deney yapıldı.

11- Çalışılacak kanın bekletilmesinin, reaksiyon üzerine olan etkisi araştırıldı. Alınan kanlar, oda sıcaklığı ve +4 derecede 1, 2, 3 ve 7 gün bekletildi. Bekletilen kanlar serum fizyolojik ile yıkanarak 1/100 konsantrasyonda hazırlanmış bromelin ile %2'lik eritrosit süspansiyonları hazırlandı. Antiserumlar 1/4 oranında dilüe edilerek 24 deney yapıldı.

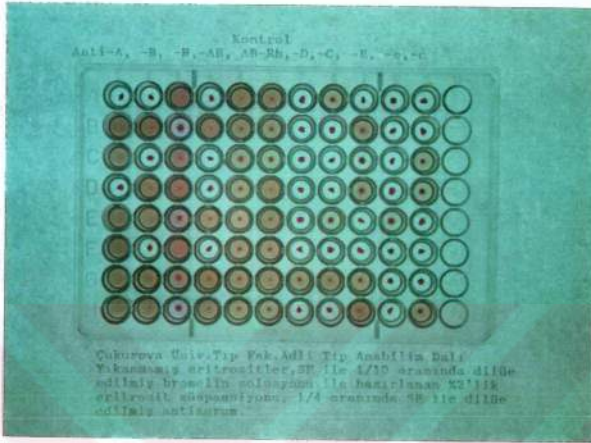
12- Reaksiyon sonuçları değerlendirilmiş plateleri bekletmenin reaksiyon üzerine etkisi araştırıldı. Yıkanmış eritrositlerden, 1/10 konsantrasyonda hazırlanan bromelin ile %2'lik süspansiyonlar oluşturuldu. Serum fizyolojik ile 1/4 oranında dilüe edilmiş antiserumlar ile 24 deney yapıldı. Reaksiyonlar değerlendirilip sonuçlar kaydedildikten sonra plateler, plate örtücüsü ile kapatılarak 1 haftaya kadarki süreler içinde bekletildi ve reaksiyonlar tekrar değerlendirildi.

BULGULAR

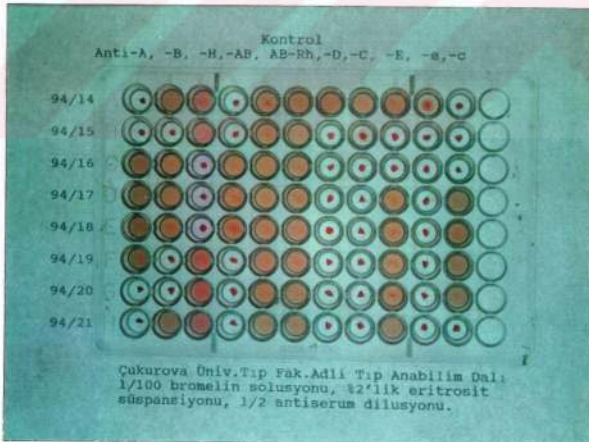
Yıkanmamış eritrosit hücrelerinden hazırlanan %2'lik eritrosit süspansiyonu ile yapılan deneylerde, reaksiyonlar değerlendirildiğinde; tüm kuyularda güçlü aglutinasyon varlığı ile negatif ve pozitif reaksiyonların ayırımında ve kontrol kuyularında resüspansiyonun sağlanmasında aşırı zorluk dikkat çekti. Resim 5.

Aynı işlem %0.9 NaCl çözeltisi ile 3 kez yıkanmış eritrositler ile yapıldığında; kan gruplamanın rahatlıkla yapılabilirdiği ve kontrol gruplarında resüspansiyonun kolaylıkla sağlandığı saptandı. Resim 6.

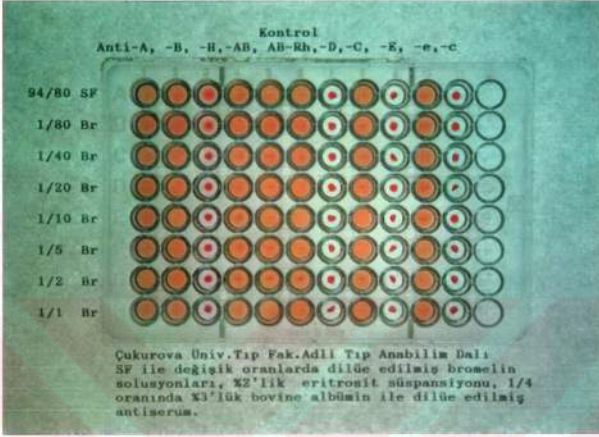
Ticari olarak elde edilen hazır sıvı bromelinin uygun konsantrasyonunu saptamak için 1/1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/70, 1/100, 1/250, 1/500, 1/750, 1/1000 oranlarında bromelin solüsyonları hazırlandı. Yıkanmış eritrositlerden, değişik oranlardaki bromelin ve serum fizyolojik ile, %2'lik eritrosit süspansiyonları hazırlanarak yapılan 300 deneyde, reaksiyonlar değerlendirildiğinde; negatif ve pozitif sonuçların rahatlıkla ayrılabilmesine rağmen bromelinsiz ve 1/250'nin üzeri dilüsyonlarda, kontrol ve negatif kuyularda resüspansiyonun geciktiği saptandı. 1/100 konsantrasyondan itibaren reaksiyonların daha net izlendiği, en net görüntü ve güçlü aglütinasyonun ise; 1/10 ve üzeri bromelin konsantrasyonunda hazırlanmış eritrosit süspansiyonlarının olduğu kuyularda alındığı saptandı. Resim 7.



Resim 5.

