



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Direkt Antiglobin Testi:<br>Pozitif Teste Laboratuvarın Yaklaşımı                                                                                                         | 2  |
| <i>Prof. Dr. Duran Canatan</i>                                                                                                                                            |    |
| Direkt Antiglobin Test<br>Pozitifliğinin Klinik Durumları                                                                                                                 | 8  |
| <i>Prof. Dr. Duran Canatan</i>                                                                                                                                            |    |
| TRIM                                                                                                                                                                      | 11 |
| <i>Dr. S. Haldun Bal</i>                                                                                                                                                  |    |
| Bakteri Tespit Yöntemleri ve<br>Patojen İnaktivasyon                                                                                                                      | 14 |
| <i>Uzm. Dr. N. Banu Pelit</i>                                                                                                                                             |    |
| Talasemi Majorlu Hastalarda<br>Eritrosit Antikorları                                                                                                                      | 16 |
| <i>Duran Canatan, Nihal Balta,<br/>Ahmet Özsancağ, Banu Türkmen,<br/>Ayşegül Kılıç, Özcan Eren, Ömer Kocaoğlu,<br/>Oktay Koçgürbüz, Reşat Torunlar,<br/>Halil Dirican</i> |    |

## Sevgili Kan Bankacılar,

XI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kursu sizlerin yoğun ilgisi sonucu rüya gibi geçti. Katkıda bulunan bilim adamlarımıza, endüstri temsilcilerine, Sağlık Bakanlığı'na ve sizlere teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Bu sayımızda Prof. Dr. Duran Canatan'ın Direkt Antiglobulin Testi ile ilgili, konu başlıkları "**Direkt Antiglobulin Testi: Pozitif Teste Laboratuvarın Yaklaşımı**" ve "**Direkt Antiglobulin Testi; Pozitifliğin Klinik Durumları**" olan iki ayrı derlemesini yayımlıyoruz.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Raşit Durusoy Kan Merkezi'nden Dr. S. Haldun Bal "**Transfüzyonla İlgili İmmün Düzenleme (TRIM)**" başlıklı yazısını sizlerle paylaşıyor.

Acıbadem Hastaneleri Kan Koordinatörü Uzm. Dr. Nil Banu Pelit bizler için "**Bakteri Tespit Yöntemleri ve Patojen İnaktivasyon**" konusunu yazdı.

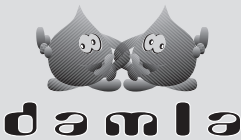
"**Talasemi Majorlu Hastalarda Eritrosit Antikorları**" isimli, II. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi'nde sözel bildiri olarak sunulan Prof. Dr. Duran Canatan ve arkadaşlarının çalışması da bu sayıda yer alıyor.

Bizlere [www.kmtd.org.tr](http://www.kmtd.org.tr) ve [www.kan.org.tr](http://www.kan.org.tr) adreslerinden ulaşabilirsiniz.

Sağlıkla kalın, görüşmek dileğiyle.

**Dr. Ramazan ULUHAN**

*Türkiye Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği  
II. Başkanı*





# Direkt Antiglobin Testi: Pozitif Teste Laboratuvarın Yaklaşımı

► Prof. Dr. Duran Canatan \*

Direkt antiglobulin testi (DAT); eritrositlerin yüzeylerindeki antikorları göstermek için kullanılan tek aşamalı bir testtir. Antikorlar immünglobülin veya kompleman kökenlidir. En sık karşılaşılan antikorlar IgG ve C3d veya ikisinin birlikteliğidir.

Antikorlar sıcak veya soğuk ortamda reaksiyon verebilir. DAT pozitifliği genelde sıcak tipte antikorlar ile olmaktadır. Örneğin Oto İmmün Hemolitik Anemilerde (OIHA) % 80 sıcak, % 20 civarında soğuk tipte antikorlar sorumludur. Soğuk Aglutinin Sendromunda (SAS) veya Paroksizmal Soğuk Hemoglobinüride (PSH) soğuk tipte antikorlar sorumludur (1-5).

Eritrositlerin yaşam süresi kısalmadan da sağlıklı insanlarda DAT pozitifliği oluşabilir. Bir çok araştırma sonucunda yatan hastalarda % 0.3-1.5 sıklıkta, donörlerde 1/1000-1/14.000 sıklıkta DAT pozitif olarak bulunduğu ve bu sıklığın yaş ile arttığı yayınlanmıştır (1,6,7,8).

## DAT Pozitifliği Birçok Nedenlere Bağlıdır

1. Eritrosit antijenlerine karşı oluşmuş otoantikorların komplemanla birlikte veya tek başına eritrosit yüzeyini kaplaması,
2. Yakın zamanda yapılmış bir transfüzyondan sonra alıcıdaki alloantikorların donör eritrositlerinin yüzeyini kaplaması,
3. Donörün plazmasında bulunan antikorların transfüzyondan sonra alıcıdaki eritrositlerin yüzeyini kaplaması,
4. Annedeki alloantikorların plasentadan geçerek fetusun

eritrositlerini kaplaması,

5. Çeşitli ilaçların (Penisilin, sefalosporin, quinidine, phenacetin vb) kullanılması,
6. Yüksek doz gamaglobulin tedavisi sırasında veya hastada hipergamaglobulinemi olması.(1)

## Direkt Antiglobulin Test İşlemi

### Konvansiyonel tüp testi için gerekli malzemeler:

1. 10 x 75 veya 12 x 75 mm' lik cam tüpler
2. Santrifüj cihazı
3. Benmari 37 °C
4. NaCl % 0.9'luk
5. EDTA'lı kan örneği (% 2-5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlamak için)
6. AHG reaktifleri (polispesifik ve monospesifik) anti-IgG, anti-C3d, anti-IgG-C3d, anti-C3b-C3d
7. IgG veya kompleman kaplı antiglobulin kontrol eritrositleri

**İşlem:** Hastadan EDTA lı tüpe en az 2 ml kan örneği alınır. Hasta tüpleri ve AHG reajan ismi tüpleri işaretlenir. Hasta eritrositlerinden % 0.9 SF içerisinde % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanır. Bu süspansiyondan 1 damla test tüpüne konur. Serum fizyolojik ile eritrositler 4 kez yıkanır. Üstteki süpernatant tamamen döküldükten sonra 1 veya 2 damla polispesifik AHG reajeni ilave edilir. Tüp 1000 x g'de 1 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası aglutinasyon değerlendirilir ve sonuçlar kaydedilir.

### Agglütinasyonun değerlendirilmesi

| REAKSİYON          | DEĞERLENDİRME                                                                                 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| ++++               | Bir tek aglutinat, serbest eritrosit yok                                                      |
| +++                | Bir kaç büyük aglutinat, serbest eritrosit yok                                                |
| ++                 | Çok sayıda büyük ve küçük aglutinat, serbest eritrosit yok                                    |
| +                  | Çok sayıda küçük aglutinat, zeminde serbest eritrosit var                                     |
| Mikroagglütinasyon | Makroskopik olarak negatif, bazı alanlarda mikroskopik 6-8 eritrositden oluşan aglutinat      |
| Şüpheli            | Makroskopik olarak negatif, çok nadir alanlarda mikroskopik 6-8 eritrositden oluşan aglutinat |
| Rulo oluşumu       | Mikroskopik olarak kümeler para dizisi şeklinde                                               |
| Negatif            | Makroskopik ve mikroskopik aglutinat yok                                                      |
| Karışık ortam      | Çok sayıda büyük ve küçük aglutinat, serbest eritrosit var                                    |



### Sonuçlar

a. AHG mevcudiyetinde eritrositlerin aglütinasyonu test pozitifliğini gösterir, IgG ve/veya komplement (C3b ve/veya C3d) varlığını işaret eder. Polispesifik AHG ile aglütine edilen eritrositler anti-IgG ve/veya komplement re ajanları ile tekrar test edilerek hangi komponentin pozitif test sonucu verdiği saptanır.

b. Anti-C3b, C3d ve/veya anti C3d içeren negatif testler oda ısısında 5-10 dk inkübe edilir. Santrifüj sonrası aglütinasyon değerlendirilir ve sonuçlar kaydedilir.

c. Anti-IgG aktivitesi içeren re ajanlar için IgG kaplı kontrol eritrositlerinden 1 damla tüplere ilave edilerek tüm negatif antiglobulin testler kontrol edilir.

d. Negatif testte, IgG ile hassas kontrol eritrositleri eklendikten sonra aglütinasyon mevcudiyeti AHG serum eklenmiş reaksiyonun olduğunu ve negatif antiglobulin testin geçerliliğini gösterir.

e. Eğer IgG hassas kontrol eritrositler, polispesifik veya anti-IgG re ajanların aktivitesini konfirme etmek için eklendiğinde zayıf veya aglütinasyon yokluğunu gösteriyorsa test geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.

f. SAS veya PSH öntanımlı örnekler 37 °C de bekletilmeli sonra antikor araştırmasına gidilmelidir (1-4).

