

**T.C.
MILLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

TIBBİ LABORATUVAR

**UYGUNLUK TESTLERİ
725TTT136**

Ankara, 2012

-
- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
 - Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
 - **PARA İLE SATILMAZ.**

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR.....	ii
GİRİŞ.....	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1.....	3
1. KAN GRUBU TAYİNİ.....	3
1.1. ABO Kan Grupları Tayin Yöntemleri.....	5
1.1.1. Eritrositle Kan Grubu Tayini.....	9
1.1.2. Serum ile Kan Grubu Tayini.....	19
1.1.3. Kan Grubu Tayininde Hata Kaynakları.....	20
1.2. Rh (D) Sistemine Ait Tiplendirme Testleri.....	21
1.2.1. Lam Yöntemiyle Rh Tayini.....	23
1.2.2. Tüp Yöntemiyle Rh Tayini.....	24
1.2.3. Zayıf D Testi (Du Testi).....	24
1.2.4. Rh Tayininde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar.....	25
UYGULAMA FAALİYETİ.....	27
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	30
ÖĞRENME FAALİYETİ-2.....	31
2. ANTİKOR TARAMA VE TANIMLAMA TESTLERİ.....	31
2.1. Coombs Testi.....	31
2.1.1. Direkt Coombs Testi.....	32
2.1.2. İndirekt Coombs Testi.....	33
2.1.3. Coombs Reaksiyonlarının Kontrolü.....	35
2.2. Rh Antikor Titrasyon Yöntemleri.....	37
2.2.1. Slide Tarama Testi.....	37
2.2.2. Albüminli Tüp Titrasyon Yöntemi.....	39
UYGULAMA FAALİYETİ.....	40
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	42
ÖĞRENME FAALİYETİ-3.....	43
3. CROSSMATCH TESTİ.....	43
3.1. Majör Crossmatch Testi.....	43
3.2. Minör Crossmatch Testi.....	45
3.3. Acil Crossmatch (Immediate Spin, IS) Testi.....	45
3.4. Crossmatch Testinde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar.....	45
3.5. Mikrobiyolojik Tarama Testleri.....	46
UYGULAMA FAALİYETİ.....	47
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	48
MODÜL DEĞERLENDİRME.....	50
CEVAP ANAHTARLARI.....	52
ÖĞRENME FAALİYETİ 1'İN CEVAP ANAHTARI.....	52
KAYNAKÇA.....	53

AÇIKLAMALAR

KOD	725TTT136
ALAN	Tıbbi Laboratuvar
DAL/MESLEK	Tıbbi Laboratuvar Teknisyenliği
MODÜLÜN ADI	Uygunluk Testleri
MODÜLÜN TANIMI	Kan merkezinde ABO grubu ve Rh tayini, crossmatch, antikor tarama ve tanımlama testi teknik ve becerilerinin kazandırıldığı bir öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/24
ÖNKOŞUL	
YETERLİK	Uygunluk testleri yapmak
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Kan merkezinde uygunluk testlerini yapabileceksiniz. Amaçlar 1. Kan grubu tayini yapabileceksiniz. 2. Antikor tarama ve tanımlama testlerini yapabileceksiniz. 3. Crossmatch testini yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam: Kan merkezi/hematoloji laboratuvarı Donanım: Mikroskop, santrifüj, benmari, otomatik pipet, tüp, spor, lam, damlalık, cam kalem, cam baget, kan numunesi, serum fizyolojik, araç gereçler vb.
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz. Öğretmen modül sonunda ölçme aracı (çoktan seçmeli test, doğru-yanlış testi, boşluk doldurma, eşleştirme vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Kazalar sonrası kan gereksinimi olan durumlarda, ameliyatlarda ve bazı kan hastalıklarının tedavisinde, kan transfüzyonunun sağlıklı yapılabilmesi açısından uygunluk testlerinin bilinmesi son derece önemlidir.

Bu modülde kazandığımız yeterlikle ABO ve Rh gruplama, antikor tarama ve tanımlama testleri, crossmatch testi gibi uygunluk testlerini yapma teknik ve becerilerini kazanarak elde edeceğimiz sonuçlarla tanı ve tedaviye büyük katkı sağlayacaksınız.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle kan gurubu tayini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Kan grubu tayin yöntemlerini araştırınız.
- Farklı kan merkezlerinde, değişik metotlarla yapılan kan grubu testlerini inceleyerek edindiğiniz bilgileri arkadaşlarınızla paylaşınız.

1. KAN GRUBU TAYİNİ

Hayati sıvı olan kan, aynı zamanda bir vücut dokusudur. Kanın % 55'ini plazma, % 45'ini ise şekilli elamanlar oluşturur.

Vücutta bulunan kanın her gün belli kısmı yenilenir. Örneğin, günde yaklaşık % 1 oranında yıkılan eritrositin yerine, aynı miktarda genç hücre kemik iliğinden kana verilir. Plazma miktarı da en ufak bir değişiklikte hemen dengelenir. Kan kaybı durumlarında vücut denge mekanizmaları ile hemen hacmi sabit tutmaya çalışır. Önce dokulardan kana sıvı geçişi olur. Daha sonra hızla genç eritrositler kana vermeye başlanır.

Çeşitli nedenlerle fazla miktarda kan kaybedildiğinde şok tablosu ortaya çıkar. Bu durumda kan transfüzyonu yapılması gerekir. Transfüze edilecek kanın alıcıya verilmeden önce uygunluk testlerinin yapılması zorunludur. Bu uygunluk testlerinin temel amacı, transfüze edilecek kanın alıcıda reaksiyon yapmasını önlemek ve gerekli olan kan transfüzyonunu mümkün olan en iyi sonuçlarla tamamlamaktır. Diğer bir ifadeyle transfüze edilen eritrositlerin kabul edilen en uzun sürede canlılığını ve fonksiyonunu sürdürmesini, alıcının eritrositlerinde herhangi bir yıkımın olmamasını sağlamaktır.

- **Kan transfüzyonunun uygunluğu açısından;**
 - Alıcı ve verici ABO ve Rh kan grubu tayini,
 - ABO grubu dışındaki beklenmedik antikorları araştırmak için antikor tarama testleri,
 - Antikor tespit edildikten sonra antikorun özelliğini belirlemek için antikor tanımlama testleri,
 - Crossmatch testi,
 - Donör kanında mikrobiyolojik tarama testleri yapılır.

➤ **Uygunluk testlerinde örneklerin seçimi ve hazırlanması**

- Örnek seçimi testlerin doğru ve tam uygulanması kadar önemlidir. Bu nedenle kan ürünlerinin doğru hastadan alınması, verici örneğinin doğru etiketlenmesi, etiket bilgilerinin doğru yazılması, kan torbası üzerindeki etiketlenmenin tam ve doğru yapılması son derece önemlidir.
- Vericiye ait örneklerin kan torbası doldurulduktan sonra alınması uygundur. Transfüzyon sonrası karşılaşılabilecek sorunların çözümü için hem alıcı hem de verici örneği en az 7 gün süreyle kapalı tüp içinde, 1–6°C’de saklanmalıdır.
- Kan gruplama testlerinde serum tercih edilmelidir. Çünkü plazma kullanmanın bazı sakıncaları vardır. 37°C’de inkübe edildiğinde pıhtılaşabildiği gibi sitrat ve EDTA gibi antikoagülan maddeler kompleman aktivasyonunu engeller. Buna bağlı olarak gerçek aglütinasyonu ayırt etmek güç olabilir. Bu nedenle serum kullanılması daha uygundur.
- Eritrosit antijen ve antikorları ile ilgili tüm testlerde eritrositlerin serum fizyolojikle yıkanarak kendi serumlarından uzaklaştırılmaları, yanlış pozitif sonuç vermemeleri açısından bir ön işlem olarak mutlaka yapılır.
- Uygunluk testlerinin önemi büyüktür. Ancak bu testlerin en önemlisi, kan gruplarının doğru olarak belirlenmesidir. Çünkü ABO-Rh uygun olması % 98 oranında uygunluk sağlar. Antikor tarama ve crossmatch uygun olması ise sadece % 2’lik ek uygunluk sağlar.
- Kan gruplarının tayininde eritrosit antijen ve antikorları arasındaki reaksiyonların gösterilmesinde çeşitli serolojik yöntemler vardır. Pratikte kan merkezlerinin genelinde tercih edilen yöntem hemaglütinasyon yöntemidir. Eritrositlerin yüzeyindeki antijenler ortamda bulunan kendilerine özgü antikorlar ile birleştiklerinde eritrositler birbirine yapışarak gözle görülebilecek büyüklükte kümeler oluşturarak çöker. Bu olaya hemaglütinasyon denir.
- Hemaglütinasyon reaksiyonunda iki aşama vardır. Birincisi antikorların eritrositlere tutunması, ikincisi ise antikorlarla kaplı eritrositlerin birbirine tutunmasıdır.

➤ **Hemaglütinasyon esasına dayanan yöntemler**

- Lam (slide) yöntemi
- Tüp yöntemi
- Jel santrifügasyon yöntemi
- Mikroplate yöntemi
- Manual polybrene yöntemi
- Yarı veya tam otomatize sistemler

1.1. ABO Kan Grupları Tayin Yöntemleri

Eritrositlerin yüzeyinde 600 kadar antijen saptanmıştır. Dolayısıyla kan gruplarını belirleyen 31 farklı kan grubu sistemi tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları ABO, MNSs, P, Rh, Lutheran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd, Diego, Yt, Xg, Dambrock, Ii ve Colton'dur. Pratikte yaygın olarak kullanılan kan grup sistemleri ABO ve Rh sistemleridir. Kell, Kidd, Duffy sistemleri de kullanılmaktadır.

Kell kan grup sistemi, kompleks bir kan grup sistemidir. Bu sisteme ait antijenlerin biyokimyası henüz yeteri kadar anlaşılammıştır. Kell antikorları invitro olarak Coombs testi ile gösterilir, enzimlerin varlığı reaksiyonun şiddetini arttırmaz. Hemolitik transfüzyon reaksiyonları ve yenidoğan hemolitik hastalığı oluşturur. Kell sistemine ait antijenler, A ve B antijeni hariç tutulduğunda D antijeninden sonra antijenitesi en yüksek olan antijendir.

Duffy sistemine ait antijenlerin sıklığı beyaz ve siyah ırklarda belirgin farklılık gösterir. Beyazlarda Fya ve Fyb olarak iki allelik gen bulunur. Siyahlarda ise bu genlere en azından Fy4 eklenir. Fenotipik olarak Fy (a-b-) olan kişilerin eritrositleri sıtma etkenlerinden Plasmodium vivaxın infeksiyon oluşturmaya dirençlidir. Kan bankalarında en çok karşılaşılan Duffy sistemine ait antikorlar Anti-Fya ve Anti-Fyb'dir. İmmün orijinli olan bu antikorlar IgG sınıfındadır ve hem hemolitik transfüzyon reaksiyonunda hem de yenidoğan hemolitik hastalığında bulunur.

Kidd sistemi, diğer kan gruplarında olduğu gibi çok sayıda antijeni olmayan bir sistemdir. Jka ve Jkb olmak üzere iki allelik gen vardır. Üçüncü gen ise Jk3 genidir. Kidd sisteminin antijenlerini Jka, Jkb ve JkaJkb oluşturur. Anti-Jka ve anti-Jkb antikorları IgG yapısında olup Coombs testi ile gösterilebilen antikorlardır. Sıklıkla dozaj gösterir ve saptanmaları içinde enzim ile muamele edilmeleri gerekir. Kidd antikorlarına bağlı transfüzyon reaksiyonları ve yenidoğan hemolitik hastalığı ise çok sık olarak görülür.

➤ Kan grubu antijenleri ve antikorları

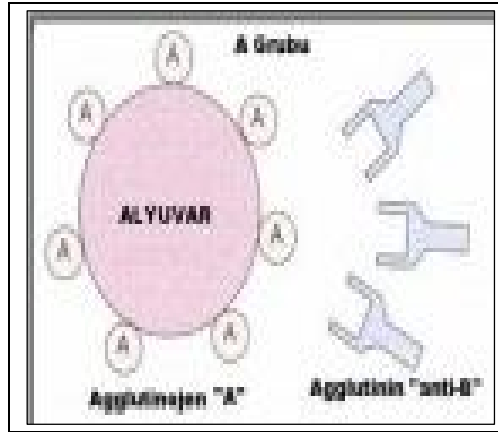
- ABO kan grup antijenlerinin tanımlanması güvenli kan ve doku transfüzyonu açısından önemlidir. Eritrositlerin yüzeyinde bulunan glikoprotein ve lipoprotein yapısındaki antijenler kan grubu antijenleridir. Bu antijenlerin önemli bir kısmı birbiriyle ilişkilidir ve kan grup sistemleri ve subgrupları oluşturur.
- Genlerle kontrol edilen bu antijenler ilk olarak fetal hayatın ilk aylarında 37. günden itibaren oluşmaya başlar ve yaşam boyu devam eder. Buna karşılık yeni doğan çocuklarda anti-A ve anti-B antikorları bulunmaz veya çok zayıf titrede mevcuttur. Doğumdan sonraki ilk 3-6 ay içinde belirli titrelerde görülmeye başlar ve 5-10 yaşlarda en yüksek seviyeye ulaşır.
- ABO sistemine ait antijenler, membran antijenleri olarak eritrosit ve trombositlerin yüzeyinde, vasküler epitelyum hücreleri, intestinal, servikal ve meme bezi epitelyum hücrelerinde bulunur. Plazma, tükürük, süt, idrar ve dışkıda ise çözülmüş haldedir.