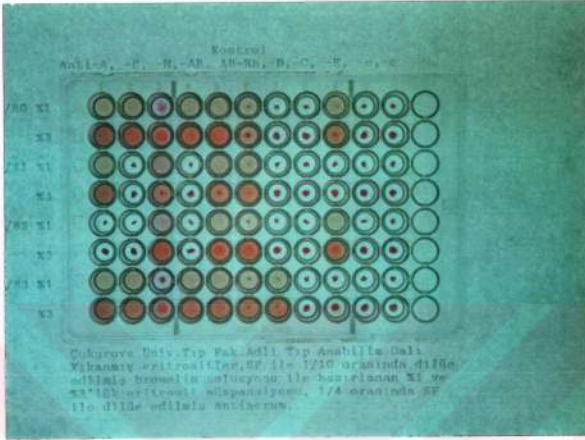


Resim 6.



Resim 7.

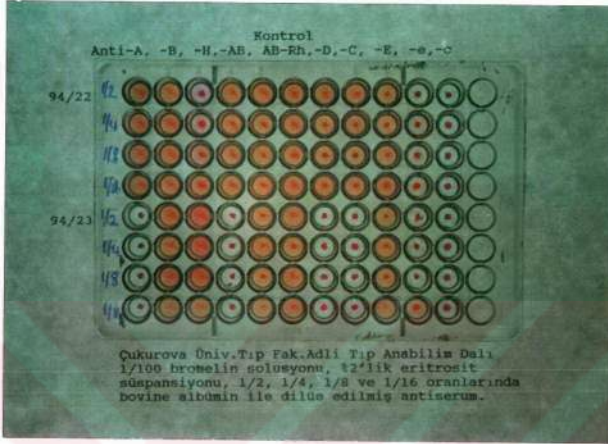
Çalışma sonuçlarının fotograflanması düşünüldüğünden, en uygun görünümün alındığı, eritrosit süspansiyon oranı araştırıldı. Değişik konsantrasyonlardaki bromelin ve serum fizyolojik ile %1, %2 ve %3 oranlarında eritrosit süspansiyonları hazırlanarak 450 deney yapıldı. %1'lik eritrosit süspansiyonu ile gerçekleşen reaksiyonda; aglutinasyon görünümünün kuyu dibi taban genişliğine kıyasla küçük kaldığı, %3'lük eritrosit süspansiyonda ise kuyu tabanını dolduran oldukça iri bir aglutinasyon olduğu, görünüm açısından ise en iyi görüntünün %2'lik eritrosit süspansiyonunda alındığı saptandı. Resim8.



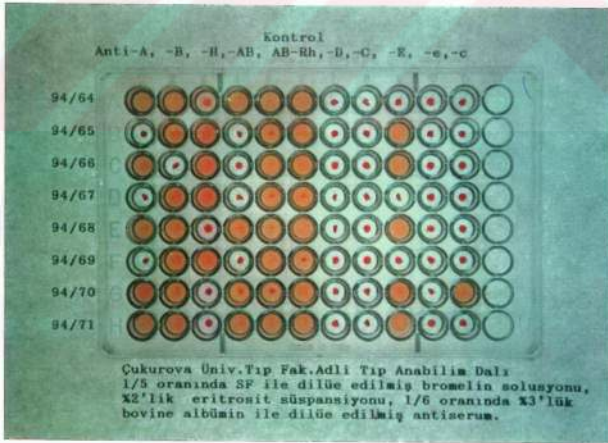
Resim 8.

Reaksiyon gücü üzerine olumsuz etki yapmayacak antiserum dilüsyonu ve dilüsyonda serum fizyolojik ve bovin albumin kullanımı arasında fark olup olmadığı araştırıldı. Serum fizyolojik ve bovin albumin ile 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranında dilüe edilen antiserumlar ile yapılan 420 deneyde, sonuçlar değerlendirildiğinde; 1/4'ten sonraki dilüsyonlarda, pozitif reaksiyonların bulunduğu kuyularda dağılmalar gözlemlendi. Resim 9,10.

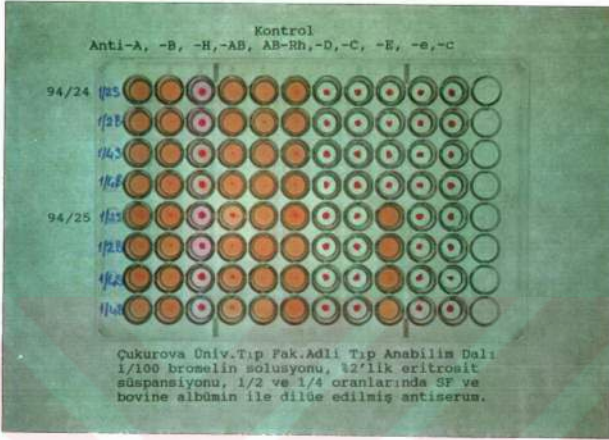
Antiserumların dilüsyonunda bovin albumin ile serum fizyolojik kullanımı arasındaki fark değerlendirildiğinde; her ikisi arasında önemli bir fark gözlemlenemedi. Resim 10,11.



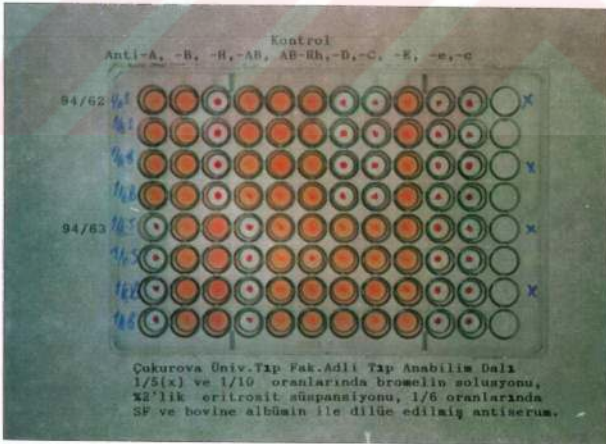
Resim 9.