### Antiglobulin Testinde Hata Kaynakları

#### 1. Örnek toplama hataları:

- DAT için EDTA'lı kan kullanılmaması,
- Depolanmış kan örneklerinin ilk 48 saat içinde incelenmemesi,
- Kan örneklerinin 0.5 ml'den az olması,
- Silikon jel tüplerin kullanılması,
- İğne kalınlığının 16G'dan büyük olması,
- % 5 veya %10 Dextrose giden setten kan örneği alınması,

#### 2. İşlem Hataları

a. Eritrositlerin yeterli biçimde yıkanmaması, hatalı negatif AHG testlerin en önemli sebeplerinden biridir. Eritrositler üç dört kez manuel veya otomatik yıkama yöntemi ile yıkanarak bağlanmamış globulinler uzaklaştırılır. Süpernatant her yıkamada titizce süzülür. Çalışma sırasında test tüpü parmak, başparmak veya avuç içi ile temas etmemelidir. Bu çalışanın sağlığı için tehlike oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda globulinlerin yıkama solüsyonunu kontamine edip, AHG serumunu kısmi veya tamamen inaktive etmesine neden olabilir.

b. AHG serumu, yıkamanın hemen ardından ilave

edilmezse; önceden bağlanmış olan globulinler, eritrositlerden tamamen ayrılabilir ve eritrositler üzerinde çok az IgG kalabilir. Eritrositlerden ayrılan globulinler kısmi olarak AHG serumunu nötralize edebilir.

c. AHG re ajanları, uygunsuz depolanma ve saklanma sonucu antikor aktiviteleri bozulabilir.

d. Eğer AHG serumunun sisteme eklenmesi unutulursa, eritrositlerin globulin kaplanması tespit edilemeyecektir. Renkli AHG serumları buna karşı geliştirilmiştir.

e. Düzensiz santrifüj, AHG testlerinin duyarlılığını etkiler. Yetersiz santrifüj aglütinasyon için optimal alt şartları sağlarken, fazla santrifüj eritrositleri o kadar sıkı kümeleştirir ki, yeniden süspansiyon için gerekli çalkalama sırasında kırılan aglütinatlar kırılabilir.

f. Eritrosit konsantrasyonu reaktiviteyi etkiler. Eğer çok fazla hücre varsa zayıf reaksiyonlar oluşabilir ama çok az hücre varsa aglütinasyonu tam ve doğru olarak gözlemlemek zordur.

g. Bir hastanın serumunda yüksek konsantrasyondaki IgG paraproteini, pek çok yıkama fazının ardından bile anti-IgG'yi inhibe edebilir.

h. Yıkama solüsyonlarının düşük pH'ı AHG testinin duyarlılığını azaltabilir. Yıkama solüsyonunun optimal pH'ı 7.0 – 7.2 olmalıdır.

i. Yetersiz teknik, zayıf reaktif testlerin negatif olarak yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Personel zayıf pozitif testleri okumada ve yorumlamada genellikle zorlanabilir (1-4).

### 3. DAT Sonucunu Ön Değerlendirmede Neler Yapılmalı

- Şüpheli sonuçlar kolon aglütinasyon testi veya gel testi ile karşılaştırılmalıdır.
- Anti IgG veya anti C3d içeren monospesifik testler kullanılmalıdır.
- Hastanın tanısı, aldığı ilaçlar, transfüzyon öyküsü,

| Tablo 1. DAT yorumunda klinik ve laboratuvar verileri |                      |
|-------------------------------------------------------|----------------------|
| Klinik veriler                                        | Laboratuvar verileri |
| Yaş                                                   | Hemoglobin           |
| İrk                                                   | Hematokrit           |
| Cins                                                  | Retikülosit sayımı   |
| Klinik Tanı                                           | Bilirubin            |
| Gebelikler                                            | Haptoglobulin        |
| Transfüzyonlar                                        | Laktik dehidrojenaz  |
| İlaçlar a. Bilinen b. Bilinmeyenler                   | İdrar hemoglobini    |
| Transplant öyküsü                                     |                      |
| ALG / ATG                                             |                      |



klirik ve laboratuvar bulguları sorgulanmalıdır (Tablo1).

d. Hastanın laboratuvar bulguları olarak Hb, Hkt, EOv, Retikülosit sayımı, Serum Bilirübin, Haptoglobulin, LDH ve İdrar hemoglobin düzeylerine bakılmalıdır. Bir tam kan sayımı ile OİHA'yı tanımak ve yönlendirmek mümkün olabilmektedir. OİHA'leri saptamada tam kan sayımının rolü araştırılmış. 784.185 kan sayımı örneğinden, Hb 10 gr/dl ve EOv 80 fl üstünde olanlara retikülosit bakılmıştır. Retikülosit sayımı % 2 üzerinde olanların % 12.3 sinde DAT + bulunmuştur. DAT(+)'lerinde % 63.4'ünde OİHA saptanmıştır (9).

e. İlaça bağlı immün hemolitik anemide seroloji ve ilaçlar arasında ilişki araştırılıyor. Hastanın yaş, cins, ilaç öyküsü, DAT ve IAT durumları araştırıldığında 71 hastada 23 farklı ilaçla ilişkili 73 ilaca bağlı hemoliz saptanıyor. Sıklık sırasına göre sefalosporinler, penisilinler, nonsteroid antiinflatuar ilaçlar, kinin ve kinidinler ve diğer ilaçlar gelmektedir. (10)

f. Malignite ve aldığı kemoteraptik ajanlar sorgulanmalıdır (11). Ayrıca Plazmodyum yönünden de araştırılmalıdır (12,13).

g. Hastanın yaş, cins, ırk, ilaçlar ve diğer laboratuvar sonuçları bilgisi yoksa, reaksiyon transfüzyon sonrası saptanmamış ise ve reaktivite bir otoantikordan veya ilaçtan kaynaklanmıyorsa antikor saptamak zordur. (Tablo 2).

| Tablo 2. Sorunlu Sonuçlar Örneği |    |     |    |     |     |
|----------------------------------|----|-----|----|-----|-----|
| DAT                              |    | IAT |    |     |     |
| Polispesifik anti AHG            | +1 |     | IS | 37C | AHG |
| Monospesifik anti IgG            | +1 | SI  | 0  | 0   | 0   |
| Monospesifik anti-C3d            | 0  | SII | 0  | 0   | 0   |
|                                  |    | AC  | 0  | 0   | +1  |

SI: Tarama Hücreleri I, SII: Tarama Hücreleri II, IS: Acil santrifüj, AC: Otokontrol, AHG: Anti human globulin

h. Ön değerlendirmenin son aşamasında klinik olarak hemoliz var mı, son 3 ay içinde transfüzyon veya gebelik öyküsü var mı, geçmişte DAT (+) lik öyküsü var mı tekrar araştırılmalıdır.

i. Hastada bu durumlar yoksa, serumda beklenmeyen antikorlar yoksa ve transfüzyon da yapılmıyorsa DAT için daha ileri testleri yapmak bakım ve maliyet açısından gereksizdir (1- 4).

**Hatalı sonuçların nedenleri : Tablo 3 de özetlenmiştir.**

| Tablo 3. Hatalı DAT sonuçlarının nedenleri |                                          |                                |
|--------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| Yalancı pozitiflikler                      | Yalancı negatiflik olmayan pozitiflikler | Klinik olarak önemli           |
| Spontan aggregasyon                        | Uygun olmayan yıkama                     | Pasif olarak geçen antrikorlar |
| Tuzun uygunsuz depolanması                 | Uygun olmayan teknik                     | Normal hastalar                |
| Aşırı santrifüj                            | Uygun olmayan tuz depolanması ve pH sı   |                                |
| Uygun olmayan kan örneği                   | Gecikmiş test işlemi                     |                                |
| Sepsis                                     | Efektif olmayan AHG serumu               |                                |
|                                            | Kriyoglobulinler                         |                                |

### 1. Yalancı Pozitif Sonuçlar

a. Potansiyel sıcak veya soğuk otoantikorlar sonucu spontan aglütinasyon olabilir. Eğer yıkama ve AHG eklenmesinden önce bu reaksiyon saptanmaz ise DAT sonucu uygun yorumlanamaz.

b. Fazla santrifüj eritrosit aglütinasyonuna sebep olabilir, bu nedenle optimal santrifüj süresi ayarlanmalıdır.

c. Tuzun kontamine olmaması gerekir.

d. Tuz, cam veya metal kaplar yerine plastik kaplarda saklanmalıdır. Böylece cam veya metalik iyonlar eritrositlere bağlanamaz.

e. Otomatik hücre yıkama sisteminden bakteriyel kontaminasyon olabilir.

f. Silikon jelli tüpler veya pıhtılı kan gibi uygun olmayan hasta örneklerinde yalancı pozitif sonuç olabilir (1- 4).

### 2. Yalancı Negatif Sonuçlar

a. Eritrositlerin uygun olmayan yıkama işlemi en sık nedendir.

b. Son yıkamadan sonra kalan tuzun uygun şekilde elimine edilmesi gerekir. Kalan tuz AHG'yi dilüe veya nötralize edebilir ve işlem yalancı negatif sonuç verir.

c. Eritrositlere bağlı zayıf antikorları saptamak için, son yıkamadan hemen sonra AHG eklenmelidir.

d. Test sonucunun okunmasında hata yapılmasıdır. Tüp tabandan nazikçe tutulur, gerçek zayıf aglütinasyon, tüp sarsılırsa ayrılır. Optik okuyucu kullanarak okumak ve kayıt etmek en doğrusudur.

e. Bir volüm insan serumu 1/4000 oranında tuzda dilüe



edilmiş bir eşit volüm AHG'yi nötrale edebilir. AHG'nin nötralizasyonu kontrol etmek için IgG veya Kompleman kaplı eritrositler kontrol olarak kullanılır.

f. AHG'nin uygun olmayan şekilde depolama işlemi de yalancı negatif sonuca neden olur.

g. Rutin yıkama işlemi ile çıkarılamayan kriyoglobulinler antiglobulini nötrale ederek yalancı negatif sonuç verebilir.

h. Diğer yalancı negatif nedenler: Tuzun uygun şartlarda depolanmaması, tuzun pH sınır 6'dan küçük olması, plastik kaplarda otoklavda steril edildiğinde testlerin hassasiyeti azalır.

#### **DAT Hassasiyetinde Sınırlamalar**

I. Birkaç araştırmacı IgG kaplı eritrositler ile (+) DAT gözlemi arasındaki korelasyonu araştırdı. Kesin bir eşik değer saptanmamasına karşın 100 – 500 molekül IgG veya 400 – 1100 molekül C3d kaplı eritrositin görsel olarak DAT pozitif sonuç vereceği yayınlandı.

II. Negatif test, tesbit edilen eşik değer altında molekül sayısının olduğunu gösterir. Bununla beraber yeni reaktanlar veya daha hassas test yöntemleri, daha düşük düzeyde proteinleri eritrosit üzerinde tesbit edebilirler.

III. Sadece komplemanla kaplanmış hücreler ile oluşan aglütinasyonu saptamak için oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon ve hemen ardından santrifüj ve değerlendirme önerilmektedirler. Bu tür bir inkübasyon, negatif bir DAT'i pozitif bir DAT'e dönüştürebilir.

IV. Yıkama ve AHG serumu eklenmeden önce eritrositler aglütine olabilir. Potent soğuk reaktif otoantikör taşıyan örneklerde eritrositler, oda sıcaklığında veya bunun altındaki sıcaklarda aglütine olabilirler.