- ABO Sistemine göre eritrositlerde bulunan kan grubu antijenleri A antijeni, B antijeni ya da AB antijeni olarak bulunur veya hiçbir antijen bulunmaz.
- Serumda bulunan kan grubu antikorları da antijen gibi anti -A, anti -B ya da anti -A ve anti -B olarak bulunur veya hiçbir antikor bulunmaz. Antikorlar protein yapısındadır.
- *Bir bireyin kanında antijen ve antikorların bulunuş şekilleri terstir.* Eritrositlerde bulunan antijen ile serumda bulunan antikor aynı gruptan değildir. Örneğin, bireyin eritrositlerinde A antijeni varsa serumda bununla birleşebilecek anti-A antikoru yoktur, buna karşılık anti-B antikoru bulunur. Aynı şekilde, eritrositlerinde B antijeni varsa serumda buna karşılık anti-B antikoru bulunmaz, buna karşılık anti- A antikoru bulunur.

➤ Kan grupları

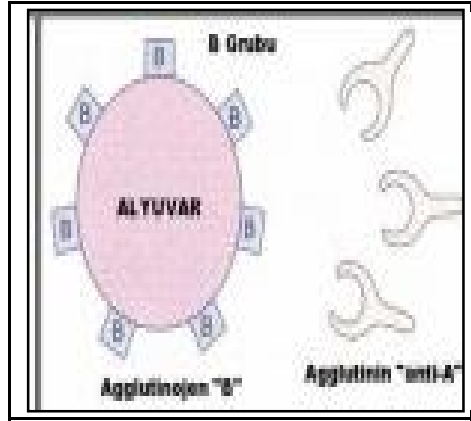
ABO sistemine göre kan grupları eritrositlerde bulunan antijene ve bu antijenlere karşı serumda oluşan antikora göre **A, B, AB ve O** olmak üzere dört ana gruba ayrılır:

- **A kan grubu**, eritrosit yüzeyinde A antijenini, serumda anti-B antikoru taşıır.



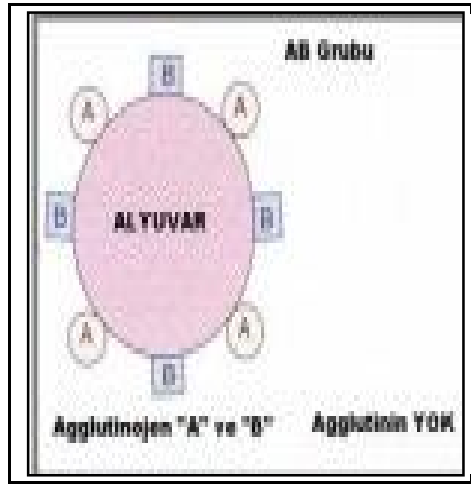
Resim 1.1: A kan grubu antijen ve antikor durumu

- **B kan grubu**, eritrosit yüzeyinde B antijenini, serumda anti-A antikoru taşıır.



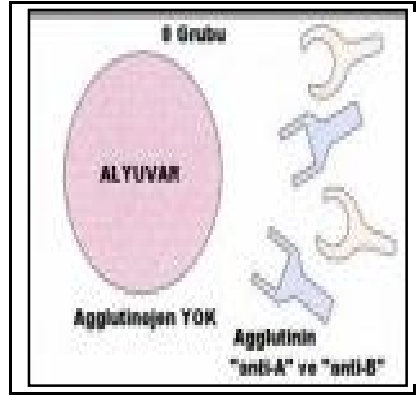
Resim 1.2: B kan grubu antijen ve antikor durumu

- **AB kan grubu;** eritrosit yüzeyinde A ve B antijenini birlikte taşır. Serumda ise antikor bulundurmaz.



Resim 1.3: AB kan grubu antijen ve antikor durumu

- **O kan grubu;** eritrosit yüzeyinde antijen bulundurmaz, serumda ise anti - A ve anti -B antikorunu birlikte taşır.



Resim 1.4: O kan grubu antijen ve antikor durumu

➤ **Alt kan grupları (subgruplar)**

ABO kan grubu sisteminde ayrıca subgruplar da bulunur.

- **A grubu için** A1, A2, A3, A4
- **B grubu için** B1, B2, B3, B4
- **AB grubu için** A1B, A2B, A3B, A4B
- Eritrositlerde A ve B antijenlerinden başka **“H” antijeni** de bulunur. O grubu kanlarda hiç AB antijeni bulunmadığı halde yine de zayıf bir aglütinasyon meydana gelir. Bunun sebebi “H” antijeni ve buna karşı olan anti-H aglütininleridir.
- Eritrositler üzerindeki antijenik özellikler anne ve babadan çocuklarına “Mendel Kanunu” esaslarına göre geçer. A ve B genleri **dominant**, O geni ise **resesiftir**. Gen karşılaşmalarında AO heterozigot genleri “A genotipi”, OB heterozigot genleri “B genotipi”, verir. Testlerle tespit edilebilen antijenler fenotipi ortaya çıkarır. Örneğin, A kan grubu fenotiptir. Aslında bu kan grubu AA veya AO şeklinde bir genotipe sahiptir. B, AB, O grupları da fenotiptir.

Genotip: Bir canlının sahip olduğu genler topluluğuna denir.

Fenotip: Bir canlının gözle görülebilen tüm özelliklerine fenotip adı verilir. Canlının dış görünüşüdür. Genotip ve çevre etkisiyle meydana gelir.

Kan Grubu	Eritrositlerdeki antijen	Serumdaki antikor	Genotip
A	A	Anti-B	AA AO
B	B	Anti-A	BB BO
AB	AB	-	AB
O	-	Anti A ve Anti B	OO

Tablo 1.1: Kan gruplarının antijen-antikor ve genotip durumu

➤ **ABO ve Rh (D) kan grubu testlerinde genel prensipler**

- Tranfüzyon amacıyla hazırlanan her ünite kana, ABO ve Rh (D) gruplaması yapılır. ABO ve Rh (D) gruplaması iki farklı kişi tarafından çalışılır, rapor edilir. Herhangi bir uygunsuzluk halinde yeni bir örnek ile çalışma tekrarlanır.
- ABO gruplaması, donör eritrositlerinin anti-A ve anti-B serumları ile test edilmesi yani **direkt - Forward gruplama** sonucu, verici plazma veya serumunun A1 ve B eritrositleri ile test edilmesi yani **karşıt -reverse gruplama** sonucu belirlenir.
- Rh (D) gruplaması, verici eritrositlerinin anti-D serumu ile test edilmesi sonucu belirlenir. Anti-D testi ile reaksiyon vermeyen eritrositlere zayıf D testi yapılır.
- Transfüzyon veya gebelik öyküsü olan vericiden alınan tüm ünitelere ve ilk kez başvuran vericiye beklenmeyen antikorlar açısından antikor tarama testi uygulanır.
- Ünitenin üzerinde bulunan etikette, ABO ve Rh (D) gruplamasına ait bilgi açık olarak yer almalıdır.
- ABO sisteminde, çeşitli yöntemlerle kan grubu tayini yapılır ve birbirini denetler niteliktedir.

1.1.1. Eritrositle Kan Grubu Tayini

Eritrositle ABO gruplama, lam ve tüp yöntemiyle yapılır. Gruplama, jel santrifügasyon ve mikropak yöntemleriyle de yapılabilir.

1.1.1.1. Lam (Slide) Yöntemiyle Kan Grubu Tayini (Lam Testi ile ABO Forward Gruplama)

- **Amaç:** Eritrosit yüzeyindeki antijenlerin gösterilmesi sonucu kan grubu tayinini yapmaktır. Örnek seçiminde tam kan, serum, plazma ve eritrosit süspansiyonu kullanılır.
- **Test yapılırken dikkat edilecek hususlar**
 - Lamın üzerine önce antiserumlar damlatılır.
 - Karıştırıcı olarak cam baget yerine aplikatör çubuk kullanılır.
 - Sonuçlar dikkatli değerlendirilir.
 - Lamaların üzerinde oluşabilecek hafif kuruma, zayıf pozitif aglütinasyon olarak değerlendirilmemelidir.
- **Araç Gereçler**
 - Anti-A, anti-B serumu (anti-AB serumunun kullanımı tercihe bağlı) Antiserumlar 4°C'de 1-2 yıl, -20°C'de yıllarca etkinliklerini kaybetmeden saklanır.
 - Lam
 - Cam kalemi/etiket
 - Aplikatör çubuk (tahta veya plastik, tek kullanımlık)
 - Otomatik pipet
 - Serum fizyolojik
 - Serum fizyolojik + serum veya plazma ile hazırlanan daha seyreltik konsantrasyondaki eritrosit süspansiyonu
- **Eritrosit süspansiyonunun hazırlanışı**

Hazır ticari kitler şeklinde temin edilebilir ya da günlük olarak A1 ve B eritrositlerinin % 2-5'lik süspansiyonu aşağıdaki şekilde hazırlanır:

 - Bir santrifüj tüpüne 5-6 ml serum fizyolojik konur.
 - Üzerine 4-5 damla eritrosit ilave edilip karıştırılır.
 - Karışım, 2000-3000 devirde 3-4 dakika santrifüj edilir ve üstte kalan sıvı atılır.
 - Tüpte kalan eritrositler üzerine yeniden serum fizyolojik konular ve yukarıdaki işlem toplam 4 kez tekrar edilir.
 - Yıkama işleminden sonra geriye kalan eritrositten iki damla alınır, 5 ml serum fizyolojik ile karıştırılıp eritrosit süspansiyonu elde edilir.
- **Teknik**
 - 3 adet temiz lam alınır, cam kalemi ile birine anti-A, birine anti-B, diğerine kontrol yazılır.
 - Anti-A yazılmış lama bir damla anti-A damlatılır.
 - Anti-B yazılmış lama bir damla anti-B damlatılır.
 - Kontrol yazılmış lama bir damla hasta serumu veya plazması damlatılır.
 - Her bir lama, test edilecek eritrositlerin iyice karıştırılmış birer damla süspansiyonu damlatılır.