Resim 10.



Resim 11.



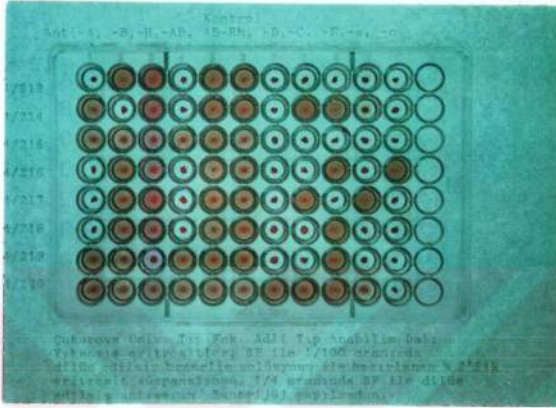
Resim 12.

Kuyu içindeki toplam hacim miktarının artırılmasının reaksiyon ve sonuçların değerlendirilmesi üzerine etkisi araştırıldı. Reaksiyon ortamındaki sıvı miktarı artırılarak kuyulara 30 mikrolitre yerine 60 mikrolitre %1'lik eritrosit süspansiyonunun bulunduğu 56 deneyde; ortam hacminin artırılmasının resüspansiyon süresinde ve/veya kolaylığında herhangi bir fark görülmedi. Resim 13.

Santrifüj sürelerinin reaksiyon üzerine etkisini ölçmek için yapılan deneylerde; santrifüj yapılmayan veya süreleri kısa tutulan (15 saniye) örneklerde; resüspansiyonun daha zor olduğu saptandı. Resim 14.

Bekletilmiş kan örneklerinin reaksiyon üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla; oda sıcaklığı ve +4 derecede; 1, 2, 3 ve 7 gün bekletilmiş kan örnekleri ile yapılan 24 deneyde; bütün kuyularda aglutinasyonun çok net izlenmekle birlikte 7 gün bekletilmiş kanların bulunduğu kuyulardaki aglutinasyonlarda çok hafif dağılmalar gözlemlendi. Oda sıcaklığında bekletilen kanların +4 derecede bekletilenlere kıyasla resüspansiyonunun ve resüspansiyon sonrası kuyu dibine çökmenin daha kolay olduğu gözlemlendi. Resim 15.

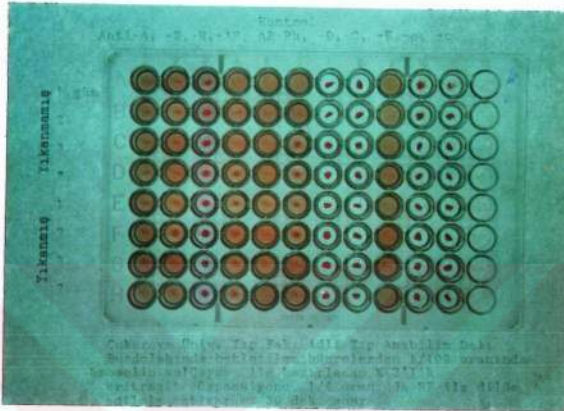
24 deney, değerlendirmeleri yapılarak reaksiyon sonuçları kaydedildikten sonra, plate örtücüsü ile kapatılarak oda sıcaklığında 1,5,7 gün bekletildi. Sonuçlar tekrar değerlendirildiğinde; tüm kuyularda reaksiyonların korunduğu ve kaydedilmiş sonuçlar ile aynı olduğu görüldü. Resim 16.



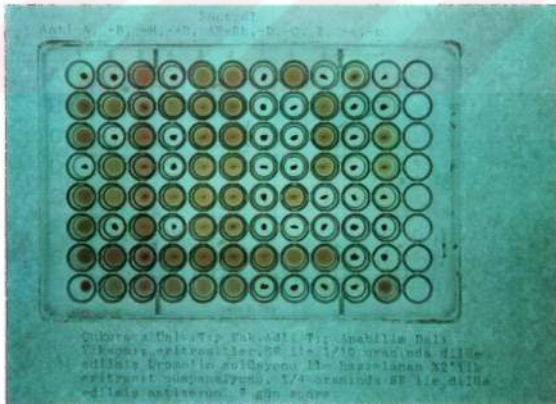
Resim 13.



Resim 14.



Resim 15.



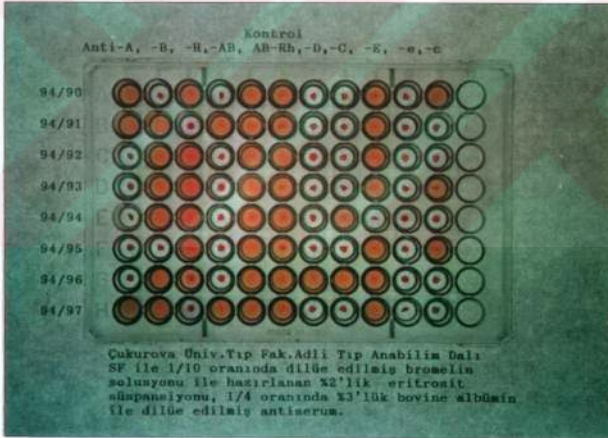
Resim 16.