V. Kirli cam eşya içindeki partiküller veya kontaminantlar, eritrositlerin aglütinasyonuna neden olabilir. Eğer tüm kan örneklerine ait testlerin hepsi zayıf olarak reaktifse, yeni test tüpleri kullanılarak testin tekrarlanması gerekir.

VI. Eğer hastada negatif DAT ile klinik hemoliz bulguları var ise, elüsyon işlemleri gibi daha ileri testler gerekebilir. (1-4)

#### **Pozitif DAT testini araştırmada kullanılan elüsyon teknikleri;**

1. Sitrik asid elüsyon
2. Soğuk-asid elüsyon
3. Glisin-HCl/EDTA elüsyon
4. Isı elüsyon

5. Lui dondur - erit elüsyon

6. Soğuk otoadsorbsiyon

7. Soğukta reaksiyon veren otoaglutininlerin özgülüğünü saptama

8. Yüksek titrede soğukta reaksiyon veren otoaglutininlerin titrasyonu

9. Sıcakta reaksiyon veren otoantikörlerin otolog adsorbsiyonudur (1-4).

**Intakt eritrositlerden IgG çıkarılması** konusunda Acid/EDTA, Glisin HCl, Isı ve Klorokin testleri 8 sıcak otoantikör ve 42 alloantikorda karşılaştırıldığında; Acid/EDTA 48 örnekte, Isı 46 örnekte ve Klorokin 26 örnekte başarılı bulunmuştur. Tüm antikörlerde başarı oranı karşılaştırıldığında LISS IAT> Acid/EDTA > Isı (p<0.001), Kell sisteminde Acid/EDTA > Isı (p<0.001) olduğu görülmüştür (14).

#### **Klinik Olarak Önemi Olmayan Pozitif DAT Sonuçları**

Transfüzyonda en sık karşılaşılan ve sıkıntı çekilen sorun, klinik olarak önemi olmayan pozitif DAT sonuçlarıdır.

1. Pozitif DAT pasif olarak plazma, plazmadan zengin trombosit veya kriopresipitat ile geçebilir.

2. ALG veya ATG ile tedavi edilen transplant hastalarında, heterofil antikörleri veya diğer beklenmeyen antikör kaplı hasta eritrositleri ile (+) DAT oluşabilir.

3. Pozitif DAT ile sonuçlanan izoaglutininlerin pasif transferinde IVIG ürünleri sorumlu tutulmuştur. Anti A ve Anti B'de beklenmeyen diğer eritrosit alloantikörleri kadar IVIG preparatlarında saptanmıştır.

4. Pozitif DAT'lar ITP tedavisinde WinRhoSDF alan hastalarda da saptanmıştır.

5. Klinik olarak önemli olmayan Pozitif DAT'lar Rh pozitif bebeklerde sorun olmaktadır. Bebek 28. gestasyon haftasında, Rh İmmünglobulin yapılmış anneden doğduğunda zayıf (+) DAT bulunabilir ve sorun oluşturur.

6. Normalde klinik olarak önemi olmayan pasif olarak geçen antikörler (+) DAT'a neden olur. Fazla miktarda pasif olarak geçen bu antikörler eritrosit yıkımını artırarak klinik yakınmalara neden olabilir (1).

7. Tamada ve ark. ITP için yüksek doz IVIG alan iki hastada iki hafta içinde önemli hemolitik anemi saptadılar. Bunun gibi ABO uygun trombositleri olan plazmada yüksek titrede Anti A veya Anti B, eritrosit yıkımına sebep olabilir (15).

Özet olarak; daha önceki transfüzyon ve ilaç bilgileri değerlendirme için gereklidir. Serolojik sonuçlar ile klinik





bilgiler arasında korelasyon yoksa, klinik olarak önemli antikörler, olağan olmayan veya beklenmeyen reaksiyonlar kan bankası için sıkıntı yaratır.

### **Diğer Antiglobulin Test Yöntemleri**

Klasik tüp yöntemine alternatif olarak kullanılan yöntemler test sonuçlarını okuma ve değerlendirmede daha yararlıdır.

### **Klasik Tüp Yöntemine Alternatif Olarak Kullanılan Yöntemler**

1. Elisa yöntemi (Enzyme-Linked immunosorbent assay)
2. Solid Faz Yöntemi SPRCA (Solid-phase red cell adherence assay)
3. Jel testi (Mikrotyping Gel System)
4. Akım sitometrisi (Flow Cytometer)
5. Direkt Polibren Testi
6. Dot Blot Yöntem

**Elisa Yöntemi:** ELISA yöntemi eritrosite bağlı IgG' nin tespiti, ölçülmesi ve fetomaternal hemorajinin gösterilmesi için kullanılmaktadır. Eritrositler incelendiğinden teste genellikle ELAT (Enzyme-linked antiglobulin test) denir(1-4).

**Solid Faz Yöntemi:** İmmunolojik testlerde kullanılan katı-faz mikropate teknikleri, artık eritrosit antijenlerinin ve antikörlerinin tanımlanmasında da kullanılmaktadır. Direkt testte mikropate kuyucukları antikör ile kaplanmıştır ve eritrositler kuyucuklara eklenir. Eritrositler ilgili antijenlerle kaplı ise kuyucukların kenarlarına yapışır. Eğer antijen-antikör reaksiyonu oluşmazsa, eritrositler kuyucukların dibine düşme şeklinde çöker(1-4).

**Jel Testi:** Jel testi 1986 yılında Lapierre ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Jel sistemi; moleküllerin çaplarına göre tutulması prensipine dayanmaktadır. Test serumu ve / veya reijen eritrositler tüplere tepeden ilave edilir, inkübasyon sonrası tüpler santrifüj edilir. Santrifüj reaksiyon karışımını jel içerisine çeker. Aglutinasyon oluşmuş ise aglutinatlar jel kolonun tepe kısmında tutulur. Büyük aglutinatlar, mikrotüplerin tepesinde toplanırken, daha küçükleri mikrotüplerin daha aşağıdaki bölümlerinde filtre edilirler ve aglutine olmamış hücreler mikrotüplerin taban kısmına çökerler (1-4).

Das ve ark. konvansiyonel tüp testi ile jel testinin

karşılaştırılmasını 170 örnekte yapmışlardır. Polispesifik pozitif örneklerle IgG ve C3d monospesifik testler uygulandığında. 6 örnekte sorun çıkmıştır. Beş örnek Konvansiyonel tüp testinde ve 1 örnek jel testinde belirlenememiştir. Jel testinin hassasiyeti polispesifik testte % 96.4 ve monospesifik testte ise % 95.7 saptanmıştır. Jel testinin eritrosit antikörlerini saptamada iyi bir seçenek olduğu vurgulanmıştır. (16).

Jaiprakash ve ark. 1656 örneğin 1054'ünde IAT pozitif ve 602'sinde DAT pozitifliği saptamışlardır. 587 DAT (+) örneğin (% 97.5) klinik ile uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Jel testinin hassasiyeti bu çalışmada %100, özgünlüğü % 97.3 bulunmuştur (17).

Novaretti ve ark. 1996-2002 yılları arasında 9862 örnekte Jel testi ile konvansiyonel tüp testinin karşılaştırmasını yaptıklarında; jelde hassasiyeti % 100, özgünlüğü % 83, konvansiyonel tüp testinde de hassasiyeti % 50.7, ve özgünlüğü % 97.8 bulmuşlardır.(18).

Courtney ve ark.otokontrol örneklerde jel yöntemi ile Gamma reAct yöntemlerinin hassasiyeti araştırmışlardır. 1116 Otokontrol test örneğinde 79 pozitif sonuç bulmuşlardır. 79 örneğin 72'si Jel testinde pozitif (% 91.13) iken 27'si tüp yönteminde (%34.18) ve 21 i reAct'de pozitif (%26.58) bulunmuştur. Pozitif bulunan 79 örneğin 44'ünde DAT negatif olduğu görülmüştür. (19).

**Akım Sitometrisi:** Özellikle konvansiyonel tüp testi ile saptanamayan düşük düzeydeki antikörleri saptamada jel testi ve akım sitometrisi önerilmektedir. 157 OIHA şüpheli olgunun 50'sinde hemoliz bulguları var, 107'sinde hemoliz bulguları yok. 50 olgunun 5'inde konvansiyonel tüp testi negatif bulunuyor. Bu 5 hastanın dördünde Jel testi, beşinde de akım sitometrisi pozitif bulunuyor. Ortalama akım indeksi (MFI) konvansiyonel tüp testi ile pozitif bulunan hastalarda 18.3+7.78 iken negatif olan hastalarda 7.88+1.35 (p<0.05). Akım sitometrisi DAT negatif hastalarda daha hassas; ancak jel testi akım sitomerisinden önce seçilecek daha kolay bir yöntemdir (20).

**Direkt Polibren Testi:** AIHA tanısında manuel Direkt Polibren Testinin (DPT) yeri araştırılıyor. 18 OIHA, 20 Sağlıklı Donör ve 20 Orak Hücreli Anemide konvansiyonel tüp yöntemi ile DAT bakılıyor. 18 hastanın 14 ünde DAT+ (%78) ve 4 ünde DAT – bulunur iken, DPT 17 sinde pozitif (%94) ve 1 hastada negatif bulunuyor (21).

**Dot Blot Test:** Soid faz tekniğinin nitrosellüloz membranlarda uygulanmasıdır. Anti human IgG kaplı nitrosellüloz membranlar kullanılıyor. Hastanın serum fizyolojik içinde hazırlanmış eritrosit süspansiyonları membranlar üzerine ekleniyor, beş dakika sonra membranlar yıkanıyor ve sonuçlar okunuyor. Pozitif reaksiyonlar kırmızı renge dönüşür iken, negatifler ise beyaz olarak kalıyor. Klasik tüp yöntemi ile iyi korelasyonu olması yanında Dot Blot DAT testi stabilitesi basitliği ve objektivitesi yönünden avantajlı bir yöntemdir (22).