Resim 1.5: Kan grubu antiserumları

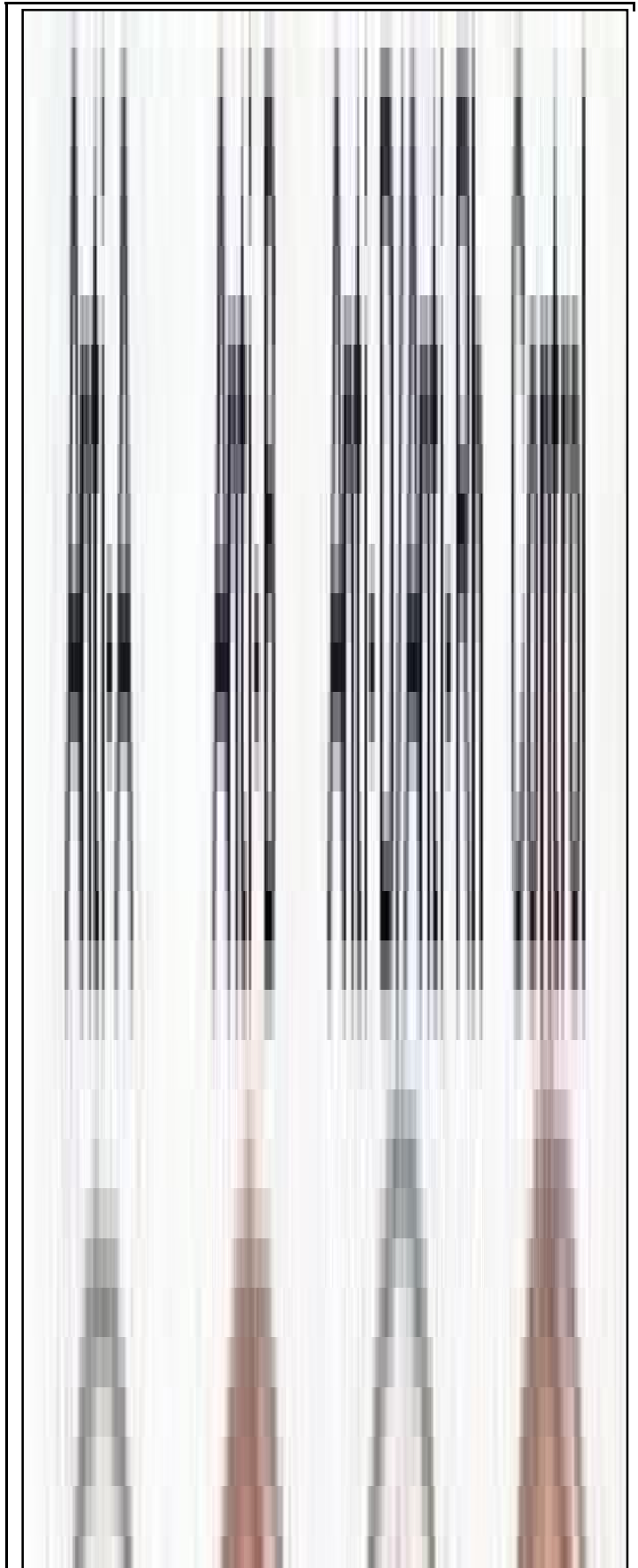
- Her bir lamdaki karışım, ayrı ve temiz bir aplikatör çubuk ile karıştırılarak 20-40 mm²'lik bir alana yayılır.
- Karıştırma işlemine, lamı dairevi bir şekilde, hafifçe öne ve arkaya doğru hareket ettirilerek 2 dakika sallayarak devam edilir. Lamlar, bu süre zarfında çok ısıtılmış veya soğutulmuş bir alana konulmaz. Serum/eritrosit karışımına enfeksiyöz ajanlar bulaşabileceği için elle dokunulmaz.
- Tüm lamlarda aglütinasyon olup olmadığına bakılır, aglütinasyon varlığı sonucun pozitif olduğu anlamına gelir ve kan grubunu belirler.

	Anti-A	Anti-B
A		
B		
AB		
O		

Resim 1.6: Lamda Anti-A, anti-B serumlarına göre kan grupları sonuçları

- Zayıf ya da şüpheli reaksiyon veren örnekler, tüp testi ya da başka bir serolojik yöntemle doğrulanmalıdır.

-
- Lam yöntemi, tek başına güvenilir bir yöntem değildir.



Resim 1.7: Lamda kan grubu tayini (A Rh+)

Kan Grubu	Anti-A	Anti-B	Anti-AB
A	+	-	+
B	-	+	+
AB	+	+	+
O	-	-	-

Tablo 1.2: Lam yöntemi ile kan grubu sonuçları

1.1.1.2. Tüp Yöntemiyle Kan Grubu Tayini (Tüp Testi ile ABO Forward Grublama)

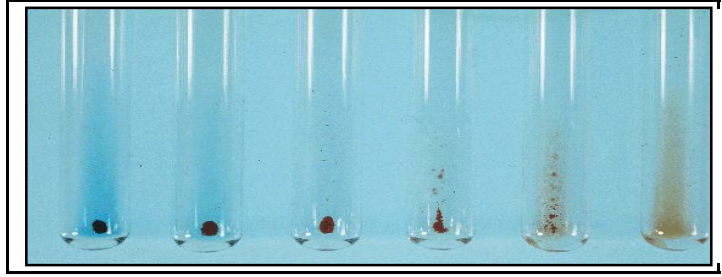
- **Amaç:** Yüzeyindeki antijenlerin gösterilmesi sonucu kan grubu tayinini yapmaktır. Lam yöntemiyle kan grubu tayinine göre daha hassas bir yöntemdir, bu testte yalancı aglütinasyonlar daha az görülür.

ABO gruplaması için hasta ya da donör eritrositleri kullanılır. Test eritrositleri doğal serum/plazma ya da serum fizyolojikle süspansiyon haline getirilebilir ya da serum fizyolojikle yıkanıp tekrar süspansiyon yapılabilir.

Forward gruplamada tüp yöntemi kullanılır. Ayrıca mikropalak, jel veya mikrokolon yöntemleri kullanılarak da yapılır. Her yöntem, ilgili talimatlar doğrultusunda genellikle otomasyonla çalışılır ve değerlendirilir.

- **Araç gereçler**
- Anti-A, anti-B serumu (anti-AB serumu ve A2 eritrositlerinin kullanımı isteğe bağlı olarak teste eklenebilir.)
 - Santrifüj
 - 13 x100 mm'lik cam tüpler
 - Cam kalemi/etiket
 - Otomatik pipet
 - Aplikatör çubuk
 - Serum fizyolojik
 - A1 ve B grubu eritrositlerinin % 2-5'lik serum fizyolojik içindeki süspansiyonu
- **Teknik**
- 3 adet temiz tüp alınır, cam kalemi ile birine anti-A, birine anti-B, diğerine kontrol yazılır.
 - Anti-A yazılmış tüpe bir damla anti-A damlatılır.
 - Anti-B yazılmış tüpe bir damla anti-B damlatılır.
 - Kontrol yazılmış tüpe, bir damla hasta ya da donör serumu veya plazması damlatılır.
 - Tüplere, test edilecek olan eritrosit süspansiyonundan birer damla konur.

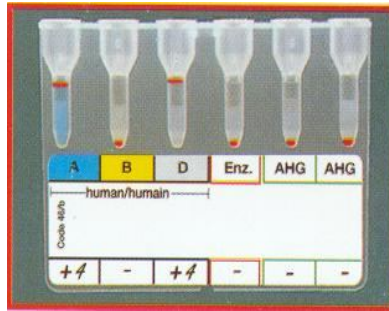
- Tüpler yavaşça çalkalanarak karıştırılır.
- Tüpler 1000 devirde 15-30 saniye süreyle santrifüj edilir ya da 1 saat süreyle oda ısısında bekletilir.
- Tüpün dibindeki eritrosit birikintileri tekrar yavaşça karıştırılır ve aglütinasyon gözlemlenir.
- Gerekirse tüplerdeki aglütinasyon varlığı mikroskopik olarak incelenir.
- Eritrosit test tüplerinin herhangi birinde aglütinasyon görülmesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir.
- Tüpün dibindeki eritrosit birikintileri tekrar yavaşça karıştırıldığında, karışımın homojen görünümü sonucun negatif olduğunu gösterir.
- Kontrol tüpünde aglütinasyon görülmesi, otoantikorların varlığını gösterir (otoantikor, vücudun bağışıklık sistemi tarafından mikroplar ya da virüsler yerine, vücudun kendi hücrelerine karşı geliştirilen antikorlardır).
- Sonuçlar kayıt edilir ve serum testleri ile karşılaştırarak doğrulanır.



Resim 1.8: Tüp yönteminde kan grubu tayini

1.1.1.3. Jel Santrifügasyon Yöntemi

Jel testi birçok yönden tüp yöntemine benzer. Testte 5x7 cm büyüklüğünde plastik kartlar kullanılır. Her kartın üzerinde 6 mikrotüp vardır. Mikrotüplerin tabanı, değerlendirmeyi kolaylaştırmak için konik, üst kısmı ise inkübasyon gerektiren testler için daha geniş olarak yapılmıştır. Tüplerin içerisinde Sephadex-G 100 maddesini içeren bir jel vardır. Bu madde başlangıçta toz halindedir ancak buffer (tampon) ile karıştığında jel halini alır. Kartlar için jel hazırlanırken, önce buffer ile yıkanarak şişmesi sağlanır. Daha sonra da buffer içinde süspansiyonu hazırlanır. Kullanılacağı testin özelliğine göre serum fizyolojik veya LISS, (Low ionic strength solution: Ortamdaki ion sayısını azaltır). buffer olarak kullanılır. Testte zaman ve hız yönünden standardize edilmiş bir santrifüj kullanılmaktadır. Santrifügasyon işlemi, 70x'de 10 dakika yapılır. Buffer ile yıkama sırasında şişen jel, sadece aglütine olmayan eritrositlerin geçişine izin verir. Aglütine olmayan eritrositler, santrifüj işlemi sırasında jel tabakasını geçerek konik kısımda çöker. Aglütine olmuş eritrositler ise üst kısımda kümeler oluşturur. Kuvvetli aglütinasyonda çok büyük kümeler oluşur ve jel üzerinde bir tabaka meydana getirir. Zayıf aglütinasyonda ise küçük kümeler oluşur ve reaksiyonun şiddetini değerlendirmek de kolaylaşmış olur.



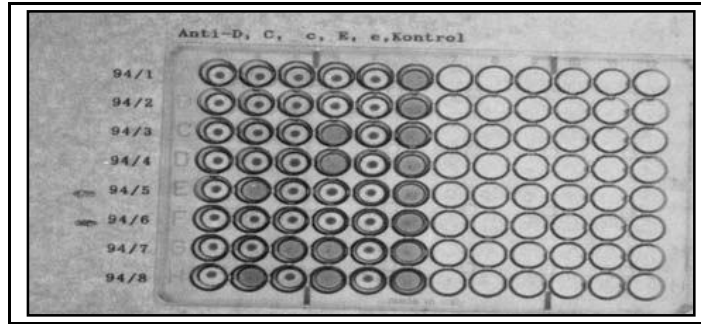


Resim 1.9: Plastik kartın üzerinde mikrotüplerin ve santrifüjün görünümü

1.1.1.4. Mikroplate Yöntemi

Mikroplate yönteminde U veya V tabanlı plastik 96 gödeli mikrotitrasyon plakları kullanılır. Eritrosit süspansiyonu U pleyt için % 1-2'lik, V pleyt için % 0,03 konsantrasyonda hazırlanır. 20 µL antiserum ve 20 µL eritrosit süspansiyonu godeye eklendikten sonra plak, santrifüje edilir. U pleytler çalkalanıp klasik teknikler gibi değerlendirilirken V tabanlı pleytler 75°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra değerlendirilir. Düşük konsantrasyonda eritrosit kullanıldığı için diğer yöntemlerden daha duyarlıdır. Çok az miktarda antiserum kullanıldığı için daha ekonomik bir metottur.

Duyarlılığı yüksek, ekonomik olup büyük kan merkezleri için uygundur.



Resim 1.10: Godelerden oluşan plastik plakların görünümü

1.1.1.5. Manual Polybrene Yöntemi

Katyonik bir polimer olan polybrene normal eritrositlerde agregasyona (kümeleşme) neden olur. Bu agregasyon ortama sodyum sitrat eklendiğinde dağılır. Eğer eritrositler antikorlarla kaplanmış ise polybrene eklendiğinde antikorlar, eritrositler arasında köprü oluşturarak aglutinasyona neden olur. Bu şekilde oluşan agregasyon, sodyum sitratla dağılmaz. Polybrene, hem manual hem de otomatik sistemlerde mikroplate veya tüpte kullanılabilir. Testte yapılacak ilk işlem, eritrosit yüzeyinin antikorlarla kaplanması için eritrosit süspansiyonu ile antiserumu inkübe etmektir. Daha sonra ortama polybrene eklenir. Agregasyon oluşumu izlenir. Santrifügasyon sonrası supernatant uzaklaştırılır ve ortama trisodyum sitrat-dextroz karışımı eklenerek aglutinasyon değerlendirilir.

1.1.1.6. Yarı veya Tam Otomatize Sistemler

Manuel analizlerin sistemlerinden başka yarı otomatize veya tam otomatize sistemler de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Otomasyonun insana direkt hizmet veren tıbbi laboratuvarlardaki yararları çok büyüktür. Otomatize cihazın insan gücünü ortadan kaldırması ve insan emeği ile ulaşılamayacak hızlılığı sağlaması yanında, otomasyonla kalite

ve verimlilikte uygun maliyetle sağlanır. Tam otomatik sistemlerde, ABO ve Rh (D) gruplamasında, mutlaka EDTA'lı örnekler kullanılmalıdır.

Otomatik sistemlerde şu işlemler yapılır:

- Pozitif olan örneklerin tanımlanması ve sonuçların okunup yorumlanması
- Sonuçların standart sonuçlarıyla eşleştirilmesi, karşılaştırılması
- Sonuçların elektronik olarak transfer edilmesi, ilgili birimlere aktarılması

1.1.2. Serum ile Kan Grubu Tayini

- **Tüp yöntemiyle kan grubu tayini (Tüp testi ile ABO reverse gruplama)**

ABO (ABH) sistemi, transfüzyon ve doku transplantasyonunun en önemli antijen sistemidir, reverse (ters) gruplamanın yapılabildiği tek kan grubu tayinidir.