SONUÇ

- 1- Mikroplate ile ABO kan gruplamasında; yıkanmış eritrositlerden %2'lik süspansiyon hazırlanmasının, bu yöntem için en uygun konsantrasyon olduğu görüldü.
- 2- %2'lit eritrosit süspansiyonu hazırlamada 1/10 dilüsyonda sıvı bromelin kullanılması reaksiyonları daha güçlü kılarak, sonuçların daha net görülmesini sağladığı görüldü.
- 3- Gerekirse 1 haftaya kadar bekletilmiş kanda mikroplate ile ABO fenotiplendirilmesinin yapılabileceği, +4 derecede kanı saklamanın antijenik aktivitenin korunmasına olumlu katkıda bulunduğu saptandı.
- 4- Antiserumların 1/4 dilüsyonda net izlenebilen reaksiyonlar verdiği, dilüsyonda serum fizyolojik veya bovin albumin kullanımı arasında ayırım yapılamadığı görülerek; serum fizyolojik ile 112 ve bovin albumin ile 308 olan dilüsyon dency sayısının artırılmasının faydalı olacağı düşünüldü.
- 5- Santrifüj işleminin yanlış negatiflikleri önleme ve reaksiyonları güçlü kılmada etkili olduğu, santrifüj süresinin 30 saniye olması gerektiği görüldü.
- 6- Santrifüj sonrası 30 dakikalık bekleme sonrası reaksiyonların değerlendirilmesinin, resüspansiyonun kolaylığı nedeniyle daha kolay ve net değerlendirme sağladığı izlendi.
- 7- Deney sonrası plate örtücüsü ile sıkıca kapatılan platelerin bir hafta sonrası tekrar değerlendirilebildiği saptandı.

Tüm reaksiyonlar değerlendirildiğinde; yıkanmış eritrositlerden, 1/10 bromelin solüsyonu ile %2 konsantrasyonda eritrosit süspansiyonu hazırlanması ve bovin albumin

ile 1/4 oranında dilüe edilmiş antiserum kullanılmasının, kuyulara 40 mikro antiserum konduktan sonra üzerlerine 30 mikrolitre eritrosit süspansiyonu konulmasının, 15 dakika enkübasyondan sonra platelerin 30 saniye süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilip 30 dakika bekleme sonrasında reaksiyonların değerlendirilmesinin, aglütinasyonların sağlıklı okunması açısından uygun olduğu düşünüldü. Resim 17.



Resim 17.

TARTIŞMA

1922 yılında Ottenberg bir makalesinde; yakın gelecekte kan gruplamanın muhtemelen Adli amaçla kullanılacağını, yaygın araştırmaların yapılması gerektiğini belirtmiş, hata kaynaklarını gözönüne alarak "En iyi teknik nedir?" sorusuna yanıt aramıştır(45). Günümüzde gelişmiş ülkelerde; laboratuvar çalışmalarında, yanlış sonuçları ve bunların nedenlerini araştırıp tartışarak kalitenin yükselmesini sağlayan denetim sistemleri kurulmuştur. Bu merkezler belirli zamanlarda farklı kan örneklerini, çalışma kapsamına alınan laboratuvarlara göndererek çalışma sonuçlarını almaktadırlar. Teknik etkinliği ölçmenin dışında; ekipman, ayıraçlar ve ürün yeterliliği konusunda değerlendirme ile sonuçlar tartışılmaktadır. Bu merkezlerin yaptığı çalışmalarda; ABO ve D gruplamada %96 ile %100 arasında değişen sonuçlar saptandığı belirtilmektedir. Başka bir deyişle %4'e varan hatalı sonuçlar elde edilmektedir(6,18,33,34). Hatalı sonuçların açabileceği felaket gözardı edilemez. Adli tıbbın en çok karşılaştığı paternite çalışmalarında veya olay ortamında bulunan vücut sıvı ve lekelerinden suçlu suçsuz ayırımında kullanılacak delillerin eldesinde, Yargının başvuru kaynağı Adli Seroloji Laboratuvarlarıdır. Adalet doğru bilgilerin eldesi ve dayanağını bilimden alması ile sağlıklılık kazanacaktır.

Hukukun bilimsel verilere dayandırılarak karar vermesini sağlayacak olan laboratuvar çalışmalarında, hatanın tolere edilemeyeceği açıktır. Bu yüzden; antijen-antikor reaksiyonlarını etkileyen değişik faktörlerin varlığı sonucu, yanlış ve istenmeyen sonuçlardan kaçınmak için; çalışma sonuçlarını etkileyebilen değişkenler hakkında bilgili olarak titiz bir teknik kullanılmalıdır.

Laboratuvar çalışmalarında hatalı sonuçların en büyük nedeninin personel hatalarından kaynaklandığı belirtilmektedir. Hataların çoğunluğunun teknik problemlerden çok sonuçları yorumlama ve kaydetme olduğu vurgulanmaktadır(6,18,27,34,42,63). Bir çalışmada ABO gruplamada meydana gelen 17 hatadan 13'ünün yer değiştirme veya yorumlama, 4'ünün ise teknik kaynaklı olduğu ifade edilmektedir(34). Bu konuda yapılmış çalışmalar benzer sonuçlar içermektedir. Etiketleme, tüplerin yer değiştirmesi ve sonuçların kaydedilmesi esnasında meydana gelebilecek yanlışlıkları çok sayıda tüp yerine, bir kezde 96 ayrı reaksiyonun alınabildiği plate kullanımının (sağladığı ekonomik avantajları yanısıra) hata yapılmasını en aza indireceği belirtilmektedir.

Alınan kanın taze olarak çalışılması, eğer kullanım öncesi bekletme süresi 12 saati geçecek ise +4 derecede saklanması gerektiği ve kanın bir haftaya kadar kullanılabileceği belirtilmektedir(7,26,43). Steril ve ona yakın durumlarda çalışılmasının bakteriyel kontaminasyon ve ona bağlı olarak yanlış pozitif sonuçları engellemek için gerekli olduğu, kanı +4 derecede saklamanın bakteriyel gelişim ve üremeye engel teşkil edemeyeceği ifade edilerek kanın taze olarak çalışılması gerektiği vurgulanmaktadır(7,25,26,43). Çalışmamızda; aldığımız kanları, alınmayı takipeden ilk 1/2-1 saat içinde çalıştık. Kanı bekletmenin reaksiyon üzerine etkilerini görmek için yaptığımız deneylerde; 1, 2, 3, ve 7 gün bekletilmiş kanlarla yapılan deneylerde de aynı sonuçlar alınmıştır. Bekletilen kanlar ile aynı sonuçların net olarak eldesi, gerektiğinde; bir haftaya kadar bekletilen kanların çalışılabileceği veya deneyin tekrarlanmasının sözkonusu olduğu durumlarda eldeki kanlar ile deneyin yeniden yapılabilceğini göstermiştir.