#### Kaynaklar:

1. Lieb MA: Direct antiglobulin testing: Systematic problem solving (Ed:Rudmann SV: Serologic Problem-Solving:A systematic approach for improved practice. AABB Pres. Bethesda, Maryland,2005.
2. D. Quinley E. Immunohematology Principles and Practice. 2nd ed. Lippincott, Philadelphia, New York.1996.
3. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine. 9th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.1993.
4. Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 19th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.1996.
5. Packman CH: Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. Blood Rev. 22(1):17-31, 2008.
6. Bareford D, Longster G, Gilks L, Tovey LA: Follow up of normal individuals with a positive antiglobulin test. Scand J Haematol, 35(3):348-53,1985.
7. Grost DW, Rawlinson VI, Merry AH, Stratton F: Positive direct antiglobulin test in normal individuals. Vox sang, 38(2):99-105, 1980
8. Lau P, Haesler WE, Wurzel HA: Positive direct antiglobulin reaction in aptient population. Am J Clin pathol. 65(3):368-75,1976.
9. Froom P, Neck A, Shir M, Haavis R, barak M: Automatic laboratory initiated reflex testing to identify patients with autoimmune hemolytic anemia. Am J Clin Pathol,124(1):129-32,2005.
10. Johnson ST, Fueger JT, Gottschall JL: One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia- a new paradigm. Transfusion, 47(4):697-702, 2007.
11. Dearden C, Wade R, Else M, Richards S, Milligan D, Hamblin T, Catovsky D.: The prognostic significance of a positive direct antiglobulin test in chronic lymphocytic leukemia: a beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of hemolytic anemia. Blood,111(4):1820-6,2008.
12. Biswas S, Seth R, Sharma G, Dash A: A longitudinal investigation of plasmodium falciparum malaria in children in norththern India. Scand J Infect Dis. 40(2):159-66,2008.
13. Abdalla S, Weatherall DJ: The direct antiglobulin test in P. Falciparum malaria. Br J Haematol 51(3):415-25,1982.
- 14.Burin des Roziere N, Squalli S: removing IgG antibodies from intact red cell: comparison of acid and EDTA, heat and chloroquine elution methods. Transfüzyon, 37(5):497-501, 1997.
15. Tamada K, Kohga M, Masuda H, hattori K: Hemolytic anemia following high doze intravenous immunglobulin administration. Acta Paediatrica Japonica. 37:391-3,1995.
16. Das SS, Chaudhary R, Khetan D: A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test. Hematology, 12(2):175-8, 2007.
17. Jaiprakash M, Gupta PK, Kumar H: Role of gel based technique for Coomb's test. Indian J Pathol Micr., 49(3):370-2, 2006.
18. Novaretti MC, Jens E, Pagiarini T, Bonifacio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA: Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. J Clin Lab Anal, 18(5): 255-8, 2004.
19. Courtney JE, Vincent JL, Indrikovs AJ: Tube and column agglutination technology for autocontrol testing. Immunohematology, 17(2):50-52, 2001.
20. Chaudhary R, Das SS, Gupta R, Khetan D: Application of flow cytometry in detection of red cell bound IgG in Coombs negative AIHA. Hematology, 11(4):295-300, 2006.
21. Braga GW, Bordin JO, Moreira Junior G, Kuroda A: Laboratory diagnosis of autoimmune hemolytic anemia: characteristics of the manual direct test of polybrene. Rev Assoc. Med Bras, 44(1): 16-20, 1998.
22. Plapp FV, Rachel JM, Sinor LT: The dot blot direct antiglobulin test. Am J Clin Pathol, 88(6): 733-8,1987.

\*SDÜ Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji BD, Antalya Devlet Hastanesi Talasemi Merkezi Başkanı, Talasemi Federasyonu Genel Başkanı, Antalya dcanatan@superonline.com

# Direkt Antiglobin Test Pozitifliğinin Klinik Durumları

► Prof. Dr. Duran Canatan\*

Direkt Antiglobulin Test (DAT) pozitifliği her zaman immün hemolitik anemiye yansıtmadığı gibi, tersine DAT negatifliği de immün hemolitik anemiye elimine etmez. Hastanın klinik durumu hemolitik durumunu düşündürürse, immünglobulin veya komponentleri bağlayan otoantikörlerin saptanması ile oluşan DAT pozitifliği tanıda değerli bir araçtır.

Kan bankacıları DAT (+)'liği ile ilgili klinik durumları hatırlamalıdır:

1. Sağlıklı bireylerde edinsel olarak geçen pasif antikörlerin yaptığı pozitif testler klinik olarak önemli olmayan olgularda düşünülür.
2. Alıcıda bulunan alloantikörler antijenle karşılaştığında gecikmiş hemolitik transfüzyon reaksiyonlarına yol açabilir.
3. Maternal hücreler ile kaplanmış hassas fetal hücreler plasentayı geçerek yenidoğan hemolitik hastalığına yol açar.
4. Transfüzyona bağlı kan grubuna özgün otoantikörler (Örneğin E, K veya Jka) hernekadar var ise de genellikle belirgin hemoliz gözlenmez.
5. İlaça bağlı DAT pozitifliği birkaç mekanizma ile oluşmaktadır:
  - a. Kırmızı küre yüzeyine direkt bağlanarak antikör oluşturma, (Örnek: Penisilliner)
  - b. İlaç-anti ilaç kompleksi gibi immün kompleksler oluşturma, (Örnek: Knidin)
  - c. Kırmızı küre membranını modifiye ederek antikör oluşturma, (Örnek: Sefalosporinler)
  - d. İlaça bağlı otoimmünite oluşturma, (Örnek: Metildopa)

## Rh Tipleme Farklılıkları

Otoaglutininler DAT pozitifliğine sebep olduğunda hastanın uygun kan tipini belirlemek zor olabilir.

Yalancı pozitif Rh tipleme genelde yüksek protein oranında (%20-24) ve Rh tipleme serasındaki immünglobulin kaplı kırmızı küreler olduğu zaman gözlenmiştir. Eğer uygun kontrol örnekleri kullanılmaz ise yalancı Rh pozitif yorumuna yol açar.

Spontan aglutinasyona bağlı yanlış yorumdan kaçınmak

için Anti-D ile test edilmiş kontrol olarak kullanılacak ticari re ajanlar kullanılmaktadır.

1. Eğer kontrol ve test pozitif ise Rh tipleme geçersizdir. Pozitif DAT sonucu veren hastanın kırmızı küreleri düşük protein kullanılarak tekrar test edilir.

2. Eğer soğuk aglutininler veya anormal proteinler (rulo formasyonu) içeren örnek test edilirse düşük proteinli ortamlarda da yalancı pozitif sonuç verir.

3. Eğer Rh tipleme, diğer testler (ABO tipleme) ile beraber yapılırsa paralel reaksiyon nedeni ile yalancı Rh tiplemeden kaçınmak için Rh tipleme bağımsız olarak kontrol edilmelidir. Bu kontrol ya ticari olarak hazırlanmış hasta serumu ile veya %6-8 lik bovin albümin ile yapılır. Spontan aglutinasyon durumlarında monoklonal Rh tipleme re ajanları düşük proteinli dilüentle hazırlanır, pozitif DAT sonuçlarını kontrol etmek için kullanılır.

4. Zayıf D Antijenini test etmek için kullanılan İndirekt Antiglobulin Test işlemi, pozitif DAT'lı kişilerde yapılamayabilir. Eğer zayıf D antijen mevcut ise, fetalmaternal kanamada kullanıldığı gibi immünglobulin kaplamayı ayırma veya rozet testi gibi özel teknikler kullanılmalıdır.

5. Eğer soğuk reaktifli IgM'nin neden olduğu spontan aglutinasyon var ise, Rh tipleme yapılmadan önce örnek 37°C'de bekletilir ve 37-45 °C'lik ılık tuz ile yıkanır. Ilık tuzlu su ile yıkama işlemi başarılı olmaz ise, IgM moleküllerini kırmızı kürelerden ayırmak için tiol re ajanları kullanılır.

## Genişlemiş Test İşlemi

Pozitif DAT testinin daha ileri serolojik değerlendirilmesi, hekimin hemolitik anemi tanısına veya transfüzyon işleminin güvenilirliğine yardım etmek için kullanışlıdır. Bir pozitif DAT'ni araştırmak için serolojik problem çözme yolları şunlardır.

1. Polispesifik AHG
2. Monospesifik AHG
3. Serum çalışmaları
4. Elüsyon işlemleri

Hastanın tanısı, transfüzyon ve gebelik öyküsü, ilaç



tedavisinin pozitif DAT üzerine etkisi ve daha ileri testler düşünülmelidir.

Transfüzyon ve gebelik öyküsü yok ise, klinik hemoliz bulguları yok ise, hastanın klinik tedavisine katkı sağlamayacağı için eluat işlemi gereksizdir ve zaman kaybıdır.

Hastanın klinik durumu veya öyküsü hemolitik durumu düşündürüyor ise, negatif DAT sonucunda, daha ileri işlemler yerine, hastanın kırmızı kürelerinden bir eluat işlemi hazırlanması tanı için önemlidir.

Daha ileri işlemler yalnız test sonucu için değil hastanın bilgisi için de yapılır. Hangi işlem yapılacağı aşağıdaki durumlara göre düşünülmelidir.

1. İn vivo hemoliz belirtisi
2. Anemi derecesi ve transfüzyon gereksinimleri
3. Yakın zamanda yapılmış tipe spesifik eritrosit ve / veya ABO uygun olmayan plazma komponent transfüzyonları
4. Üç aydan önce yapılmış transfüzyonlar
5. Serumda beklenmeyen antikorlar
6. Bilinen veya bilinmeyen ilaçlar
7. Özel işlemler veya tedaviler (Transplantasyon, ALG, ATG)
8. Hastanın tanısı

Bir çok transfüzyon servisleri ve referans immünohematoloji laboratuvarları karar verme aşamasında, hastanın kan bankası kayıt formunu ve serolojik çalışmalarının ön sonuçlarını kullanır. Ek 3-1'de bilgi toplamak için kullanılan bir Örnek Form gösterilmiştir. Hastanın bilgilendirme durumu ve onam formunu da içeren bir çok faktörler bu formda bulunur.

### Kırmızı Küre Elüsyon Teknikleri

Elüsyon testleri DAT pozitifliği veya negatifliğinde problemi çözmek için yapılır. Kırmızı küre elüsyon işlemleri kırmızı küre membranındaki antikorları saptamak ve taramak, antikorların çıkarılması ve iyileştirilmesi amacı ile kullanılır.