ABO gruplaması için hasta ya da donör serum veya plazma örneği kullanılır. Reverse gruplama tüp yöntemiyle ayrıca mikropalak, jel veya mikrokolon yöntemleri kullanılarak da yapılır. Her yöntem, ilgili talimatlar doğrultusunda genellikle otomasyonla çalışılır ve değerlendirilir. **Reverse gruplamada lam yöntemi kullanılmaz.**

- **Amaç:** Eritrosit yüzeyinde taşınmayan antijenlere karşı serumdaki mevcut antikorların gösterilmesidir.

- **Araç gereçler**
 - Kan grubu tespit edilecek hasta ya da donör serum veya plazması
 - Santrifüj
 - 13x100mm'lik deney tüpleri
 - Cam kalemi/etiket
 - Aplikatör çubuk
 - Otomatik pipet
 - Serum fizyolojik
 - A2 ve O grubu eritrositlerin kullanımı tercihe bağlı
 - A1 ve B grubu eritrosit süspansiyonu

- **Teknik**
 - 2 adet tüp alınır ve birinin üzerine A1, diğerinin üzerine B harfi yazılır.
 - Her tüpe, 2'şer damla serum damlatılır.
 - A1 tüpüne bir damla A1 eritrosit süspansiyonu damlatılır.
 - B tüpüne bir damla B eritrosit süspansiyonu damlatılır.
 - Tüpler yavaşça karıştırılır.
 - Tüpler 1000 devirde 15-30 saniye santrifüj edilir.
 - Tüpler hafifçe çalkalanarak aglütinasyon gözlemlenir.
 - Eritrosit test tüplerinin herhangi birinde aglütinasyon görülmesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir.
 - Tüpün dibindeki eritrosit birikintileri tekrar yavaşça karıştırıldığında, karışımın homojen görünümü sonucun negatif olduğunu gösterir.
 - Sonuç kayıt edilir ve eritrosit testleri ile karşılaştırılır.
 - Zayıf serum reaksiyonlarını güçlendirmek için tüpler, 5-15 dakika boyunca oda ısısında inkübe edilir.

Kan Grubu	Serumda bulunan Antikorlar	Bilinen Eritrosit Süspansiyonları		
		A	B	O
A	Anti-B	-	+	-
B	Anti-A	+	-	-
AB	-	-	-	-
O	Anti-A, Anti-B	+	+	-

Tablo 1.3: Reverse gruplamada sonuçların değerlendirilmesi

1.1.3. Kan Grubu Tayininde Hata Kaynakları

Kan grubu tayininde yapılacak değerlendirme hataları transfüzyon sırasında telafisi mümkün olmayan sonuçlara sebep olacağından hata kaynaklarının bilinmesi son derece önemlidir.

1.1.3.1. Yanlış Negatif Sonuçların Nedenleri

- Tüpte reaksiyon için gerekli miyarlardan herhangi birisinin unutulması
- Eşit hacim ve konsantrasyonların olmaması
- Antijen-antikör kompleksinin temasını sağlayacak çalkalamanın unutulması
- İyi depolanmamış veya kullanım süresi geçmiş antiserumlar kullanılması
- Reaksiyon için yeterli zaman beklenilmemesi ve acele edilmesi
- Yanlış ısı derecesi, yanlış ortam ve yanlış teknik seçilmesi
- Aşırı derecede yoğun eritrosit süspansiyonu kullanılması
- Eski veya kötü depolanmış eritrosit kullanılması
- Antijen ya da antikörün fazla olması nedeniyle, antijen-antikör birleşmesinin normalden daha az çökelti oluşması
- Hastanın serumunda aglütininin yokluğunun olması
- İnkompete antikörlerle kaplanmış (bloke olmuş) eritrositlerin varlığı
- Hemolizin negatif sonuç gibi okunması

1.1.3.2. Yanlış Pozitif Sonuçların Nedenleri

- Özgün olmayan serumlar kullanılması (Kötü şartlarda depolanmış, bakteri üremiş ya da diğer serumlarla bulaşmış serumlar özgün olmayan-non spesifik-serum haline gelebilir.)
- Rouleaux (para dizisi) oluşması yalancı aglütinasyon görülmesi
- Sitrathlı veya oksalat ya da çok taze alınmış kan kullanılması halinde plazma pıhtısının olması
- Hastada oto aglütininlerinin varlığı
- Hasta serumu veya test serumlarında irregüler izoantikörlerin varlığı
- İnkomplet sıcak otoantikörlerin varlığı
- Uygun tekniğin seçilmemesi
- İnkomplet antikörlerle kaplı eritrositlerin varlığı

1.2. Rh (D) Sistemine Ait Tiplendirme Testleri

➤ Rh faktörü (Rh antijeni)

Kandaki bir diğer sınıflama faktörü de Rh faktörüdür. Macacus Rhesus maymunlarından alınan eritrositlerin, tavşanların periton boşluğuna verilmesi sonucu tavşan kanında maymun eritrositlerine karşı antiserum (antikör) elde edilir. Bu antiserumların maymun eritrositlerini aglütine ettiği görülür. İnsanlarda da bu antijene benzeyen bir antijen tespit edilmiştir. Bu faktöre-antijene “Rhesus”adı verildi. Kısaca Rh şeklinde ifade edilir. Rh antijeninin, kandaki varlığı Rh pozitif (+), olmaması ise Rh negatif (-) olarak adlandırılır.

Beyaz ırkın % 85'i Rh (+), % 15'i ise Rh (-)'tir. Siyah ırkın % 95'i Rh (+), % 5'i ise Rh (-)'tir.

Rh (+) olan bir insanın serumunda anti-Rh aglütinin bulunmaz, Rh (-) olan insanın eritrositlerinde antijen, serumunda da aglütinin yoktur.

Rh faktörü yenidoğanda hemolitik bozukluğa yol açar. Fetüs Rh (+), anne Rh (-) ise ve anne daha önce Rh (+) fetüslü bir gebelik geçirmişse Rh faktörü fetüs için ölümcül olur. Başka bir ifadeyle Rh (-) bir kadın, Rh (+) bir bebeğe gebe kalırsa anne kanında, bebek antijenine karşı Anti-Rh (Anti-D) aglütininleri-antikorları meydana getirir. Birinci çocuğa gebelik sırasında oluşan anti-Rh aglütininleri zararsız seviyededir. Ancak gebelikler arttıkça giderek aglütinin miktarı da artar. Bu aglütininler ikinci hamilelikte, çocuğun Rh (+) eritrositlerini aglütine eder yani, eritrositlerini parçalayarak hemolitik sarılığa sebep olur. Bu olaya **eritroblastozis fetalis** denir. Bu, sadece Rh (-) annelerin çocuklarında ortaya çıkabilen bir durumdur.

Bu olayda çok sayıda eritrosit yıkıma uğradığı için vücutta kan yapım faaliyeti artar. Hücrelerin hızlı yapımı nedeniyle çekirdekli, blastik hücreler dâhil birçok genç tip (eritroblast) hücre dolaşıma verilir. Eritroblastozis fetalis adı da buradan gelir.

Eritroblastozis fetalis, oluşan ağır anemiden dolayı ölüm ya da arazlara sebep olur. Vücutta eritrosit yıkımı sonucu açığa çıkan bilirubin sinir hücrelerinde tahribat yaparak kernikterus (beyin hasarı) ortaya çıkar. Bu durum kalıcı mental bozukluklar, beyinin motor bölgesinin hasarı ve işitme kaybı ile karakterizedir.

Eritroblastozis fetalisten aglütininlerin önlenmesi, doğan bebeğin kanın Rh negatif kan ile değiştirilmesiyle gerçekleşir. Bir taraftan 400cc negatif kan verilirken diğer taraftan yeni doğanın Rh pozitif kanı uzaklaştırılır. Bu işlem, bilirubini düşük tutmak ve kernikterusu önlemek için ilk birkaç hafta içinde, birkaç kez tekrarlanır. 6 hafta ya da daha fazla sürede verilen Rh negatif kan, bebeğin kendi Rh pozitif kanı ile yenilenirken anneden gelen anti-Rh aglütininler yıkılmış olur.

Bir başka aglütininleri önleme şekli ise şöyledir: Eğer annede eritroblastozis fetalis durumu biliniyorsa ilk doğumdan sonra 72 saat içerisinde anti-Rh antikorlarının Rh immün globülin şeklinde tek doz olarak verilmesi ile önlenir. Bu tür pasif aşılama, anne tarafından aktif antikör üretimini engeller. Böylece ilk doğumdan sonra yapılan bu uygulama, sonraki gebeliklerde eritroblastozis fetalis olma olasılığını büyük oranda düşürür.

➤ **Rh antikorları**

Rh antikorları genelde immün kaynaklı IgG yapısında antikorlardır ve intravasküler hemoliz oluşturmaz. IgM ya da IgA tipi Rh antikorları nadirdir. IgG antikorların varlıkları en iyi olarak albumin, enzim ve Coombs testleri ile gösterilir.

➤ **Rh (D) gruplama**

Rh faktörü genlerle geçer. Rh faktöründe en güçlü ve bağışıklığı en fazla sağlayan antijen D antijenidir. Ayrıca C, c, E ve e antijenleri de vardır.

➤ **Rh (D) gruplamada genel prensipler**

- Her kan bağışında Rh (D) tiplendirilmesi yapılır.
- İlk kez kan grubuna bakılan, kan bağışlayan kişide iki farklı anti-D gruplama reaktifi kullanılır.
- Her iki anti-D reaktifiyle net olarak pozitif reaksiyon veren kanlar **D pozitif** olarak değerlendirilir.
- Her iki anti-D reaktifiyle net olarak negatif reaksiyon veren kanlar **D negatif** olarak değerlendirilir.
- Anti-D reaktifleriyle uyumsuz sonuçlar alınırsa testler tekrar edilir. D grubunun şüpheli bulunduğu durumlarda testi **D pozitif** olarak değerlendirmek kan bağışlamak adına daha güvenlidir.
- Anti-D serumu ile reaksiyon veremeyen eritrositler zayıf D ile test edilmelidir.
- **D antijeni dışındaki diğer Rh antijenleri bazı özel durumlarda çalışmalıdır. Bunlar;**
 - Bilinmeyen Rh antikorlarının tanımlama,
 - Rh antikorları taşıdığı bilinen alıcılara transfüzyon,
 - Babalık tayini ve diğer aile çalışmaları,
 - Çeşitli test panelleri için eritrosit hazırlamadır.
- D antijeninin tespit edilmesinde, yüksek proteinli ve düşük proteinli **antiserumlar** kullanılır.
 - **Yüksek proteinli antiserumlar:** Yüksek konsantrasyonda protein ve diğer makromolekülleri içerir. Lam, tüp veya mikroplak yöntemlerinde kullanmak için hazırlanmıştır. Rutinde yüksek protein içerikli anti -D antiserumu kullanılır.
 - **Düşük proteinli antiserumlar:** Kontrol tüpleri pozitif bulunan ve direkt coombs testi pozitif örneklerde kullanılır.

1.2.1. Lam Yöntemiyle Rh Tayini

- **Araç gereçler**
 - Lam
 - Aplikatör ubuk
 - % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu
 - Anti -D (anti -Rh) serumu
- **Teknik**
 - Temiz bir lam alınır ve üzerine 1-2 damla anti -D serumu damlatılır.
 - Damlanın üzerine 1-2 damla % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu eklenir.
 - Aplikatör çubukla karıştırılır.
 - Lam, dairevi hareketlerle iyice karıştırılarak aglütinasyon olup olmadığına bakılır.
 - Aglütinasyon görülürse Rh (+), görülmezse Rh (–) olarak değerlendirilir.

1.2.2. Tüp Yöntemiyle Rh Tayini

- **Araç gereçler**
 - Santrifüj
 - Anti-D serumu
 - Tüp
 - Cam kalemi/etiket
 - Aplikatör çubuk
 - Otomatik pipet
 - Serum fizyolojik
 - Hastanın % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu

- **Teknik**
 - İşaretlenmiş temiz bir tüpe bir damla anti-D damlatılır.
 - Kontrol yazılmış tüpe, kontrol serumundan bir damla damlatılır.
 - Her tüpe test edilecek % 2-5'lik eritrosit süspansiyonundan bir damla damlatılır.
 - Tüpler hafifçe karıştırılır.
 - 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir ya da oda ısısında 3-4 dakika bekletilir.
 - Tüpler tekrar hafifçe karıştırılır.
 - Aglütinasyon olup olmadığı kontrol edilir.
 - Sonuç değerlendirilir ve kayıt edilir.
 - Test sonucu negatif ise donör kanı, mutlaka D antijeninin zayıf formları için zayıf D (Du) testi çalışılır.