Deneylerde yıkanmamış eritrositler kullanımının yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceği belirtilerek, artefaktları ortadan kaldırmak için yıkanmış eritrosit kullanımı önerilmektedir(26,54). İncelenen kaynaklarda eritrositlerin elle veya otomatik yıkayıcılar ile yıkandığı görülmektedir(12,43,55,70). Yaptığımız çalışmada yıkanmamış eritrositler ile yapılan deneylerde resüspansiyonun çok güç ve geç olduğu saptanarak, serum fizyolojik ile 3 kez yıkanmış eritrositlerden süspansiyonlar hazırlanmıştır. Yapılan deneylerde yıkanmamış eritrosit süspansiyonlarına kıyasla resüspansiyonun daha kolay ve kısa sürede olduğu saptanmıştır.

Kaynaklarda, %0.5 'den %3 'e kadar değişik konsantrasyonlarda eritrosit süspansiyonu kullanıldığı görülmektedir(1,3,7,8,43,55). Manuel tekniklerde makroskobik okuma kolaylığı nedeniyle %2-3 konsantrasyonda hazırlanan eritrosit süspansiyonu kullanılması önerilmektedir(7). Bizim çalışmamızda; %1 ile küçük ve %3 ile iri kalan aglütinasyon saptanmıştır. Çalışmalarımız Adli amaçlı olması ve gerektiğinde çalışma sonuçları mahkemelere delil olarak sunulacağından fotograflanması gerekmektedir. Yapılan fotograflamalarda; %2 konsantrasyondaki eritrosit süspansiyonunun daha güzel görüntü verdiği saptanmıştır. Çalışma sonuçlarının, ortaya çıkabilecek yeni iddialara veya tartışmalara ışık tutması amacıyla kalıcılığının sağlanması gerektiği görüşündeyiz.

Laboratuvarın sabit ve istenen ısıda olması gerekmektedir. Özellikle sıcaklığın ilimiz gibi çok yüksek seviyelere çıktığı yerlerde hatırd tutulması gereken bir faktördür. ABO gruplaması sıcaklığın 24-25 derece olmasının ideal olduğu belirtilmektedir. Laboratuvarımız hastanemizin merkezi soğutma sistemine bağlı olduğundan 24-25 derece

civarında kalarak ideal ısı ortamı sağlanmıştır.

Kısa hızlı veya uzayan yavaş santrifügasyon aglutinasyonu etkileyebilmektedir. Yetersiz santrifügasyon yanlış negatif sonuçlara, aşırı santrifügasyon aglutinasyon olarak yorumlanabilecek resüpsansiyon zorluğuna yol açabilmektedir. Hız ve zamanın her laboratuvarında kendi koşulları içinde standardize edilmesi gerektiği bildirilmektedir(7,26).

Makroskopik okumada, enzim kullanımının negatif - pozitif sonuçları ayırtma kolaylığı sağladığı belirtilmektedir. Eritrositlerin belirli enzimler ile işleme tabi tutulması onların aglutinasyon gücünü arttırmaktadır(11,17,55). Bu amaçla litik enzimler olan tripsin, papain, ficin ve bromelin kullanılmaktadır. Eritrositlerin enzimler ile işleme tabi tutulmasının membran proteinlerinin sindirimine yolaçtığı, sialik asitten kaynaklanan negatif yüzey yükünü ortadan kaldırdığı belirtilmektedir(7,14,20,26). Enzim tekniklerinde 3 önemli faktör olduğu ifade edilmektedir. Bunlar; enzim seçimi, enzim solüsyonunun hazırlandığı yer ve teknik seçimidir. Bunların hepsindeki performansı nedeniyle bromelinin tercih edildiği belirtilmektedir(33). Bromelinin mikrotatelerde kan gruplama için seçilen bir enzim olduğu ifade edilmektedir. Enzim tekniklerinin aynı zamanda antiserumun serolojik aktivitesini azaltacağına dikkat çekilmektedir. İşlem öncesi 10-15 dakikalık enkübasyonun yeterli olacağı, 4 saati aşmaması gerektiği belirtilmektedir. Sürenin uzaması eritrositlerin hassasiyetinin artması sonucu yanlış pozitif reaksiyonlara sebep olabilmektedir(12,20,26). Enzim konsantrasyonunu kontrol etme ile, yanlış pozitiflik ve sensivite arasında denge kurulması gerekmektedir. Optimal enzim aktivite seviyesi her enzim ve teknik için farklı olacaktır. Her teknikte optimal enzim aktivitesini tayin etmenin

önemli olduğu vurgulanmaktadır(24,33,44,56).

Antiserumların birçoğunun henüz mikrolate kullanımı için standardize edilmiş olarak elde edilemeyeceği belirtilerek ürün sorumluluğunun, üreticiden kullanıcıya geçeceği belirtilmektedir. Her laboratuvar mikrolate kullanımı için spesifik, yeteri oranda güçlü ve diğer konularda da uygun olduğundan emin olmalıdır. Mikrolate kullanımı için, yeniden standardize edilmeye ihtiyacı olan tüm ayıracılar güçlülük ve spesifiklik için test edilmesi gerektiği bildirilmektedir(7). Çalışmamızın bazı deneyleri bu amaçla yapılmıştır.