Antikorları antijenlerden ayırmak için, ısıtma, dondurup-eritme, pH değişikliği, organik solventler veya yüksek tuz konsantrasyonları kullanmak gibi bir çok yöntemler geliştirilmiştir. Bazı örneklerde elüsyon işlemi spekülattır. Bununla beraber tüm tekniklerde ya termodinamik

değişiklikler ile (ısıtma veya dondurma) veya nötralizasyon ile veya antijen antikor kompleksinin ayrılmasının zorlanması ile veya antijen antikor bağlanma yerlerindeki yapısal değişiklikler ile antikor serbest bırakılır.

Judd, elüsyon işlemlerine teknik ve teorik bir yaklaşımla geniş bir tartışma sağladı. AABB Teknik Manuel, yöntem seçiminde bir çok elüsyon işlemi sağlıyor. Ticari firmalar gerekli re ajanları içeren kullanımı kolay ve takibi basit hazır elüsyon kiti hazırladılar.

### Elüsyon İşlem Seçimi

Kan bankacı elüsyon işlemi yapacağı zaman, pozitif DAT'a sebep olan antikoru düzeltecek çok etkili bir yöntem seçmelidir (Tablo1).

**Tablo 1. Kırmızı Küre Elüsyon Yöntemleri**

| Yöntem          | Antikor iyileştirme      | Tehlike? | Süre (sn) | Yorum                                                            |
|-----------------|--------------------------|----------|-----------|------------------------------------------------------------------|
| Isı (56C)       | ABO                      | Yok      | 15        | Kolay; IgG antrikorlarının zayıf iyileştirmesi                   |
| Lui Dondur-Erit | ABO                      | Yok      | 15        | Kolay; IgG antrikorlarının zayıf iyileştirmesi                   |
| Digitonin Asit  | Sıcak oto ve alloantikor | Yok      | 15        | IgG antrikorlarının iyi iyileştirmesi, jka için zayıf hassasiyet |
| Soğuk Asit      | Sıcak oto ve alloantikor | Yok      | 15        | Kolay; IgG antrikorları için zayıf hassasiyet                    |
| Çabuk Asit      | Sıcak oto ve alloantikor | Yok      | 15        | Kolay; IgG antrikorlarının iyi iyileştirmesi                     |

Örnek büyüklüğü, zaman, fiyat, teknik deneyime göre yöntem seçimi yapılır. Antikor iyileştirme için bir çok elüsyon teknikleri geliştirilmiştir. Bazıları daha basit, daha güvenli ve daha kullanışlıdır.

South ve arkadaşları farklı elüsyon tekniklerini değerlendiren ve karşılaştıran bir çalışma yaptılar. Tüm ortamlarda çalışan tek bir yöntem yoktur.

Bir işlem yapıldığında sonuçlar tatmin edici değilse kan bankacı başka bir yöntem düşünülmelidir. Son transfüzyon sonrası gelişmiş sıcak reaksiyon veren IgG otoantikorları ve alloantikorlarını iyileştirmek için çabuk asit, digitonin asit veya soğuk asit yöntemlerini kullanmak gerekir. İyileştirmede eter ve kloroform etkilidir fakat kullanım ve depo kısıtlamalarından dolayı genelde kullanılmaz.

Eğer pozitif DAT'tan transfüzyon veya gebelik ile pasif olarak geçen ABO izoaglutininleri sorumlu ise 56 °C'de ısıtma veya Lui Dondur-Erit yöntemi uygundur.

Tüm elüsyon yöntemleri teknik bağımlıdır. Test edilen kırmızı küre örneğinin kalitesi kadar uygun yıkama sonuçları da eluatı etkiler.



1. Üç günden fazla saklanmış kırmızı kürelerden daha az potent eluat sağlanır.

2. Antikor titresi yüksek ise, eluat hazırlamada uygun yıkama işlemi kritiktir. Uygun yıkamayı göstermek için, son yıkama solüsyonu negatif kontrol ile aynı zamanda test edilmelidir. Eğer son yıkama solüsyonunda antikor mevcudiyeti var ise test geçersizdir. Proteinler cama bağlanabildiği için eluat öncesi yıkanmış kırmızı küreler temiz tüplere aktarılmalıdır.

3. IgM antikorlarında ve düşük affiniteli IgG antikorlarında son yıkamadan sonra oda ısısında antikorlar ayrılabilmesi için soğuk tuzlu solüsyon ile (4 °C) veya düşük iyonik solüsyonlar ile işlem yapılmalıdır.

4. Eğer organik solventler uygun bir şekilde depolanmaz ise pH değişiklikleri eluatı etkiler.

5. Uygun teknik ile artık asitler ve kimyasallar çıkarılamaz ise hemolize neden olur.

6. Sonuç olarak tuzlu suda hazırlanmış bir eluat unstabil olduğundan hemen test edilmelidir. Eluata protein (bovin albümin) eklenerek son konsantrasyon %6'lık hazırlanır daha sonraki testler için dondurularak saklanabilir.

Eluat intakt kırmızı kürelerden veya kırmızı küre stromasından hazırlanabilir. Elüsyon çalışmaları için kırmızı küre hazırlandığında iyileştirilmeyen hücrelerin küçük volümde olması önerilir. Elüsyon işlemi ile IgG'ler çıkarıldıktan sonra otolog serum adsorbsiyonu veya antijen fenotiplendirilmesi için kullanılır. Çünkü elüsyon bir konsantrasyon işlemidir. Kırmızı kürelerden iyileştirilerek çıkarılabilen antikorlar zayıf veya negatif DAT sonuç verir. Pozitif DAT'lı (+2 veya daha fazla) hücrelerde antikor iyileştirmesini artırmak için elüsyon işlemi öncesi hücrelere tuz veya albümin eklenir.

### Elüsyon İşlemi

Eluat test edildiğinde bir indirekt antglobulin testi uygulanmalıdır. Eğer allo ve / veya oto antikorlardan şüphelenilirse, eluat O grubu tarama veya panel hücreleri test edilebilir.

Eğer ABO gruba özgün olmayan plazma transfüzyonları veya ABO yenidoğan hemolitik hastalığında pasif olarak geçen Anti-A ve Anti-B mevcut ise, ortama A ve B kırmızı küre hücreleri eklenir.

Bazan kordon kanı hücreleri, maternal IgG antikor yapımının sonucu olarak, düşük sıklıkta antijen mevcudiyetinde pozitif DAT sonucu verir. Ticari tarama hücreleri ile test edildiğinde eluat genellikle reaksiyon

vermez. Bundan dolayı bilinen düşük sıklıktaki antijeni olan panel hücreleri ve /veya paternal kırmızı küreler test için kullanılır.

İlaçlar pozitif DAT'a neden olduğu zaman, eğer eluat ilaç olmayan hücreler ile aglütinasyon olmadığını gösterirse, ya ilaçla tedavi edilmemiş kırmızı küreler veya ilaçla tedavi edilmiş kırmızı küreler test edilmelidir.

Eluat: test hücre oranı artırılarak (3-4 damla eluat bir damla hücre şeklinde) eluat reaktivitesi artırılabilir. AHG eklenmeden önce fazla eluat eklenmesi inkübasyon sonrası fazladan yıkama gerektirebilir.

Eğer eluat miktarı sınırlı ise kırmızı kürelerdeki tuz konsantrasyonu %2'ye kadar azaltılabilir veya PEG gibi bir kuvvetlendirici ortama eklenir. PEG eklenmiş ticari kitlerde kuvvetlendirici ve eluat oranı 1:1 dir. PEG kullanıldığında elautla inkübasyondan sonra kırmızı küreler tuzlu su ile en az üç defa yıkanmalıdır.

Son transfüzyon ve ilaç öyküsü ile korele olmuş serum çalışmalarında eluatın daha ileri testi gerekir. Eğer öykü yok veya sağlanamaz ise, başlangıç test panel hücreleri ile antikor tarama hücreleri tercih edilebilir.

Eğer endikasyon var ise, bilinen fenotipli panel hücreleri ile test yapılması, hem eluat hem kan bankacının zamanının kullanımı açısından önemlidir.

Gecikmiş hemolitik transfüzyon reaksiyonuna neden olan alloantikor yapımında veya yenidoğan hemolitik hastalığına yol açan antikorun elüsyonunda tam bir performans için ticari kırmızı küre paneli daha uygundur.

Antikor spesifik eluat saptandığı zaman, ek alloantikorların mevcudiyeti elimine edilmelidir. Eluat preparasyonlarının testinde dozaj sunulabilir. Eğer başlangıç kırmızı küre panel testi ile kırmızı küre antikorları elimine edilemiyorsa spesifik antijenlerden oluşturularak seçilmiş bir panel, antikorlarını elimine etmek için test edilmelidir.

Serum ile eluatlar çoklu antikor özellikleri sunabilir, serumdan ayrılan antikor spesifikleri (örneğin Anti Jka), eluatta iyileştirilmiş antikor spesifiklerden (Örneğin Fyb) ayırt edilebilir.

*\*SDÜ Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji BD, Antalya Devlet Hastanesi Talasemi Merkezi Başkanı, Talasemi Federasyonu Genel Başkanı, Antalya dcanatan@superonline.com*

## TRIM

► Dr. S. Haldun Bal\*

Allogeneik Kan Transfüzyonu (AKT) hayat kurtarıcı olduğu kadar önemli komplikasyonları da olan bir uygulamadır. Bu komplikasyonlar kabaca Hemolitik ve Hemolitik olmayan şeklinde ikiye ayrılabilir. Bu komplikasyonların en önemlilerinden biri olan ve hemoliz yapmayan grupta bulunan transfüzyon sonucu gelişen immün değişiklikler, bugüne kadar nedeni ve mekanizması tam olarak aydınlatılamamış bir fenomen durumundadır. Bu durum **Transfüzyon İlişkili İmmün Düzenlenme** (Transfusion Related Immunomodulation-TRIM) olarak tanımlanmaktadır.