1.2.3. Zayıf D Testi (Du Testi)

Bazı eritrositler, birçok anti -D tarafından direkt aglütine edilemeyecek zayıflıkta bir D antijeni taşır. D antijeninin bu zayıf durumu, en belirgin olarak test eritrositinin anti-D ile inkübasyonunununundan sonra İndirekt Antiglobülin Test (İAT) ile tanımlanabilir.

Du antijenine, beyazlarda % 0,4-1 oranında rastlanır ve genellikle C ve E ile birlikte bulunur. Siyahlarda ise % 3-4 oranında rastlanmakta ve c ve e ile birlikte görülmektedir. Du eritrositler, D eritrositlerinden daha az immünojeniktir. Zayıf D fenotipi, hassas anti-D serumlarla direkt aglütinasyon testi ile ölçülebilir.

Verici kanı zayıf D için test edilmelidir. Alıcıdaki zayıf D, daha az öneme sahiptir.

Rh negatif kişilerin % 70'inde bir ünite Rh pozitif kan verilmesinden sonra anti-D antikorları oluşur. D antijeni her zaman güçlü reaksiyon vermeyebilir. Ek işlemler (antiglobülin testi) sonrası gösterilebilen D antijenleri Du olarak isimlendirilir. Kuvvetli reaksiyon verebilen Du antijenleri lam ve hızlı tüp teknikleri ile tanımlanabilir, ancak daha zayıf aglütinasyon oluşturanlar genellikle hatalı olarak Rh negatif olarak tanımlanır.

Bu test indirekt antiglobülin fazında test eritrositlerinin anti-D ile inkübasyonu prensibine dayanır.

➤ **Araç gereçler**

- Santrifüj
- Anti -D serumu
- Tüp
- Cam kalemi/etiket
- Aplikatör çubuk
- Otomatik pipet
- Serum fizyolojik
- Hastanın % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu

➤ **Teknik**

- İşaretlenmiş temiz bir tüpe 1 damla anti-D damlatılır.
- Kontrol yazılmış tüpe, kontrol serumundan bir damla damlatılır.
- Her tüpe, test edilecek olan % 2-5'lik eritrosit süspansiyonundan bir damla damlatılır.
- Tüpler hafifçe karıştırılır.
- 15-30 dakika 37°C'de inkübe edilir.
- Tüpler, 1000 devirde 15-30 saniye santrifüj edilir.
- Tüpler tekrar hafifçe karıştırılır.
- Aglütinasyon olup olmadığı kontrol edilir.
- Sonuç değerlendirilir ve kayıt edilir.
- Eğer test tüpünde aglütinasyon var fakat kontrol tüpünde aglütinasyon yok ise test sonucu Rh (D) pozitif olarak değerlendirilir. Bu durumda antiglobülin fazında işleme devam edilmez, sonuç verilir.
- Test hücreleri aglütine olmamış ise hücreler serum fizyolojik ile 3-4 defa yıkanır.
- Test tüpüne, uygulanan tekniğe göre antiglobülin eklenir.
- Tüpler hafifçe karıştırılır.
- Tüpler 1000 devirde 15-30 saniye santrifüj edilir.
- Tüpler hafifçe karıştırılır.
- Aglütinasyon gözlenir.
- Eğer test tüpünde aglütinasyon var fakat kontrol tüpünde aglütinasyon yok ise test sonucu **Rh (+)** olarak değerlendirilir.

1.2.4. Rh Tayininde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

- Rh (+) D antijeninin varlığını ve Rh (—) ise yokluğunu ifade eder.
- Bu belirlemeyi yapmak için bir damla alıcı eritrositi ile bir damla anti-D reagenti ile karıştırılır, santrifüj edilir ve yeniden süspansiyon edilip aglütinasyon açısından incelenir.

- Anti-D tarafından aglutine edilen eritrositler D antijeni taşıyor ve Rh pozitif olarak isimlendirilir.
- Anti-D varlığında aglutine olmayanlar ise Rh negatif olarak adlandırılır.
- D gruplama transfüzyon öncesi uyumluluk testlerinin bir parçası olarak ABO gruplama ile birlikte yapılır.
- Ters tiplendirme Rh için yapılmaz, çünkü anti-D doğal antikor olmayıp sadece D antijeniyle karşılaşmış bireylerde bulunur.
- Beklenmedik bu anti-D antikorları antikor tarama testinde tespit edilebilir.
- Ters kontrolü olmadığı için Rh pozitif bireyin gerçekten Rh pozitif olduğunu kesinleştirmek için Rh kontrolünü yapmak gereklidir.
- Yanlışlıkla Rh (-) tespit edilen bu Rh (+) bireyler, Rh (-) kan alacakları için bir problem oluşturmaz. Ancak, Rh (-) görünen bu bireyler Rh negatif bir alıcı için donör olduklarında, potansiyel olarak Anti-D üretimine neden olabilir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Kan grubu tayini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>Lam Yöntemiyle (Eritrositle) Kan Grubu Tayini</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Temiz üç lam alınız.➤ Cam kalem ile lamlardan birine anti -A, birine anti -B, diğerine kontrol yazınız.➤ Anti -A yazılmış lama bir damla anti -A damlatınız.➤ Anti -B yazılmış lama bir damla anti -B damlatınız.➤ Kontrol yazılmış lama bir damla hasta serumu veya plazması damlatınız.➤ Lamlara, test edilecek eritrositlerin iyice karıştırılmış süspansiyonundan birer damla damlatınız.➤ Her bir lamdaki karışımı, ayrı ve temiz bir aplikatör çubuk yardımıyla karıştırarak 20-40 mm'lik bir alana yayınız.➤ Karıştırma işlemine, lamı dairevi bir şekilde, hafifçe öne ve arkaya doğru hareket ettirilerek 2 dakika sallayarak devam ediniz.➤ Aglütinasyon olup olmadığına bakınız. <p>Tüp Yöntemiyle (Eritrositle) Kan Grubu Tayini</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Temiz üç tüp alınız.➤ Cam kalem ile tüplerden birine anti-A, birine anti-B, diğerine kontrol yazınız.➤ Anti-A yazılmış tüpe bir damla anti-A damlatınız.➤ Anti-B yazılmış tüpe bir damla anti-B damlatınız.➤ Kontrol yazılmış tüpe, bir damla hasta ya da donör serumu veya plazması damlatınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kişisel güvenlik önlemleri almayı unutmayınız.➤ Aynı amaç için etiket de kullanabilirsiniz.➤ Lam yöntemini, seramik veya porselen fayans üzerinde asla denemeyiniz.➤ Tüplerin içine % 2-5'lik eritrosit süspansiyonundan koyunuz.➤ Santrifuj işlemi çok yavaş veya kısa olursa hatalı pozitif reaksiyonlar, çok hızlı veya uzun olursa hatalı negatif reaksiyonlar görülebileceğinden, zaman ve devir ayarlarına uyunuz.➤ Lamlar bu süre zarfında çok ısıtılmış veya soğutulmuş bir alana koymayınız.➤ Serum/eritrosit karışımına enfeksiyöz etkenler bulaşabileceği için elle dokunmayınız.➤ Zayıf veya negatif reaksiyon veren sonuçları mikroskopik olarak da kontrol ediniz.➤ İnkübasyonda plazma pıhtılaşmaması için serumu tercih

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tüplere, test edilecek eritrosit süspansiyonundan birer damla damlatınız. ➤ Tüpleri hafifçe sallayarak karıştırınız. ➤ 1000 devirde 15-30 saniye santrifüj ediniz. ➤ Tüplerde aglütinasyon olup olmadığına bakınız. <p>Tüp Yöntemiyle (Serum ile) Kan Gurubu Tayini</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2 adet temiz tüp alınız. ➤ Tüplerden birinin üzerine A, diğerine ise B harfi yazınız. ➤ Her iki tüpe hasta serumundan 2'er damla koyunuz. ➤ A harfi yazılı tüpe bir damla A grubu eritrosit süspansiyonu koyunuz. ➤ B harfi yazılı tüpe bir damla B grubu eritrosit süspansiyonu koyunuz. ➤ Tüpleri, yavaşça çalkalayarak karıştırınız. ➤ Karışımı, 5-6 dakika oda ısında bekleterek inkübe ediniz. ➤ İnkübasyon sonunda 1000 devirde 1 dakika santrifüj ediniz. ➤ Üstteki sıvının hemoliz olup olmadığına bakınız. ➤ Hafifçe çalkalayarak aglütinasyonun olup olmadığına bakınız. 	<p>ediniz.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Tüplere, test edilecek eritrositlerin en az üç kez yıkanmış süspansiyonundan birer damla damlatınız. ➤ Tüp içerikleri yavaşça karıştırınız. ➤ Alternatif olarak tüpleri, santrifüj etme yerine 1 saat oda ısısında bırakınız. ➤ Eritrosit test sonuçlarını ABO reverse gruplama prensibi ile karşılaştırarak doğrulayınız.
<p>Lam Yöntemiyle Rh Tayini</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Temiz bir lam alınız. ➤ Üzerine 1-2 damla Anti -D serumu koyunuz. ➤ Damlanın üzerine 1-2 damla % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu koyunuz. ➤ Aplikatör çubukla karıştırınız. ➤ Lamı, dairevi hareketlerle iyice karıştırılarak aglütinasyon olup olmadığına bakınız. 	

Tüp Yöntemiyle Rh Tayini

- Bir tüpe, Anti -D serumundan iki damla koyunuz.
- Üzerine bir damla % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu koyunuz.
- Hafifçe çalkalayınız.
- Oda ısısında 3-4 dakika bekletiniz.
- 1000 devirde bir dakika santrifüj ediniz.
- Hafifçe çalkalanarak aglütinasyonun olup olmadığına bakınız.

- Tüm analizleri doğru ve güvenilir bir şekilde ve zamanında sonuçlandırınız, okuyunuz, yorumlayınız, rapor ediniz.
- Raporları yazılı veya elektronik ortamda saklayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Kan grubu antijenleri ile ilgili ifadelerden hangisi yanlıştır?
A) Kan grubu antijenleri, eritrositlerin yüzeyinde bulunur, glikoprotein ve lipoprotein yapısındadır.
B) Kan grubu antijenleri, kanda anti-A ve anti-B şeklinde bulunur.
C) Genlerle kontrol edilen antijenler, ilk olarak fetal hayatın ilk aylarında oluşmaya başlar ve yaşam boyu devam eder.
D) Kan grubu antijenlerinin önemli bir kısmı birbiriyle ilişkilidir.
E) Kan grubu antijenleri, kan grubu sistemlerini ve subgrupları oluşturur.
2. Aşağıdakilerden hangi Rh grubuna sahip anne ve/veya babanın çocuklarında, eritroblastozis fetalis ortaya çıkar?
A) Rh (-) annelerin çocuklarında
B) Rh (+) annelerin çocuklarında
C) Rh (+) babaların çocuklarında
D) Rh (-) babaların çocuklarında
E) Rh (+)anne ve Rh (-) babaların çocuklarında
3. Aşağıdakilerden hangisi yenidoğan çocuklarda anti-A ve anti-B antikor seviyesini gösteren özelliklerden değildir?
A) Yenidoğan çocuklarda anti-A ve anti-B antikorları bulunmaz.
B) Yenidoğan çocuklarda anti-A ve anti-B antikorları bulunsa dahi çok zayıf titrede bulunur.
C) Yenidoğan çocuklarda anti-A ve anti-B antikorları ancak, doğumdan sonraki ilk 3-6 ay içinde belirli titrelere görülmeye başlar.
D) Yenidoğan çocuklarda anti-A ve anti-B antikorları 5-10 yaşlarda en yüksek seviyeye ulaşır.
E) Yenidoğan çocuklarda anti-A ve anti-B antikorları 15 yaşından sonra azalır.
4. Eritrositlerin yüzeyinde bulunan antijenlere bağlı olarak kan gruplarını belirleyen kaç tane kan grubu sistemi vardır?
A) 19 kan grubu sistemi
B) 22 kan grubu sistemi
C) 27 kan grubu sistemi
D) 31 kan grubu sistemi
E) 40 kan grubu sistemi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle coombs testini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Antikor tarama ve tanımlama testlerini araştırınız.
- Antikor tarama ve tanımlama testlerinin önemini araştırınız.
- Edindiğiniz bilgileri arkadaşlarınızla tartışınız.