Antiserum dilüsyonu, harcanan miktarı azaltarak maliyette önemli düşme sağlamaktadır. Dilüsyonu sağlamak için bovin albumin veya serum fizyolojik kullanıldığı görülmektedir. Özellikle %22 veya %30'luk bovin albuminin %3 konsantrasyona getirilerek kullanılması önerilerek zayıf antijenik yapıdaki kan grup sistemlerinde olumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir(7,12,15,48). Dilüsyonu sağlamada serum fizyolojik veya bovin albumin kullanımı arasındaki farkı görmek için kıyaslamalı yaptığımız deneylerde; net olarak bir fark saptayamadık. Şu ana kadar ulaştığımız 220 vaka sayısının artırılmasının değerlendirmeye daha olumlu katkılar sağlayacağı inancındayız.

Gelişmiş Ülke Laboratuvar merkezleri ile olan mesafeyi kapatarak onların seviyesine ulaşabilmek için; genetik materyalin elde edilebildiği, tüm vücut sıvı ve dokularının gelişmiş teknikler ile kimliklendirilebildiği merkezlere sahip olma zorunluluğunu vurgulayarak çalışmamızı bitirmek istiyoruz.

ÖZET

Vücut sıvıları ve lekelerinin kimliklendirilmesi ve paternite araştırmaları Adli Bilimlerin popüler konularındandır. Bu amaçlarla eritrosit antijenlerinin ayırd edilmesi geleneksel yöntemlerdendir. Adli Bilimlerde kan gruplarının ayırd edilmesi ve kullanımı ile ilgili çok sayıda kaynak vardır. Kan gruplarının tayininde en çok ve yaygın olarak eritrosit agglutinasyonuna dayanan yöntemler kullanılmaktadır. Bu alanda mikroyöntemler gibi yeni yaklaşımlar, agglutinasyon teknolojisinde yeni umutlar vaatetmektedir.

Bu çalışma mikroyöntemlerden biri olan ve basitliği-güvenirliliği nedeniyle tavsiye edilen microplate yönteminin Anabilim Dalımıza oturtularak uygulanması amacı ile planlanmıştır. Bu amaçla kaynaklarda önerilen yöntem evreleri ve planlanan deneyler 220 sağlıklı gönüllüden alınan kanda çalışılmıştır. Yöntemin spesifikliği, zaman ve ayıraç yönünden ekonomikliliğini geliştirmek için 450 farklı deney yapılmıştır.

Yapılan deneylerde; yıkanmış eritrositlerin 1/10'luk bromelin solüsyonu ile hazırlanan %2'lik süspansiyonlarının en uygun olduğu, antiserumların bovin albumin ile 1/4'lük konsantrasyonlarda en iyi okunan sonuçları verdikleri, 30 microlitre eritrosit süspansiyonu ve 40 microlitre dilüe antiserumun güvenilir sonuç almak için yeterli olduğu, hücre süspansiyonu ve antiserum karışımının 15 dakikalık enkübasyondan sonra 1000 rpm'de 30 saniye santrifüjünün sonuçların çıplak gözle okunabilmesi ve fotoğraflanabilmesi için yeterli olduğu gözlenmiştir.

SUMMARY

Identification of the body fluids and stains and Paternity testings are popular subjects of Forensic Sciences, antigenic determination of red cells is the traditional technique for these purposes. There is much literature available on the use and interpretation of blood grouping in forensic sciences. All commonly used blood grouping tests depend on agglutination of the red cells. New approaches such as microprocedures offer much promise in agglutination technology.

This study has been planned to settle one of the microprocedures, the microplate technique, which is recommended for its simplicity and reliability, in our department.

In this study the microplate technique has been tested on the fresh blood samples, withdrawn 220 healthy donors. 450 laboratory tests performed to evaluate the specificity, economy of time and equipment of the technique.

The tests were performed to evaluate the most suitable suspending media for red cells showed that 1/10 bromelain solution in 2% dilution is convenient for this micro procedure. The comparison of the antiserum dilution medias and concentrations revealed that 1/4 diluted antiserum in bovin albumin provide the best reading of the test results. It was shown that the use of 30 microlitres of red cell suspension and 40 microliters of diluted antiserum is enough to obtain reliable results. The tests results indicated that the use of 15 minutes incubation and 1000 rpm centrifugation for 30 seconds of the mixture of the cell suspension and antiserum provides clear interpretation for macroscopic examination and also photography.

KAYNAKLAR

- 1- Airey CJ: Semi-automated microplate blood grouping. *Med Lab Sci*, 45:151-160, 1988.
- 2- Albayrak A: Kan Grupları ve Hemoterapi. 1.Baskı. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Basımevi, 1985: 1-32.
- 3- Anderson HJ, Patel S: Red cell phenotyping using hexadimethrine bromide (Polybrene) in a microplate system. *Transfusion*, 24:353-356, 1984.
- 4- Atun İH, Hacıbulgur M: Kıbrıs Türk toplumunun kan grupları ve çevre toplumları ile ilişkileri. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 13: 183-192, 1979.
- 5- Aykaç M: Adli Tıp Ders Kitabı. 1.Baskı. İstanbul: Çeliker Matbaacılık, 1987: 278-285.
- 6- BCSH Blood Transfüzyon Task Force: Guidelines on hospital blood bank documentation and procedures. *Clin Lab Haemat*, 12(2):209-20, 1990.
- 7- BCSH Blood Transfüzyon Task Force: Guidelines for microplate techniques in liquid-phase blood grouping and antibody screening. *Clin Lab Haemat*, 12:437-460, 1990.
- 8- Beck ML, Rachel JM, Sinor LT, et al: Semi-automated solid phase adherence assays for pre-transfusion testing. *Med lab Sci*, 41(4):374-381, 1984.
- 9- Bingöl G: Kan Transfüzyonu. 1.Baskı. Ankara: Gürsoy Matbaacılık Sanayi, 1970.
- 10- Bowley AR, Donald W, Gordon I, et al: A microplate reader for blood grouping. *Med Lab Sci*, 45(1):19-27, 1988.
- 11- Bowley AR, Gordon I, Ross DW: Computer controlled automated reading of blood groups using microplates. *Med Lab Sci*, 41(1):19-28, 1984.