İlk kez bundan 40 yıl önce dikkati çekmiştir. Opelz ve arkadaşları renal transplantasyon için beklemekte olan hemodiyaliz hastalarında, transplantasyon öncesi AKT alanların renal allograft sağ kalımının almayanlara göre daha yüksek olduğunu rapor edilmişlerdir (1). Bu durum, AIDS pandemisi kendini gösterene kadar, transplant hastalarına bir veya birkaç ünite AKT yapılmasını standart bir işlem haline dönmüştür. Bu yararlı etki bugüne kadar geçen süreçte çeşitli klinik deneyimler, gözlemsel çalışmalar ve hayvan deneyleriyle doğrulanmış, ancak randomize kontrollü çalışmalarla desteklenememiştir. Daha sonraki zamanda, AKT'nin, artmış kanser rekürrensi ile ilişkisi belirlenmiş, küratif cerrahiye giden ve cerrahi öncesi AKT alan hastaların bu uygulamadan olumsuz olarak etkilenebildikleri, tümör büyümesinin ve metastaz gelişiminin hızlanabildiği ifade edilmiştir (2). Öte yandan çok sayıda gözlemsel çalışma postoperatif bakteriyel enfeksiyon riskini de artırdığını ortaya koymuştur (3). Yine gözlemsel çalışmalardan bazıları, Chron hastalığı rekürrensini (4) ve tekrarlayan spontan abortusları olan kadınlarda düşük riskini azaltarak (5) olumlu sonuçlar oluşturduğunu ifade ederken, bazıları da, latent HIV ya da CMV enfeksiyonu aktivitesini artırarak (6) olumsuzluklar doğurduğunu ifade etmiştir. Tüm bunlara bakıldığında TRIM biyolojik bir fenomendir ve AKT alan hastalar almayanlara göre çok sayıda olumsuz prognostik faktöre sahip olmaktadır (7). Nedenine ve oluş mekanizmasına yönelik gizemini korumakta olan bu fenomen, transfüzyondan sonraki dönemde ortaya çıkan çeşitli değişikliklerin nedeni olarak gösterilmektedir. Ancak, klinisyenlerin hastada görülen semptom ve bulguları transfüzyonla ilişkilendirememesi nedeniyle görülme sıklığı

tam olarak bilinmemektedir

AKT alıcıda ya alloimmünizasyona ya da immün toleransa neden olabilmektedir. AKT ile alıcıya, aralarında HLA-DR antijenlerinin de bulunduğu çok sayıda Ag geçer ve bu Ag'lerin alıcıda bulunup bulunmamasına göre de AKT'yi takiben alloimmünizasyon veya immün süpresyonun oluşup oluşmayacağına karar verilir (8). Genellikle, alıcı ile bağışçı arasında en azından bir HLA uyumu söz konusu olduğunda immün supresyon (tolerans) tetiklenirken, tam uyumsuzlukta alloimmünizasyonun tetiklendiği görülmüştür (9). Alıcı ve bağışçı arasındaki HLA-DR uyumu derecesine ek olarak, hücresel ve çözünür HLA Ag'lerinin immünojenitesi, bağışçı immün sisteminin bazı özelliklerine de bağlıdır. Bağışçı antijen sunan hücreleri (ASH) ve eş uyaran varlığı gibi çeşitli etkenler de gelişecek immün yanıtın şeklini belirlemede etkili olabilmektedir. Sonuçta mekanizması ne olursa olsun immün sistemde bir takım değişiklikler oluşmaktadır ki, TRIM tablosu gelişebilsin. AKT, immün sistemde sıklıkla aşağıdaki değişikliklere yol açmaktadır (10, 11).

- Azalmış Th sayısı
- Azalmış Th/T supresör oranı
- Mitojenlere azalmış T hücre yanıtı
- Azalmış NK hücre fonksiyonu
- Geç tip hipersensitivitede azalma
- Defektli Ag sunumu
- Lenfosit blastogenezinde baskılanma
- Azalmış sitokin (IL-2, IFN-γ) üretimi
- Azalmış monosit/makrofaj fagositik fonksiyonu
- Artmış antiidiyotipik-Ab ve antiklonotipik-Ab üretimi

Bu bulgular, T hücre yanıtının Th1'den Th2'e dönüştüğünü bu nedenle TRIM tablosu geliştiğini düşündürse de, bu durum bütün tabloyu açıklamakta yeterli olamamaktadır. Başka bir takım mekanizma, hücre veya moleküllerin daha rol oynuyor olması yüksek olasıdır. Tablonun temel nedenleri ve oluş mekanizmalarındaki belirsizliklerin günümüze değin netleştirilememesi konuya ilgiyi canlı tutmaktadır. Bu güne kadar yapılmış çok sayıda çalışmayla, depolanma sürecinde devamlı olarak biriken immünolojik mediyatörlerin immün modülasyonu şiddetlendirdiği gösterilmiştir (12-15).

- Sınıf II HLA molekülü taşıyan allojeneik lökositler (16),
- Allojeneik dendritik hücreler (17),
- Histamine, eozinofil katyonik protein, eozinofil protein X, myeloperoksidaz, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 gibi biyolojik yanıt düzenleyiciler (15),
- Çözünür Fas ligand (18),
- Çözünür HLA sınıf I moleküller (19),
- Sitokinler (20, 21),
- Treg hücreler (22),
- Mikrokimerizm (23, 24) vb çok sayıda farklı mediyatör bu konudaki araştırmalara konu edilmiştir.

Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar topluca değerlendirildiğinde, mediyatörler 3 başlık altında toplanabilmektedir (25);

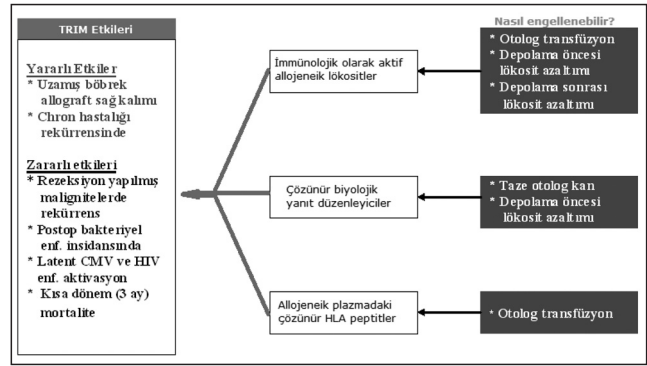
1. Kan bileşeni içerisinde bulunan mononükleer hücreler
2. Bunlardan salgılanan biyolojik yanıt düzenleyiciler
3. HLA sınıf I gibi bazı çözünür moleküller

Bu 3 başlık, kan ürünlerinin lökosit azaltılmış olarak transfüzyonunun bu tabloyu engelleyebileceğini düşündürmektedir. Ancak lökoredüksiyonun ürün hazırlama aşamasında yapılmalıdır. Şekilden de anlaşılacağı gibi hastabaşı lökoredüksiyon (LR) yalnızca kan bileşeni içerisinde bulunan mononükleer hücreleri yok edecek, depolanma sürecinde salgıladıkları mediyatörler için engel oluşturmayacaktır. Ancak, depolama öncesi yapılacak lökoredüksiyon hem kan bileşeni içerisinde bulunan mononükleer hücreleri, hem de salgıladıkları mediyatörleri azaltacak ya da ortadan kaldıracaktır. Bu nedenle uygulanması gereken yöntem **depolanma öncesi lökoredüksiyondur**. Lökoredüksiyonun TRIM gelişimini engeleyemediğini, bir önlem olamayacağını bildiren çalışmalar varsa da (26), şu an için olog transfüzyon ve lökosit azaltılmış kan bileşeni transfüzyonu dışında yapılabilecek başka bir önlem de bulunmamaktadır.

Gelişmiş ülkelerde transfüze edilen bütün kan ve kan bileşenleri lökosit azaltılmış (üniversal lökoredüksiyon) olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden, bu ülkelerde TRIM'e yönelik çalışmaların yapılması kolay olmamaktadır. Fenomenin aydınlatılabilmesi için yapılacak çalışmalarda, içeriğinde lökosit bulunan ürünler kullanılması gerekmektedir. Ülkemiz gibi üniversal lökoredüksiyon

uygulanmasını benimsememiş ülkeler bu araştırmalar için uygun yerleri oluşturmaktadır. Üniversal lökoredüksiyonun ülkemizde uygulanmasının gerekli olduğunu düşünmekle birlikte, bu konuda yapılacak araştırmalar için yeterli kaynağın ülkemizde bulunabiliyor olmasını tek sevindirici yanıımız olarak görebiliriz.

Şekil: TRIM'in etkileri, mediyatörleri ve önlemler



### Kaynaklar

1. Opelz G, Sengar DP, Mickey MR, Terasaki PI., Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants, Transplant Proc, 5, 253–259, (1973).
2. Gantt CL., Red blood cells for cancer patients, Lancet, 2, 363, (1981).
3. Blumberg N, Heal JM., Effects of transfusion on immune function: cancer recurrence and infection, Arch Pathol Lab Med, 118, 371–379, (1994).
4. Peters WR, Fry RD, Fleshman JW, Kodner IJ., Multiple blood transfusions reduce the recurrence rate of Crohn's disease, Dis Colon Rectum, 32, 749–753, (1989).
5. Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, Reginald PW, Underwood JI, Beard RW., Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal cells, Lancet, 1, 941–943, (1985).
6. Vamvakas EC., Blajchman MA., Immunomodulatory Effects of Blood Transfusion, ed: Bethesda MD., AABB Press, (1999). Pp: 295.
7. Vamvakas EC, Moore SB., Blood transfusions and postoperative septic complications, Transfusion, 34, 714–727, (1994).
8. Lagaaij EL, Ruigrok MB, van Rood JJ, et al., Blood transfusion induced changes in cell-mediated lympholysis: to immunize or not to immunize, J Immunol, 147, 3348–3352, (1991).
9. Roelen DL, van Rood JJ, Brand A, et al.,





Immunomodulation by blood transfusions, *Vox Sang*, 78, 273–275, (2000).

10. Brunson ME, Alexander JW., Mechanisms of transfusion-induced immunosuppression, *Transfusion*, 30, 651–668, (1990).

11. Blajchman MA, Bordin JO., Mechanisms of transfusion-associated immunosuppression, *Curr Opin Hematol*, 1, 457–461, (1994).

12. Kristiansson M, Soop M, Shanwell A, Sundqvist KG., Prestorage versus bedside white blood cell filtration of red blood cell concentrates: effects on the content of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptors, *J Trauma*, 40, 379–383, (1996).

13. Mynster T, Dybkjoer E, Kronborg G, Nielsen HJ., Immunomodulating effect of blood transfusion: is storage time important?, *Vox Sang*, 74, 176–181, (1998).

14. Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, et al., Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model, *J Clin Invest*, 101, 1458–1467, (1998).