2. ANTİKOR TARAMA VE TANIMLAMA TESTLERİ

Antikor tarama testi, bireyde eritrosit antijenlerine karşı antikor olup olmadığını tespit etmek için yapılır.

Antikor tanımlama testi, var olan ya da muhtemel olan antikorun, hangi kan grup sistemi ile ilişkili olduğunu ve hangi eritrosit antijenine karşı geliştiğini tespit etmek içindir.

Antikor tarama tüm transfüzyon öncesi ve antenatal (gebelikle ilgili) test örneklerinde uygulanır.

Doğumdan önce yapılan muayenelerde, her gebenin kan grubu ve Rh faktörü araştırılır. Aday çiftlerde kan uyumsuzluğu tespit edildiğinde gebeliğin 6. ayından itibaren anne kanında anti Rh antikoruna aranmaya başlanır. Rh antikorlarının varlığı **coombs testi** yani, **antikor tarama ve tanımlama testiyle** belirlenir.

Genelde tüp yöntemi kullanılır. Ayrıca mikropalak, jel veya mikrokolon yöntemleri kullanılarak da yapılır. Her yöntem, ilgili talimatlar doğrultusunda genellikle otomasyonla çalışılır ve değerlendirilir.

2.1. Coombs Testi

Antikorlar, globulin yapısında proteinlerdir. İnsan globülinlerine karşı oluşan antikorlara Anti-Human Globülinler (AHG) denir. AHG'ler, antikorlara karşı gelişen anti antikorlardır. Bu antikorların kullanıldığı testlere **Anti-Human Globülin (AHG) testi** veya **Coombs testi** denir.

Eritrositlerin yüzeyinde yer alan antijenlere yönelik antikorlar, doğal ve immün antikorlar olarak iki gruba ayrılır. Ayrıca alloantikor (izoantikor) ve otoantikor olarak da sınıflandırılır.

Bireyin kendi eritrositlerinin yüzeyinde taşımadığı antijenlere karşı geliştirdiği antikorlara **alloantikor** veya **izoantikor**, kendi eritrositlerinin yüzeyinde taşıdığı antijenlere karşı geliştirdiği antikorlara **otoantikor** denir.

Doğal Antikorlar	İmmün Antikorlar
Eritrositlerin karbonhidrat antijenlerine yönelik	Eritrositlerin protein antijenlerine yönelik
Komplet	İnkomplet
Soğuk	Sıcak
Genellikle IgM	Genellikle IgG
Plasentadan geçmez.	Plasentadan geçer.

Tablo 2.1:Doğal ve immün eritrosit antikorlarının özellikleri

Testlerde kullanılan *coombs serumu* hayvanlara, örneğin, tavşana insan immünglobulinleri enjekte edilerek hazırlanır.

Antikorlar, serumda serbest olarak veya eritrositlerin yüzeyini kaplamış olarak bulunur. ***Eritrositlerin yüzeyini kaplamış antikorlar direkt coombs testiyle serbest dolaşan antikorlar ise indirekt coombs testi ile gösterilir.***

Eritrosit antijen ve antikorları ile ilgili tüm testlerde, bir ön işlem olarak eritrositlerin serum fizyolojik ile yıkanarak kendi serumlarından uzaklaştırılmaları sağlanır.

2.1.1. Direkt Coombs Testi

Direkt Coombs testi eritrositlere *in vivo* yapışmış IgG sınıfından alloantikor ve otoantikorların belirlenmesinde kullanılır. “Sıcak” antikorlu otoimmün hemolitik anemilerde direkt Coombs pozitif bulunur. Rh uyuşmazlığına bağlı yenidoğanın hemolitik hastalığında ise, kordon kanı eritrositleri ile yapılan test pozitifdir.

Eritrosit yüzeyinde yer alan antijenlerin, kendilerine özgül antikorlarla vücutta kaplanışını göstermek için yapılan teste Direkt Coombs Testi (Direkt Antiglobülin Testi - DAT) denir.

Direkt coombs testi, vücuttaki eritrosit yüzeyini kaplayan ve eritrositlere yapışmış durumdaki antikorların varlığını yani, doğal antikorları gösterir. ABO sistemindeki anti-A ve anti-B gibi aglütininler bu tür antikorlara örnektir. Bu antikorlar IgM şeklindedir ve plasentadan geçemez, antijenle reaksiyona, 27°C'nin altında girer.

Direkt coombs testi;

Yeni doğanın hemolitik hastalığında (Eritroblastozis fetalis),

Otoimmün hemolitik anemilerde,

İlaçların yol açtığı hemolitik hastalıklarda,

Kan transfüzyon reaksiyonlarının araştırılmasında yararlanılan testtir.

Bu hastalıklarda eritrositlerin yüzeyi antikorlarla kaplanır. Test sonucunun pozitif olması, hastalık tehlikesinin varlığını gösterir.

Kan transfüzyonunda antikor taramasının sonucu negatif olmalıdır.

Bu test için hasta kan örnekleri, EDTA içeren antikoagülanlı tüplere alınır.

Bu test için inkübasyon yapılmaz, tek aşamalıdır. Testte kullanılacak eritrositler, serum fizyolojik ile 3-4 defa yıkanarak plazmalarından uzaklaştırıldıktan sonra kullanılır. Negatif çıkan testlere antiglobulin kontrol eritrositleri eklenir.

➤ **Araç gereçler**

- Santrifüj
- Pastör pipeti
- EDTA'lı kan örneği
- 10x75 veya 12x75 mm'lik tüp
- Serum fizyolojik
- Coombs serumu
- IgG kaplı antiglobulin kontrol eritrositleri (Coombs kontrol eritrositleri)

➤ **Teknik**

- % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanır.
- Bir tüpe, hazırlanan eritrosit süspansiyonundan 1-2 damla konur.
- Üzerine 1-2 damla coombs serumu ilave edilir.
- Tüpler hafifçe çalkalanır.
- 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir.
- Aglütinasyon olup olmadığına bakılır. Aglütinasyonun varlığı pozitif olarak değerlendirilir.
- Aglütinasyon **negatif ise** testi teyit etmek için IgG kaplı kontrol eritrositlerinden 1 damla tüplere ilave edilir.
- 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir.
- Aglütinasyon yönünden değerlendirilir.
- En az 2 pozitif aglütinasyon görülmelidir.

2.1.2. İndirekt Coombs Testi

Hamile kanında, doğumdan önce A ve B antijenleri dışındaki eritrosit antijenlerine karşı oluşan ve serbest olarak dolaşan antikorların varlığını tespit etmek için yapılan teste,

İndirekt Coombs Testi (IAT - İndirekt Antiglobülin Testi - Antikor Tarama Testi - İndirekt Anti-Human Globülin Testi) denir.

İndirekt coombs testi;

Kan transfüzyonlarında crossmatch için,

Hemolitik anemilerde otoantikörlerin aranması için,

Hamile serumunda plasental geçiş ile yenidoğan çocukta hemolitik hastalığa sebep olabilecek antikörleri aramak için yapılır.

Bu testle hasta serumunda eritrositlere yapışmamış inkomplet antikörler aranır. İmmün antikörler genellikle inkomplet yapıda olup en uygun 37°C'de reaksiyona giren IgG sınıfından antikörlerdir. Plasentadan geçer.

Duyarlı bir antikor tarama testinde iki veya üç farklı donörden alınmış test hücreleri kullanılmalıdır.

Bu testte, hamile bir annede anti-Rh antikörleri araştırma amacı ile çalışılıyorsa hasta serumu, çapraz karşılaştırma amacıyla çalışılıyorsa alıcı serumu kullanılır.

Kan antikoagülansız tüpe alınır.

➤ Araç gereçler

- Santrifüj
- Benmari
- Pastör pipeti
- Aplikatör çubuk
- Hangi antikor araştırılacak ise ona uygun antijen taşıyan % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu
- 10x75 veya 12x75 mm'lik tüp
- Serum fizyolojik
- Coombs serumu veya anti-IgG

➤ Teknik

- Hastadan kan alınır, serumu ayrılır.
- O Rh (+) olduğu bilinen kanın eritrositlerinden % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanır.
- Bir tüpe hasta serumundan 1-2 damla konur üzerine hazırlanan eritrosit süspansiyonundan 1-2 damla konur ve karıştırılır.
- Tüpler 1000 devirde 1-2 dakika santrifüj edilir.
- Aglütinasyon olup olmadığına bakılır. Aglütinasyon yok ise 37°C'lik benmaride 30-60 dakika inkübasyona bırakılır.
- 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir.

- Aglütinasyon olup olmadığı gözlenir.
- Aglütinasyon yoksa serum fizyolojikle 3-4 defa yıkama yapılır.
- Üzerine 1-2 damla coombs serumu damlatılır.
- 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir.
- Tüp eğilerek aglütinasyona bakılır. Aglütinasyon varsa test pozitif olarak değerlendirilir.

➤ **Antikor tanımlama testi**

Antikor tanımlama testinde kullanılan reaktif, eritrosit paneli antijenik kompozisyonu bilinen 8-16 farklı O grubu eritrosit hücresinden oluşur.

Antikor tanımlama testinde kullanılan teknik antikor tarama testinde kullanılan teknik ile aynıdır. Ancak antikor tanımlama testinde kullanılan panel otokontrol içerirken antikor tarama testi otokontrol içermez. Çünkü immün hemolizin klinik belirtileri olmayan ve antikor tarama testi negatif olan hastalarda otokontrol ile önemli subklinik antikoru tespit etme ihtimali çok düşüktür.

Bu nedenle, otokontrol çoğu merkezde sadece antikor tarama testi pozitif olduğunda ve antikor tanımlama panelinin bir parçası olarak yapılmaktadır.

Alıcının eritrositleri kendi serumu ile karıştırıldığında aglütinasyon gözlenirse (otokontrol pozitif), reaksiyonun gerçekten immünolojik kökenli (antikor aracılıklı) olup olmadığı direk antiglobulin testi (DAT) ile doğrulanmalıdır.

2.1.3. Coombs Reaksiyonlarının Kontrolü

➤ **Direkt coombs ve indirekt coombs reaksiyonlarında hatalı negatif ve pozitif sonuçların nedenleri**

- **Hatalı negatif** reaksiyonunu en önemli sonuçlarından biri, eritrositlerin yeterli biçimde yıkanmaması (Serum fizyolojik, test tüplerini en az $\frac{3}{4}$ oranında doldurursa ve eritrositler her yıkamada titiz bir şekilde yeniden süspansiyon haline getirilirse bağlanmamış globulinler yeterli bir biçimde ortamdaki uzaklaştırılır.)
- Test çalışılırken ara verilmesi veya beklenmesi
- Yetersiz teknik nedeniyle zayıf reaktif testlerin pozitif yerine negatif olarak yanlış yorumlanması
- AHG serumunun uygunsuz depolanma (dondurulması gibi) ve saklanması
- AHG serumunun sisteme eklenmesinin unutulması dolayısıyla eritrositlerin globülinle kaplanmasının tespit edilmemesi (Renkli AHG serumları buna karşı geliştirilmiştir.)
- Dengesiz santrifüj yapılması (Yetersiz santrifüj aglütinasyon için optimal alt şartları sağlarken fazla santrifüj eritrositleri çok sıkı kümeleştirir ki bu da yeniden süspansiyon için gerekli çalkalama sırasında hassas aglütinatlar kırılabilir.)

- Eritrosit konsantrasyonu yani eritrosit hücrelerinin az ya da çokluğuna bağlı olarak aglütinasyon sonucunun yanlış yorumlanması
- Yıkama solüsyonlarının pH'sı (7.0-7.2) düşük olması
- **Hatalı pozitif** sonuçlanmasının en önemli sonuçlarından biri, yıkama ve AHG serumu eklemeyen önce eritrositlerin aglütine olması
- Kirli cam eşyaların eritrositlerin aglütinasyonuna neden olması
- Aşırı santrifüj yapılmasının eritrositlerin sıkı bağlanmasına neden olması bu da kümelerin bağlanmasına, çalkalarken dahi tamamen açılmamasına sebebiyet vermesi ve buna bağlı olarak aglütinasyon sonucunun yanlış yorumlanması

2.1.1.1. Coombs Serumunun Pozitif ve Negatif Kontrolü

Coombs serumu, human antikorlarla sarılmış ve iyice yıkanmış eritrosit süspansiyonu ile aglütinasyona neden olur.

Coombs serumu iyice yıkanmış fakat antikorlarla sarılmamış eritrosit süspansiyonuyla aglütinasyon vermez. Böylece coombs serumunun aktif olup olmadığını anlamak için bu iki kontrol kullanılır.