- 12- Bronch DR, Dzik WH, Judd WJ. Blood grouping and typing in Walker RA(Eds): AABB Technial Manual Methods.11th Ed. Maryland, 1993: 601-638.
- 13- Büyükyüksel C: Türkiye'de Kan Grupları Dağılımı. 1.Baskı. Ankara: Şenyuva Matbaası, 1970: 34-35.
- 14- Campbell EJ, Scott ML: Enzyme techniques in blood group serology: the effect of ionic strenght. Med Lab Sci, 48(1):52-58,1991.
- 15- Crawford MN, Gottman FE, Gottman CA: Microplate system for routine use in blood bank laboratories. Transfusion, 10(5):258-263, 1970.
- 16- Çetin ET: Genel ve Pratik Mikrobiyoloji. 3.Baskı. İstanbul: Sermet Matbaası, 1973: 162-178.
- 17- Chung A, Birch P, Ilagan K: A microplate system for ABO and Rh(D) blood grouping. Transfusion, 33:384-388, 1993.
- 18- Cooper ES, Ryden SE, Schmidt PJ, et al: CAP Comprehensive Blood Bank Survey-1985. Arch Pathol Lab Med, 111:899-903, 1987.
- 19- Dodd BE: Identification by Examination of the Blood in Camps FE (eds): Gradwohl's Legal Medicine, 3rd Ed. Bristol: John Wright and Sons Ltd, 1976: 147-152.
- 20- Dodd BE, Lincoln PJ: Blood Group Topics. Ist Ed. London: Edward Arnold Ltd, 1975: 40-72.
- 21- Ege B, Salaçin S. Kan gruplarının saptanmasında kullanılan iki farklı tekniğin sonuçlarının karşılaştırılması. E.Ü.Ege Tıp Fakültesi Dergisi, 21(1):29-40, 1982.

- 22- Erbaş O, Işıl E, Acar Y, ark. Kan gruplarının saptanmasında yeni bir yöntem: jel sentrifigasyon testi. Ankara Hastanesi Tıp Bülteni, 26:147-150, 1991.
- 23- Gaenslen RE. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. Washington: US Government Printing Office, 1984:261-329.
- 24- G.Garatty: Blood group antibody detection: enzyme techniques revisited. Med Lab Sci, 45(1):5-6, 1988.
- 25- Green C, Shirling GD, Kelly J, et al: Quality assurance of physiological saline used for blood grouping. Med Lab Sci, 43(4):364-368, 1986.
- 26- Greendyke RM, Corner JC: Introduction to Blood Banking. 1st Ed. New York: Medical Examination Publishing Company, 1970: 58-104.
- 27- Grindon AJ, Eska PL: Error rate, precision and accuracy in immunohematology. Transfusion, 17(5):425-431, 1977.
- 28- Guyton AC. Fizyoloji. 5.Baskı. Ankara: Güven Kitabevi, 1977:143-169.
- 29- Hakomori S: Blood group ABH and antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. Seminars in Hematology, 18:39-62, 1981.
- 30- Hart GD, Kvas I, Soots M: Blood group testing of ancient material with particular reference to the mummy Nakht. Transfusion, 18:474-478, 1978.
- 31- Hedley GP, Doughty RW, Collins AK: Microplate blood grouping with computer-controlled reading and data interpretation. Med Lab Sci, 43(2):199-200, 1986.
- 32- Hitzler W, Schömig-Brecker H, Mathies D. Gel centrifugasyon test: a new micro method for blood group typing and antibody screening. Arztl Lab, 35:89-92, 1989.

- 33-Holburn AM : The UK National external quality assessment scheme in blood group serology. Compatibility testing 1983-1984: the influence of variables in test procedures on detection of incomplete antibodies. Clin Lab Haemat, 9(1):33-48, 1987.
- 34- Holburn AM, Prior D: The UK National external quality assessment scheme in blood group serology. ABO and D grouping and antibody screening 1982-1983. Clin lab Haemet, 8(3):243-56, 1986.
- 35- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "Fingerprints" of human DNA. Nature, 316:76-79, 1985.
- 36- Kılıç NB: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankası Verileri. Yayınlanmamış çalışma, 1994.
- 37- Kinght B: Blood Identification in Tedeschi CG, Eckert WG, Tedeschi LG (eds): Forensic Medicine. 1st Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1977: 810-817.
- 38- Knight RC, Slater NG: Automated blood grouping in a hospital laboratory with the minigroupomatic. Med Lab Sci, 40(1):7-13, 1983. 39- Lapier Y, Rigal D, Adams J, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion, 30:109-113, 1990
- 40- Mizan N: Kan Grupları. 1.Baskı. İstanbul: Türkiye Kızılay Derneği Kan Programı Yayınları, 1962: 1-43.
- 41- Mourant AE, Kopec AC, Kazimicra DS. Blood Groups and Diseases. 1st Ed. Oxford: Oxford University Press, 1978: 1-12.