15. Nielsen HJ, Reimert CM, Pedersen AN, et al., Time-dependent, spontaneous release of white cell- and platelet-derived bioactive substances from stored human blood, *Transfusion*, 36, 960–965, (1996).

16. Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA., Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products, *Blood*, 84, 1705–1721, (1994).

17. Clark DA, Gorczynski RM, Blajchman MA., Transfusion-related immunomodulation due to blood dendritic cells expressing the CD200 tolerance-signaling molecules and alloantigen, *Transfusion*, 48, 814–821, (2008).

18. Puppo F, Contini P, Ghio M, et al., Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas-ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8+ Fas (CD95)+ T lymphocytes, *Intern Immunol*, 12, 195–203, (2000).

19. Magee CC, Sayegh MH., Peptide-mediated immunosuppression, *Curr Opin Immunol*, 9, 669–675, (1997).

20. Ghio M, Ottonello L, Contini P, et al., Transforming growth factor-beta-1 in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion, *Blood*, 102, 1100–1107, (2003).

21. Hodge G, Markus C, Nairn J, et al., Effect of blood storage conditions on leucocyte intracellular cytokine production, *Cytokine*, 32, 7–11, (2005).

22. Baumgartner JM, Silliman CC, Moore EE, et al., Stored red blood cell transfusion induces regulatory T

cells, *J Am Coll Surg*, 208, 110–119, (2009).

23. Beko KR, Tran HO, Hewitt CW, et al., Mechanisms of prior blood transfusion-cyclosporine-induced tolerance: a potential role for immune-cellular chimerism, *Transplant Proc*, 23, 147–148, (1991).

24. Dzik WH., Mononuclear cell microchimerism and the immunomodulatory effect of transfusion, *Transfusion*, 34, 1007–1012, (1994).

25. Vamvakas EC, Blajchman MA., Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update, *Blood Rev*, 21, 327–348, (2007).

26. Collier A, Kalish L, Busch M., Leukocyte-reduced red blood cell transfusions in patients with anemia and human immunodeficiency virus infection: the Viral Activation Transfusion Study: a randomized controlled trial, *JAMA*, 285, 1592–1601, (2001).

\*Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi,  
Bursa

# Bakteri Tespit Yöntemleri ve Patojen İnaktivasyon

► *Uzm. Dr. N. Banu Pelit\**

Kan ve kan bileşenleri transfüzyonunun pek çok istenmeyen etkisinin olduğu bilinmektedir. Transfüzyon tıbbının temel hedefi; bu olumsuz etkileri en aza indirmek ve güvenli kanı sağlayarak transfüzyon güvenliğini en üst düzeye taşımaktır. Transfüzyona bağlı istenmeyen etkiler, transfüzyon uygulamalarının %1-3'ünde akut transfüzyon reaksiyonu şeklinde ya transfüzyon sırasında ya da hemen sonra (ilk 24 saat) karşımıza çıkmaktadır. Geç etkiler ise bağışçısı grubunda enfeksiyonun yaygınlığı, hastanın primer hastalığı ya da hastanın taburcu olduktan sonra izlenebilirliği gibi faktörlere bağlı olarak farklı oranlarda gözlenmektedir. Transfüzyona bağlı istenmeyen etkilerin %20 oranında görüldüğü tahmin edilmekte ve bunların yaklaşık %0,5'inin ciddi olduğu belirtilmektedir. Tahminlerin kesin sonuçlara dönüşebilmesi için bu etkilerin belli ulusal organizasyonlara

bildirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi gereklidir.

Transfüzyon komplikasyonları immünolojik ve immünolojik olmayan şeklinde iki temel kategoride incelenir. İmmünolojik olmayanlar içerisinde mortalite ve morbidite açısından üzerinde en çok durulan komplikasyon enfeksiyon bulaşmasıdır. Enfeksiyon bulaşması, bakteri, virüs, protozoa ya da prion bulaşı şeklinde olabilir. Tablo 1'de 1996-2007 yılları arasında SHOT'un (Serious Hazards of Transfusion, UK) transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlara ilişkin kümülatif verileri yer almaktadır. Bulaşan enfeksiyonu tedavi etmek her zaman mümkün olmayacağından temel olan; bulaşmayı önlemektir. Kanın güvenilirliğini sağlamak için ya spesifik testlerle önemli ajanlar taranır ya da bu ajanlar yok edilmeye çalışılır.

Tablo 1. Transfüzyonla Enfeksiyon Bulaşı, 1996-2007 SHOT Kümülatif Verileri\*

|         | 1996-1997 | 1997-1998 | 1998-1999 | 1999-2000 | 2000-2001 | 2001-2002 | 2002-2003 | 2003-2004 | 2004-2005 | 2005-2006 | 2006-2007 | Toplam | Enfeksiyona bağlı ölüm | Major Morbidite | Minör Morbidite |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|------------------------|-----------------|-----------------|
| Bakteri | 3         | 1         | 6         | 5         | 4         | 5         | 3         | 0         | 2         | 2         | 3         | 34     | 8                      | 23              | 3               |
| HAV     | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 0         | 1         | 0         | 0         | 3      | 0                      | 2               | 1               |
| HBV     | 1         | 2         | 2         | 1         | 1         | 0         | 2         | 0         | 1         | 0         | 0         | 10     | 0                      | 10              | 0               |
| HCV     | 1         | 0         | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 2      | 0                      | 2               | 0               |
| HIV     | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1      | 0                      | 0               | 0               |
| HEV     | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 1         | 0         | 0         | 0         | 2      | 0                      | 2               | 1               |
| HTLV    | 1         | 0         | 0         | 0         | 1         | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 2      | 0                      | 2               | 0               |
| Malarya | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 0         | 0         | 0         | 0         | 2      | 1                      | 1               | 0               |
| Prion   | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 0         | 0         | 0         | 1      | 0                      | 1               | 0               |
| vCJD    | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 0         | 1         | 0         | 1         | 1         | 0         | 3      | 3                      | 0               | 0               |
| Toplam  | 8         | 3         | 9         | 6         | 6         | 6         | 9         | 2         | 5         | 3         | 3         | 60     | 12                     | 43              | 5               |

\*:www.hpa.org.uk/infections/topics\_az/BBID/menu.htm

Pek çok ülkede zorunlu tarama testleri arasına NAT'ın dahil edilmesiyle transfüzyonla viral enfeksiyonların bulaşma ihtimali gelişmiş ülkelerde 1:106 düzeyine indirilebilmiştir. Diğer taraftan hücresel kan bileşenlerinin yaklaşık 1:3000'i bakterilerle kontamine olabilmekte; klinik reaksiyon görülme sıklığı ise ortalama 1:25 000 trombosit süspansiyonu ile 1:250 000 eritrosit süspansiyonu olarak bilinmektedir. Tablo 1'deki İngiltere'nin verilerine ek olarak bakterilerle kontamine kan bileşeni transfüzyonu sonrası gelişen reaksiyonun %24-60 oranında fatal olduğu ve ABD'nde her yıl 100-150 kişinin bu reaksiyona bağlı öldüğü ya da ciddi morbidite gözlemlendiği bildirilmektedir.

Kan alma işlemi sırasında cilt florasının kan bileşenini kontamine edebildiği yıllardır bilinmektedir. Kan bileşenlerinin bakteriyel kontaminasyonu sonucu septik reaksiyon, hemolitik reaksiyonların ardından transfüzyona bağlı ölüm nedenleri arasında %10'un üzerinde bir oranla

ikinci sırada yerini almıştır. Reaksiyon transfüzyonun hemen başında, sonlarında ya da bittikten kısa süre sonra, çoğu kez titreme, ateş ve bazen hipotansiyon, bulantı, kusma, oligüri, şok, respiratuar semptomlar veya DİK'e bağlı kanamalarla seyredebilmektedir. Bileşen içerisinde az sayıda bakteri varlığında klinik olarak bir reaksiyon görülmeyebilir, ancak transfüzyon uygulamalarında ateşin 2°C ve üzerinde yükselişi septik transfüzyon reaksiyonu lehinedir.

Bakterinin kan bileşenine girişi: asemptomatik enfekte bağışçının kanı, bağışçının cilt florası, kan alma görevlisindeki enfeksiyon, çevre (hava, su, ekipman), nadiren de kan torbaları yoluyla olmaktadır. Bakterinin tipi giriş yolu hakkında bilgi vermektedir. Örneğin: S.epidermidis bağışçının cilt florasını düşündürürken, Pseudomonas çevreden bulaş olduğunu akla getirmelidir. Bulaşın önlenmesi için izlenecek yol Tablo 2'de özetlenmiştir.

Septik transfüzyon reaksiyonlarına oda ısısında saklanması



Tablo 2. Transfüzyona bağlı sepsisi önleme stratejileri:

**A. Bakteriyel kontaminasyonu önlemek:**

- Dişle ilgili girişi/gastroenteriti olan bağışçıları ertelemek
- Damara giriş noktasının temizliğine dikkat etmek
- Kan torbası ve iğnesini bir kez (steril olarak) kullanmak
- Kan torbasını uygun şekilde saklamak
- Kan alan kişinin el yıkamasını sağlamak
- Kan alma işleminde ilk 15-30 ml'nin kan torbasına geçişini önlemek

**B. Bileşenlerin saklanması:**

- Eritrosit süspansiyonlarını 1-4°C'de saklamak
- Çözölmüş bileşeni 4 saat içinde transfüze etmek
- Çözme işleminde kullanılan cihazların temizliğini takip etmek
- Bileşenlerin havuzlanmasında steril prosedürler kullanmak

**C. Bileşenlerin kullanım öncesi kontrolünün yapılması:**

- Bakterileri direkt boyamak
- Bakteriyel ribozomal yöntemleri kullanmak
- Bakteriyel endotoksinleri araştırmak
- Bakteri DNA'sı için NAT yapmak
- Bakterilerin üreteceği CO<sub>2</sub>'i ölçmek
- Bakteri tarafından tüketilecek O<sub>2</sub>'i ölçmek
- Direkt bakteri kültürü yapmak (manuel ya da otomatik)

nedeniyle trombosit süspansiyonu (TS) transfüzyonlarında daha sık rastlanmaktadır. Özellikle TS'lerinin 7 gün saklanmaya başlanmasıyla sorun yeniden belirgin hale gelmiş ve bunun sonucunda trombosit saklama süresi 5 gün ile sınırlandırılmış hatta Japonya gibi bazı ülkeler bu süreyi 3 güne indirmiştir. FDA'ya (Food&Drug Administration) rapor edilen kontamine kan bileşenine bağlı ölüm oranının 1986-91 arasında, bir önceki 10 yıla oranla 2 katına çıktığı bildirilmiştir. Kan bileşenlerinin kontaminasyon oranları 105'de tam kan TS'leri için 8-80, aferez TS'leri için 0-230, eritrosit süspansiyonları (ES) için 0-3 arasında verilmiştir. Ancak bu bildirimler ciddi klinik semptomlar görüldüğünde yapılmaktadır. Dolayısıyla hastanın primer hastalığı, bakterinin tipi ve miktarı, bileşende endotoksin varlığı da vurgulanmalıdır.