➤ Araç gereçler

- Santrifüj
- Benmari
- Tüp
- Aplikatör çubuk
- Otomatik pipet
- Pozitif kontrol için Rh (+) kan seçilir ve eritrositleri serum fizyolojikle yıkanarak % 2-5'lik süspansiyon hazırlanır.
- Negatif kontrol için Rh (-) kan seçilir ve eritrositleri serum fizyolojikle yıkanarak % 2-5'lik süspansiyon hazırlanır.
- Anti Rh (D) serumunun 1\10 luk dilüsyonu serum fizyolojikle hazırlanır.
- Coombs (AHG) serumu

➤ Teknik

- Pozitif kontrol yazılı tüpe 1-2 damla pozitif eritrosit süspansiyonu damlatılır.
- Negatif kontrol yazılı tüpe 1-2 damla negatif eritrosit süspansiyonu damlatılır.
- Pozitif ve negatif yazılı tüplerin üzerine 1-2 damla dilüe anti Rh (D) serumu ilave edilir.
- Benmaride 37°C'de 30-60 dakika inkübe edilir.

- Eritrositler en az 20 misli serum fizyolojik ile 3-4 kez karıştırılarak yıkanır.
- Yıkama işleminden sonra üzerine 1-2 damla coombs serumu konur.
- Tüpler hafif çalkalanır ve 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir.
- Değerlendirmede pozitif yazılı tüpte aglütinasyon görülür, negatif yazılı tüpte ise aglütinasyon görülmez. Pozitif yazılı tüpte aglütinasyon görülmezse coombs serumu inaktif anlamına gelir. Her iki tüpte aglütinasyon görülmesi, coombs serumunda bakteriyel kontaminasyon olduğunu düşündürür. Aynı zamanda yıkamada kullanılan serum fizyolojik çözeltisinin kontrol edilmesi gerekir. Serum fizyolojik cam şişelerde koloidal silicat içeren deterjanla temas etmiş olabilir ki bu da eritrositleri kaplar ve nonspesifik olarak globülini tespit eder. Pozitif ve negatif kontrol tüpleri coombs direkt ve indirekt testlerinde kontrol açısından rutin olarak kullanılabilir.

2.2. Rh Antikor Titrasyon Yöntemleri

2.2.1. Slide Tarama Testi

➤ Araç gereçler

- Kan
- % 30'luk bovin albümin
- 0 Rh (+) kan eritrosit süspansiyonu
- Serum fizyolojik
- Otomatik pipet
- Lam
- Aplikatör çubuk
- Petri kutusu
- Kronometre
- Santrifüj

➤ Teknik

- 5 cc kan alınır, serumu ayrılır.
- Bir kısım serum, 2 kısım % 30'luk bovin albümin karıştırılarak serum dilüe edilir.
- Diüe serumdan bir damla, temiz bir lama konur.
- Üzerine iki damla yıkanmış eritrosit konur ve aplikatör çubukla iyice karıştırılır.
- Lam petri kutusu içine konulur.

-
- 45-50°C’de kronometreye basıp kutu arada sırada sallanır.
 - 2 dakika süreyle lam üzerindeki serum ve eritrosit karışımı gözlenerek aglütinasyon olup olmadığına bakılır.
 - Antikor yok ise hücreler dağınık duracak, antikor var ise 1 dakikadan önce kümeleşme yani aglütinasyon görülecektir.

2.2.2. Albüminli Tüp Titrasyon Yöntemi

Slide testi ile antikor seviyesi kabaca belirlendikten sonra spora alınan dilüsyon tüplerinin üzerine numaraları yazılır (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 ...).

➤ Araç gereçler

- Kan
- % 30'lik Bovin albümin
- 0 Rh (+) kan eritrosit süspansiyonu
- Serum fizyolojik
- Otomatik pipet/pipet
- Benmari
- Spor
- Santrifüj

➤ Teknik

- 5 cc kan alınır, serumu ayrılır.
- İlk tüp hariç, diğer tüplerin dip kısmına 0,1 cc % 20'lik albümin dağıtılır.
- İlk tüp hariç, diğer tüplerin dip kısmına 0,1 cc serum fizyolojik dağıtılır.
- 1. ve 2. tüplere test edilecek serumdan 0,1'er cc konur.
- İkinci tüp iyice karıştırılıp 0,1 cc alınır üçüncü tüpe aktarılır, üçüncü tüpteki karışımdan 0,1 cc alınır, dördüncü tüpe aktarılır böylece tüplere aktarma devam edilir, en son tüpe geldiğinde 0,1 cc dışarıya atılır.
- Daha sonra 1. tüpe yıkanmış fakat süspansiyonu yapılmamış eritrosit konur.
- 2. tüpten itibaren eritrosit süspansiyonu 0,1'er cc dağıtılır, tüpler iyice çalkalanır.
- Benmaride 37°C'de 30-60 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyondan sonra tüpler kuvvetle çalkalanır.
- 1000 devirde 1-2 dakika santrifüj edilir.
- Aglütinasyona bakılır.
- Serum fizyolojik ile 3 kez yıkanır.
- 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir.
- Serum fizyolojik döküldükten sonra serum fizyolojik kalıntısı süzgeç kağıdı ile emdirilir sadece tüpte eritrositler kalır.
- Tüplerin üzerine 1-2 damla anti human globülin damlatılır.
- Tekrar 1000 devirde 1 dakika santrifüj edilir.
- Değerlendirmede kesin olarak aglütinasyon gösteren en yüksek serum dilüsyonu içeren tüp sonuç olarak yazılır. Örneğin 1/128 dilüsyon dâhil pozitifdir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Antikor tarama ve tanımlama testlerini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>Direkt Coombs Testi</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Venöz kan alınız.➤ Plazmasını ayırınız.➤ % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlayınız.➤ Bir tüpe, eritrosit süspansiyonundan 1-2 damla koyunuz.➤ Üzerine 1-2 damla coombs serumu ilave ediniz.➤ Tüpleri hafifçe çalkalayınız.➤ Aglütinasyon olup olmadığına bakınız.➤ Aglütinasyon negatif ise IgG kaplı kontrol eritrositlerinden 1 damla tüplere ilave ediniz..➤ 1000 devirde 1 dakika santrifüj ediniz.➤ Aglütinasyon yönünden değerlendiriniz.➤ Sonucu rapor ediniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kanı, mutlaka EDTA içeren antikoagülanlı tüplere alınız.➤ Şüpheli durumlarda aglütinasyon olup olmadığına, mikroskopta inceleme yaparak karar veriniz.

<p>İndirekt Coombs Testi</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Venöz kan alınız. ➤ Serumunu ayırınız. ➤ O Rh (+) kandan % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlayınız. ➤ Bir tüpe, serumdan pastör pipetiyle 1-2 damla koyunuz. ➤ Serum üzerine O Rh (+) eritrosit süspansiyonundan 1-2 damla koyarak karıştırınız. ➤ Deney tüpünü 1000 devirde santrifüj ediniz. ➤ Santrifüj sonunda tüpteki karışımı çalkalayarak makroskopik olarak aglütinasyon olup olmadığına bakınız. Aglütinasyon yok ise ➤ Tüpü 37°C'lik benmaride 30-60 dakika inkübasyona bırakınız. ➤ İnkübasyon sonunda aglütinasyon olup olmadığını gözleyiniz. ➤ Deney tüpünde aglütinasyon yoksa karışımı serum fizyolojikle 3-4 defa yıkayınız. ➤ Tüpteki karışım üzerine bir iki damla Coombs anti serumu damlatınız. ➤ Deney tüpünü 1000 devirde 1 dakika santrifüj ediniz. ➤ Tüpü eğerek aglütinasyon olup olmadığına bakınız. ➤ Sonucu rapor ediniz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Antikoagülansız tüpe kan alınız.
<p>Slide Tarama Testi ile Rh Antikor Titrasyonu</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Bir kısım serum ile 2 kısım % 30'luk bovin albümin karıştırılarak serumu dilüe ediniz. ➤ Dilüe serumdan bir damla, temiz bir lama koyunuz. ➤ Üzerine 2 damla yıkanmış eritrosit koyunuz. ➤ Aplikatör çubuk ile iyice karıştırınız. ➤ Lamı petri kutusu içine koyunuz. ➤ 45-50°C'de, 2 dakika süreyle bekletiniz. ➤ Lam üzerindeki serum ve eritrosit karışımını gözleyerek aglütinasyon olup olmadığına bakınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Petri kutusunu arada sırada sallamayı unutmayınız.

ÖLCME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. İnsan immünglobulinlerinin hayvanlara enjekte edilmesiyle hazırlanan madde aşağıdakilerden hangisidir?
A) Kan Serumu
B) İzotonik Serum
C) Eritrosit Süspansiyonu
D) Coombs Serumu
E) Crossmatch
2. Aşağıdakilerden hangisi için indirekt coombs testi yapılmaz?
A) Vücutta serbest olarak dolaşan antikorların varlığını tespit etmek için
B) Eritrositlerin yüzeyini kaplamış antikorların varlığını tespit etmek için
C) Kan transfüzyonlarında crossmatch için
D) Hemolitik anemilerde otoantikorların aranması için
E) Hamile serumunda plasental geçiş ile yeni doğan çocukta hemolitik hastalığa sebep olabilecek antikorları aramak için
3. Aşağıdakilerden hangisi, doğal antikorun özelliklerinden değildir?
A) Eritrositlerin karbonhidrat antijenlerine yöneliktir.
B) Soğuk antikorlardır.
C) İnkomplet yapıdadır.
D) Genellikle IgM yapıdadır.
E) Plasentadan geçmez.
4. Bireyin kendi eritrositlerinin yüzeyinde taşıdığı antijenlere karşı geliştirdiği antikor, aşağıdakilerden hangisidir?
A) Alloantikor
B) İzoantikor
C) Otoantikor
D) Rh antikor
E) Soğuk antikor

DEĞERLENDİRME

Cevaplarımızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle crossmatch testini tekniğine uygun yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Crossmatch testi hakkında bilgi toplayınız.
- Crossmatch test sonucunun negatif olmasının önemini araştırınız.

3. CROSSMATCH TESTİ

Crossmatch testi (Çapraz karşılaştırma testi), transfüzyon sırasında olabilecek antijen-antikor reaksiyonunun tüpte yapılan bir ön denemesi ve uygunluk testlerinin son aşamasıdır. ABO ve Rh uygun, antikor tarama testi negatif ise crossmatch testi yapılmaya başlanır. Majör crossmatch ve minör crossmatch olarak iki aşamada yapılır. **Crossmatch test sonucunun negatif olması, alıcı ve verici kanı arasında bir uyumsuzluk olmadığını gösterir.**

- **Crossmatch testinin amaçları**
 - Kan grubu belirlenip antikor tarama testi negatif bulunduğu anda alıcı ve verici ABO uyğunluğunun son kez doğrulanması
 - Etiketlenmede ve kayıtlarda verici veya alıcının kimlik bilgilerinde yapılacak hataların kontrolünün yapılması
 - Alıcının serumunda, vericinin eritrositlerine karşı reaksiyon gösterebilecek bir antikorun var olup olmadığının araştırılması (majör crossmatch)
 - Nadiren de olsa verilecek kanda, alıcının eritrositleriyle reaksiyona girebilecek irregüler antikorların (vücuda giren bir antijene karşı düzensiz, uygun olmayan aralıklarla oluşan antikor) aranması (minör crossmatch)

3.1. Majör Crossmatch Testi

Majör crossmatch temel testtir. Alıcı serum veya plazması ile vericinin eritrositlerinin karıştırılıp coombs serumu kullanılarak eritrositler üzerinde antikor bulunup bulunmadığı araştırılır.

Bu işlem için gerekli olan vericinin kanı torbaya alındıktan sonra torbanın hortumundan alınır.

Alıcı serumu + vericinin eritrositleri + coombs serumu

➤ **Tüp tekniği ile majör crossmatch testi**

- **Araç gereçler**
 - Santrifüj
 - Benmari
 - Küçük boy tüpler
 - Alıcının serumu
 - Serum fizyolojik
 - Vericinin eritrosit süspansiyonu
 - Coombs serumu
 - % 22'lik bovinalbumin

➤ **Teknik**

- Tüpe, % 2-5'lik vericinin eritrosit süspansiyonundan 1 damla konur.
- Üzerine 2-3 damla alıcının serumundan eklenir, karıştırılır.
- Oda ısısında 15 dakika inkübe edilir.
- 1000 devirde 15 saniye santrifüj edilir.
- Tüpün üst kısmında hemoliz olup olmadığına bakılır.
- Tüpü çalkalayarak dipte aglütinasyon olup olmadığına bakılır.
- Hemoliz ve aglütinasyon yok ise bir sonraki aşamaya gidilir.
- %22'lik bovinalbuminden 2 damla tüpe eklenir ve karıştırılır.
- Benmari'de 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
- 1000 devirde 15 saniye santrifüj edilir.
- Yeniden tüpün üst kısmında hemoliz olup olmadığına bakılır.
- Tüpü çalkalayarak dipte aglütinasyon olup olmadığına bakılır.
- Yine hemoliz veya aglütinasyon yoksa tüpteki eritrositler 3-4 kez yıkanır.
- Anti Human Globulin (Anti IgG) 2-3 damla eklenir, karıştırılır.
- Benmari'de 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
- Yeniden 1000 devirde 15 saniye santrifüj edilir.
- Tüpün üst kısmında hemoliz olup olmadığına ve tüpü çalkalayıp dipte aglütinasyon olup olmadığına bakılarak değerlendirme yapılır.
- Tüplerde aglütinasyon yoksa crossmatch uygundur, hemoliz ve aglütinasyon varsa crossmatch uygun değildir.