- 42- Murphy WG, McClelland DBL: Deceptively low morbidity from failure to practice safe blood transfusion: An analysis of serious blood transfusion errors. *Vox Sang*, 57(1):59-62, 1989.
- 43- Myhre BA, Pickett C. Red Cell Antigen Testing in Grunboun BW(eds): Handbook for Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstains. 1st Ed. Göttingen: Santorius GmbH, 1981: 147-160.
- 44- Ogasawara K, Mazda T: differences in Substrate Specificities for cysteine proteinases used in blood group serology, and the use of bromelain in a two-phase Inhibitör technique. *Vox Sang* 57(1):72-76, 1989.
- 45- Ottenberg R: Medicolegal Application of Human Blood Grouping. *JAMA*(79:2137-2139, 1922) 250:2532-2535, 1983.
- 46- Ötöker RC, Işık AF, Kendi İÖ: Kan lekelerinden mixed aglutinasyon yöntemiyle ABO grup tayini. I. Adli Bilimler Kongresi, Adana, 1994.
- 47- Öztürel A: Adli Tıp. 1.Baskı. Ankara: Sevinç Matbaası, 1979: 263-271.
- 48- Parker JL, Marcoux DA, Hafleigh EB, et al: Modified microtiter tray method for blood typing. *Transfusion*, 18(4):417-422, 1978.
- 49- Perkins HA, Morel PA: Problems in Paternity Testing. *AJCP*, 73(2):263-66, 1980.
- 50- Plapp FV: New techniques for compatibility testing. *Arch Pathol Lab Med*, 113:262-269, 1989.
- 51- Race RR, Sanger R: Blood Groups in Man, 6 th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975: 1-458.

- 52- Redman M, Malde R, Knight RC: Typing of red cells on microplates by the low-ionic polybrene technique. *Med Lab Sci*, 43(4):393-394, 1986.
- 53- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491, 1988.
- 54- Salaçın S: Kan Gruplarının Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması Üzerine Bir Çalışma. Uzmanlık Tezi, İzmir, 1980.
- 55- Sallander S, Pegert S: A Semiautomated method for erythrocyte antigen typing on microtitration plates. *Vox Sang*, 63(3):215-219, 1992.
- 56- Scott ML, Voak D, Downie DM: Optimum enzyme activity in blood grouping, and a new technique for antibody detection: an explanation for the poor performance of the one-stage mix technique. *Med Lab Sci*, 45(1):7-18, 1988.
- 57- Severns M, Kline LM: An Improved method for detection of hemagglutination using an automated microplate reader. *IEEE Trans Biomed Eng*. 32(5):349-352, 1985.
- 58- Severns ML, Kline LM, Epley KM: Computerized threshold determination for automated ABO/Rh Tests. *Vox Sang*. 56(2):87-92, 1989.
- 59- Severns ML, Schoeppner SL, Cozart MJ, et al: Automated determination of ABO/Rh in microplates. 47(4):293-303, 1984.
- 60- Schroeder ML, Rayner HL: Red cell, Platelet and White Cell Antigens in Richard LG, Bithell TC, Foerster J, Athens JW et al (eds): *Wintrobe's Clinical hematology*. 9 th Ed. London: Lea & Febiger, vol:1 1993: 616-620.

- 61- Shulman IA, Calderon C: Effect off delayed centrifugation or reading on the detection of ABO incompatibility by the immediate-spin crossmatch. *Transfusion*, 31(3):197-200, 1991.
- 62- Sigmon JM: Basic principles of the ABO and Rh blood group system for hemopheresis practitioners. *Journal of Clinical Apheresis*, 7:158-162, 1992.
- 63- Smith PJ, Miller TE, Fraser J, et al: An empirical evaluation of the performance of antibody identification tasks. *Transfusion*, 31(4):313-7, 1991.
- 64- Stroup M. ABO Typing Using Monoclonal Technology: Will It Redefine the ABO System?. *Ortho Educational Series*. New Jersey:Ortho Diagnostic Systems Inc, 1991:5-21.
- 65- Şaylı BS: Medikal Genetik İlkeler. 1.Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1992: 64-70.
- 66- Tatsumi N, Tsuda I, Inoue K: Trial of ABO and Rh blood typing with an automated blood cell counter. *Clin Lab Haematol*. 11(2):123-130, 1989.
- 67- Tunalı İ: Adli Tıp. 1.Baskı Ankara: Yarı Açık Cezaevi Matbaası, 1988: 186-202.
- 68- Tunalı İ, Acar K, Işık AF: SS sistemi ile anneliğin reddi. 7. Ulusal Adli Tıp Günleri, Antalya, 1993: 307-309.
- 69- Tunalı İ, Kendi Ö, Bilge Y, et al: MN subgrubunda Mg ve N₂ 'nin babalık testinde kullanımı. I. Adli Bilimler Kongresi, Adana, 1994.
- 70- Warlow A, Tills D: Micromethods in blood group serology. *Vox Sang*, 35:354-356, 1978.

- 71- Wegmann TG, Smithies O: A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. *Transfusion*, 8(1):67-73, 1966.
- 72- Wegmann TG, Smithies O: Improvement of the microtiter hemagglutination method. *Transfusion*, 8(1):47, 1968.
- 73- Yamamoto F, Clarsen H, White T, et al: Molecular genetic basic of the histo-blood group ABO system. *Nature*, 345:229-233, 1990.
- 74- Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, et al: Molecular genetic analysis of the ABO group system: 1. Weak subgroups: A³ and B⁻³ alleles. *Vox Sang*, 64:116-119, 1993.
- 75- Yamamoto F, McNeil PD, Kominato Y, et al: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. cis-AB alleles. *Vox Sang*, 64:120-123, 1993.
- 76- Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, et al: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A^x and B^(A) Alleles. *Vox Sang*, 64:171-174, 1993.
- 77- Yamamoto F, McNeil PD, Yamamoto M, et al: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox Sang*, 64:175-178, 1993.
- 78- Yoshida A, Dave Vibha, Prchal J: Uncertainty in Identification of blood group A Subtypes by agglutination test. *Hum Hered*, 35(1):1-6, 1985.
- 79- Zummerman MR: Blood cells preserved in a mummy 2000 years old. *Science*, 180:303-304, 1973.