Soğukta üreyebilen organizmaların nadir olması sebebiyle ES'lerinin kontaminasyonu da nadirdir. Ancak kalsiyumsuz ortamlarda 37°C altında üreyebilen *Yersinia enterocolitica* için buzdolabındaki antikoagüle kan uygun bir vasattır. Kontamine bileşenlerin çoğunun *Yersinia enterocolitica*'nın uzun üreme fazı nedeniyle 20 günden uzun miadlı olduğu belirlenmiştir. Organizma bir miktar virulans kaybına rağmen endotoksinleri ile ciddi klinik etki göstermektedir. Normal, sağlıklı kişilerde sıklıkla asemptomatik seyreden *Yersinia enterocolitica* enfeksiyonu, bazen hafif gastrointestinal semptomlar vermektedir. Ancak bağışçılara son bir ay içerisinde bu tarz şikayetlerini sorarak reddetmek etkin bulunmamıştır. ES'lerinin 21 günden önce kullanımı düşünülmüşse de bileşenin imhasını artıracak bu düşünceden kısa sürede vazgeçilmiştir. ES'nun renginin değerlendirilmesi ve çamur rengin gözlenmesi halinde imha edilmesi kabul gören önerilerdendir. Bileşenin gram boyaması, pH ya da glukoz ölçümleri de denenmişse de az sayıda bakterinin

gösterilmesinde yeterli olamayacağı anlaşılmıştır. Güncel yaklaşım; bakterilerin kültürle saptanması ya da viral inaktivasyon uygulamasıdır. AABB, kültürün zorunlu olması gerektiğini vurgularken ideal yöntemin seçimi zamanla gerçekleşecektir.

TS'lerinin bakteriyel kontaminasyonunun önemli transfüzyon komplikasyonları arasında yer alması, transfüzyon öncesi bu kontaminasyonun saptanması için çalışmaları artırmıştır. ISBT'nin 2003 yılında yapmış olduğu foruma katılan 11 ülkenin 5'i tüm TS'nde rutin bakteriyel tarama yaptıklarını bildirmiştir. Ancak tüm ülkelerin ortak kararı, bu yöntemlerle septik transfüzyon reaksiyonları tam olarak önlenemediğinden daha hızlı ve güvenilir yöntemlerin oluşturulması şeklindedir. Bileşenin glukoz, pH ölçümü ya da boyama ve mikroskopik incelenmesi ürün çıkışından önce yapılabilmesine rağmen kültüre göre 4,6 kat daha az bakteri tespit edebilmektedir. ScanSystem, FDA tarafından onay verilen hızlı tarama metodlarından biridir. Forumdan elde edilen özet bilgiler şu yöndedir: en yaygın kullanılan sistem BacT/Alert'dır; 0-36 saat arasında ekim yapılmakta ancak kültür sonlanıncaya kadar ürün kısa miadlı olduğundan karantinaya alınamamaktadır; çoğu ülke hem aerob hem anaerob ekim yapmaktadır; ekilen hacim 4-10 mL kadardır; elde edilen pozitif sonuçların çoğu yalancı pozitifdir ve doğrulanmamıştır; patojen inaktivasyonu ise bakteri sporları inaktive olmadığından ve maliyeti yüksek bulunduğundan tespit yöntemlerine tercih edilmemektedir.

Plazma fraksinasyon endüstrisindeki taleplere paralel olarak patojen inaktivasyon yöntemlerinde (PİY) gelişmeler olmuştur. Ancak gönüllü kan temin çalışmalarının artışı, tam kan veya tüm kan bileşenlerinde kullanılabilecek basit bir yöntemin olmayışı, mevcut teknolojilerin küçük, zarfsız virüslerle, sporları ve prionları inaktive edememesi, patojen inaktivasyonu sırasında kullanılan bazı kimyasalların bileşende istenmeyen etkilere yol açması ve maliyet gibi nedenlerle bileşenlerde kullanılan PİY fazla taraftar bulmamıştır. Ayrıca transfüzyonun akut ve gecikmiş hemolitik reaksiyon ve TRALI (transfüzyonla ilişkili akut akciğer hasarı) gibi diğer istenmeyen non-enfeksiyöz etkileri transfüzyonla bulaş oranla daha sık karşılaşılan ve daha çok güvenlik önlemi gerektiren etkileri olarak kabul edilmektedir. PİY'nin henüz tam açıklığa kavuşturulmamış olan genotoksisite, karsinojenisite, reproduktif toksisite gibi etkileri enfeksiyon bulaşına daha hassas olmalarına rağmen prematüreler, süt çocukları ve gebelerde kullanılamamasına neden olmaktadır. Bu yöntemlerin kullanılacağı durumlarda ise uygulamalarda değişiklik yapılması gerekecektir. Bağışçı sorgulama formları ve mikrobiyolojik testlerin yeniden gözden geçirilmesi gerekecek örneğin döğme ya da seyahat sebebiyle bağışçı reddinden, transfüzyonla bulaş riski nispeten az ve PİY'ne oldukça duyarlı mikroorganizmaların taranmasından (CMV, HTLV gibi) belki de vazgeçilecektir.

\* Acibadem Sağlık Grubu Hastaneleri,  
Kan Merkezi, İstanbul  
banu.pelit@acibademlabcell.com.tr

# Talasemi Majorlu Hastalarda Eritrosit Antikorları

► *\*Duran Canatan, Nihal Balta, Ahmet Özsanca, Banu Türkmen, Ayşegül Kulci, Ozcan Eren, Ömer Kocaoğlu, Oktay Koçgürbüz, Reşat Torunlar, Halil Dirican*

## Giriş:

Eritrositlere karşı gelişen otoantikorlar ve alloantikorlar transfüzyonda önemli sorun oluşturur. Bu antikorlardan klinik olarak önemli olan alloantikorlar ve otoantikorlar akut ve gecikmiş tipte hemolitik transfüzyon reaksiyonlarına yol açmaktadır. Alloimmünizasyon kompleks bir olaydır. Verici ve alıcı arasında eritrosit antijen farklılığı, alıcının immün durumu, alıcının immün sistemi, antijenlerin özelliği, allojenik transfüzyonunun immünmodülatör etkileri başlıca sorumlu faktörlerdir. Kronik transfüzyon alan hemoglobinopatilerde, hematolojik malignansilerde, organ nakli olan hastalarda ve böbrek yetmezliği olan hastalarda alloimmünizasyon riski %60 lara kadar çıkmıştır. Diğer transfüzyon alanlarda %1-10 arasında değişmektedir. Ülkemizde yapılan çok merkezli çalışmada Türk toplumundaki eritrosit antijenleri ile talasemili hastalardaki antijen sıklığı benzerlik göstermiş, K antijen sıklığı her iki grupta %5 bulunmuştur. Talasemili hastalarımızda alloimmünizasyon sıklığı %8.9 bulunmuştu. Beş yıl sonra hastalarımızın alloimmünizasyonunu ve otoimmünizasyonu değerlendirmek amacı ile bu çalışmayı yaptık.

## Materyal ve Yöntem

Antalya Devlet Hastanesi Talasemi Merkezinde izlenen toplam hasta sayısı 388'dir, bunların 246'sı Talasemi major, 86'sı Talasemi İntermedia, 23'ü S+Beta Talasemi, 20'si Orak Hücre anemi ve 13'ü diğer anormal hemoglobinlerdir. 246 Talasemi major hastanın 101'i kız, 135'i erkek, yaş ortalaması  $\pm$ SD:15.3 $\pm$ 8.6 (dağılım:2-35) yıl. Son bir yıl içinde bu hastalara yapılan eritrosit süspansiyonu transfüzyon sayısı: 4281 ünite, hasta başına düşen transfüzyon sayısı ise 17.4 ünite. Tüm eritrosit süspansiyonları yatak başı log 4 filtre ile verilmekte ve her hastaya tüm uygunluk testlerine ek olarak yatak başı uygunluk testi yapılmaktadır. Tüm hastaların ABO kan gruplarına ek olarak Rh subgruplarına ve Kell antijenine

baştan bakılmakta olup, yılda iki defa antikor tarama ve tanımlama testleri jel yöntemi ile yapılmaktadır. Transfüzyon öncesi karşılaştırmada sorun olduğu zaman her transfüzyon öncesinde DAT, antikor tarama ve tanımlama testleri yapılmaktadır.

## Sonuçlar

Hastalarımızın 14'ünde (%5.6) otoantikor ve 26'sında (%10.5) alloantikor saptandı. 26 alloantikorlu hastanın 8'inde tekli 18'inde çoklu antikor vardı. En sık karşılaşılan antikorlar: Anti-K: %30.7, Anti-E: %28.7, anti-c: %15.2, anti-Jk<sup>b</sup>: % 8.3, anti-Kp<sup>a</sup>:%7.8. Beş yıl önce merkezimizde yapılan çalışmada otoantikor sıklığı %1.2 ve alloantikor sıklığı %8.9 iken her ikisinde de artış olmuştur. Bunun nedeni ise, ancak sorun olduğu zaman altgruplarına uygun kan istemi yapılmakta, ekonomik nedenler nedeniyle tüm vericilerin altgrupları ile antikor taramaları yapılamamaktadır.

## Sonuç

Düzenli transfüzyon alan hastaların her transfüzyonunda antikor tarama ve tanımlama yanında vericilerinin de altgrupları, antikor tarama ve tanımlamaları yapılmalıdır.

*II. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Kongresinde sözel bildiri olarak yayınlanmıştır. (2007)*

*\* Antalya Devlet Hastanesi Talasemi ve Kan Merkezi- Antalya*