3.2. Minör Crossmatch Testi

Verici serumu ile alıcı eritrositleri karıştırılarak aglütinasyon olup olmadığına bakılır. Çok kullanılan bir yöntem değildir.

3.3. Acil Crossmatch (Immediate Spin, IS) Testi

Acil durumlar dışında **rutin crossmatch testleri yerine** kullanılmamalıdır. Bu yöntemde alıcı serumu ya da plazması ile verici eritrositleri karıştırılıp hemen santrifüj edilir. Hemoliz ya da aglütinasyon olmaması uygunluğu gösterir.

➤ Araç gereçler

- Spor
- Santrifüj
- Benmari
- Küçük boy tüpler
- Alıcının serumu
- % 2-5'lik vericinin eritrosit süspansiyonu
- Coombs serumu

➤ Teknik

- Her bir verici örneği için bir tüp alınır.
- Her bir tüpe 2 damla alıcı serumu konulur.
- % 2-5'lik serum fizyolojik ile süspanse edilmiş (her birine ait) verici eritrositi, 1 damla olacak şekilde kendilerine ait olan tüplere eklenir ve karıştırılır.
- Tüpler santrifüj edilir.
- Reaksiyon hemoliz ve aglütinasyon açısından değerlendirilip kaydedilir.

3.4. Crossmatch Testinde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

- Aşırı çalkalama sonucu büyük aglütinatlar yıkılabilir ya da zayıf aglütinatlar kaybolabilir, bu nedenle tüpü hafif çalkalamak yeterlidir.
- Şüpheli aglütinasyon durumlarında mikroskop altında değerlendirme yapılır.
- Serum/hücre (eritrosit) oranı aglütinasyon duyarlılığını büyük oranda etkileyeceğinden, aglütinasyonun kolaylıkla görülebilmesi için en zayıf hücre süspansiyonunun kullanılması tercih edilmelidir.
- Fibrine bağlı hatalı değerlendirmeleri önlemek için eritrositlerin yıkanması sonucu plazma uzaklaştırılmalıdır.

3.5. Mikrobiyolojik Tarama Testleri

Enfeksiyon hastalığı geçiren donörler, hastalık türüne ve iyileşme dönemine göre değerlendirilerek kan bağışına karar verilir. Bazı hastalıklarda ömür boyu kan bağışı yapılmaz.

Mikrobiyolojik tarama testleri, sağlıklı görünen enfekte bağışçılardan alıcıya enfeksiyon bulaşmasını engellemek amacıyla yapılır. Yeni geliştirilen tanı yöntemlerine rağmen bilinen bazı virüslerin transfüzyonla geçişi tam olarak engellenememiştir.

Kan transfüzyonuyla bazı mikroorganizmaların alıcılara geçmesini engellemek için donör kanı, bazı testlere tabi tutulur.

Rutinde yapılan mikrobiyolojik tarama testleri

- Hepatit B
- Hepatit C
- HIV
- VDRL
- Kan Kültürü

UYGULAMA FAALİYETİ

Crossmatch testini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Tüpe % 2-5'lik vericinin eritrosit süspansiyonundan 1 damla koyunuz.➤ Üzerine 2-3 damla alıcının serumundan ekleyiniz.➤ Oda ısısında 15 dakika inkübe ediniz.➤ 1000 devirde 15 saniye süreyle santrifüj ediniz.➤ Tüpün üst kısmında hemoliz olup olmadığına bakınız.➤ Tüpü çalkalayarak dipte aglütinasyon olup olmadığına bakınız.➤ Hemoliz ve aglütinasyon yok ise bir sonraki aşamaya geçiniz.➤ %22'lik bovin albuminden 2 damla tüpe ekleyiniz ve karıştırınız.➤ 37°C'de benmaride 30 dakika süreyle inkübe ediniz.➤ 1000 devirde 15 saniye santrifüj ediniz.➤ Yeniden tüpün üst kısmında hemoliz olup olmadığına bakınız.➤ Tüpü çalkalayarak dipte aglütinasyon olup olmadığına bakınız.➤ Yine hemoliz veya aglütinasyon yoksa tüpteki eritrositleri 3-4 kez yıkayınız.➤ Anti human Globulin 2-3 damla ekleyiniz.➤ 37°C'de 30 dakika benmaride inkübe ediniz.➤ Yeniden 1000 devirde 15 saniye santrifüj ediniz.➤ Tüpün üst kısmında hemoliz olup olmadığına ve tüpü çalkalayarak dipte aglütinasyon olup olmadığına bakınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Önerilen miktarlara uyunuz.➤ Verilen sürelerle uyunuz.➤ Hemoliz varlığı açısından üstte kalan sıvının kırmızımsı renkte olup olmadığını gözlemleyiniz.➤ Hemoliz veya aglütinasyon varsa crossmatchin uygun olmadığını belirtmeyi yoksa teste devam edileceğini unutmayınız.➤ Pozitif reaksiyon görülmediği takdirde testi yeniden yapınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi crossmatch testinin amaçlarından biri değildir?
 - A) Kan grubu belirlenip antikor tarama testi negatif bulunduğunda alıcı ve verici ABO uygunluğunun son kez doğrulanması
 - B) Etiketlenmede ve kayıtlarda verici veya alıcının kimlik bilgilerinde yapılacak hataların kontrolünün yapılması
 - C) Alıcının serumunda, vericinin eritrositlerine karşı reaksiyon gösterebilecek bir antikorun var olup olmadığının araştırılması (majör crossmatch)
 - D) Nadiren de olsa verilecek kanda, alıcının eritrositleriyle reaksiyona girebilecek irregüler antikorların aranması (minör crossmatch)
 - E) Crossmatch testi, bireyde eritrosit antijenlerine karşı antikor olup olmadığını tespit etmek içindir.
2. Aşağıdakilerden hangisi, majör crossmatch testini açıklayan formüldür?
 - A) Alıcı serumu + verici eritrositi + coombs erumu
 - B) Verici serumu + alıcı eritrositi + coombs serumu
 - C) Verici serumu + alıcı serumu + coombs serumu
 - D) Verici eritrositi + verici serumu + coombs serumu
 - E) Alıcı serumu + coombs serumu + anti-human globülin
3. Aşağıdakilerden hangisi crossmatch testinin özelliklerinden değildir?
 - A) Crossmatch testi, transfüzyon sırasında olabilecek bir antijen-antikor reaksiyonunun tüpte yapılan bir ön denemesidir ve uygunluk testlerinin son aşamasıdır.
 - B) ABO ve Rh (D) uygun, antikor tarama testi negatif ise crossmatch testi yapılmaya başlanır.
 - C) Majör crossmatch ve minör crossmatch olarak iki aşamalıdır.
 - D) Crossmatch test sonucunun negatif olması, alıcı ve verici kanı arasında bir uyumsuzluk olmadığını gösterir.
 - E) Crossmatch testi pozitif çıkarsa acil crossmatch testi çalışılır.
4. Aşağıdakilerden hangisi kan nakli için yapılan mikrobiyolojik tarama testi değildir?
 - A) Hepatit C
 - B) Hepatit B
 - C) Sedimantasyon
 - D) HİV
 - E) VDRL

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme”ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdaki yöntemlerin hangisinde kesinlikle EDTA'lı örnekler kullanılarak ABO ve Rh gruplaması yapılır?
A) Lam yöntemi
B) Mikroplate yöntemi
C) Tüp yöntemi
D) Tam otomatik sistemler
E) Jel santrifüjasyon yöntemi
2. ABO sistemine göre verilen kan grubu bilgilerinden hangisi doğrudur?
A) A kan grubunda, eritrosit yüzeyinde A antijenini, serumda anti-B antikorunu bulundurur.
B) B kan grubunda, eritrosit yüzeyinde B antijenini, serumda anti-A antikorunu bulunur.
C) AB kan grubunda, eritrosit yüzeyinde A ve B antijenini birlikte bulundurur, serumda ise antikor bulundurmaz.
D) O kan grubu, tam tersine eritrosit yüzeyinde antijen bulundurmaz, serumda ise anti -A ve anti -B antikorunu birlikte bulundurur.
E) Hepsi
3. Aşağıdaki hangi hastalıkların tanısında, direkt coombs testi yapılmaz?
A) Hemolitik anemilerdeki otoantikorların aranmasında
B) Yenidoğanın hemolitik hastalığında
C) Otoimmün hemolitik anemilerde
D) İlaçların yol açtığı hemolitik hastalıklarda
E) Kan transfüzyon reaksiyonlarının araştırılmasında
4. Aşağıdakilerden hangisi, Rh faktöründe en güçlü ve bağışıklığı en fazla sağlayan antijendir?
A) C antijeni
B) E antijeni
C) D antijeni
D) e antijeni
E) c antijeni
5. Kan grubu testleri yapılırken dikkat edilmesi gereken genel kurallardan yanlış olanı bulunuz?
A) Lam yöntemlerinde, lamaların üzerine önce antiserumlar damlatılır.
B) Karıştırıcı olarak cam baget kullanılır.
C) Testlerde cam tüp kullanılır.
D) Eritrosit süspansiyonları yıkanmış olarak kullanılır.

- E) Sonuçlar 2-3 dakikada dikkatli değerlendirilir.
6. Reverse (ters) grublama olarak ifade edilen ve eritrosit yüzeyinde taşınmayan antijenlere karşı serumdaki mevcut antikorların gösterilmesi amaçlanan testtir?
A) Serumda tp yöntemiyle kan grubu tayini
B) Eritrositte tp yöntemiyle kan grubu tayini
C) Lam (slyt) yöntemiyle Rh tayini
D) Tp yöntemiyle Rh tayini
E) Zayıf D testi
7. Aşağıdakilerden hangisi, doğal antikorun özelliklerinden değildir?
A) Eritrositlerin protein antijenlerine yöneliktir.
B) Sıcak antikorlardır.
C) İnkomplet yapıdadır.
D) Genellikle IgG yapıdadır.
E) Plasentadan geçmez.
8. Kan transfüzyonu sonrası karşılaşılabilecek sorunların zm için hem alıcı hem de verici rneği, kapalı tp içinde ve 1–6 C’de en az kaç gün saklanmalıdır.?
A) 3 gün
B) 5 gün
C) 7 gün
D) 10 gün
E) 12 gün

DEğERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ 1'İN CEVAP ANAHTARI

1	B
2	A
3	E
4	D

ÖĞRENME FAALİYETİ 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	B
3	C
4	C

ÖĞRENME FAALİYETİ 3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	E
2	A
3	E
4	C

MODÜL DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

1	D
2	E
3	A
4	C
5	B
6	A
7	E
8	C

KAYNAKÇA

- Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kursu XII, Antalya, 2009.
- Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi, Matsa Basımevi, 2009.
- ÖZGÜR Nilgün, Klinik Hematoloji XI. Sınıf, Türk Sağlık Eğitimi Vakfı, Ankara, 2001.
- TANYER Gülten, Hematoloji ve Laboratuvar, Ayyıldız Matbaası, Ankara, 1985.
- ACAR S. N. Kan Grup Antijenleri ve Antikorları: Klinik Gelişim, 2001.
- AÇIKGÖZ Sebahat, Klinik Hematoloji X.Sınıf, Türk Sağlık Eğitimi Vakfı, Ankara, 2001.
- BERK Önder, Atlaslı Kan Hastalıkları Tanı ve Tedavi İlkeleri, Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1.Baskı, Ankara, 1989.
- MÜFTÜOĞLU Ekrem, Klinik Hematoloji ve İmmünoloji, 2. Baskı, Diyarbakır, 1987.
- MÜFTÜOĞLU Ekrem, Klinik Hematoloji, Şahin Yayıncılık ve Dağıtım, 3. Baskı, Diyarbakır, 1995.