

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	1 / 11

1.AMAÇ : Doku Tipleme Laboratuvarımızda uluslararası kalite standartlarına ve etik kurallara uygun olarak, bilimsel veriler ışığında, güvenilir, kaliteli, verimli bir hizmet sunmaktır.

2.KAPSAM : Doku Tipleme Laboratuvarları ve işlemleri kapsar.

3.KISALTMALAR :

HBYS :Hastane Bilgi Yönetim Sistemi

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

DTL:Doku Tipleme Laboratuvarı

LCM :Lenfosit Cross Match

PBS : Phosphate Buffer Saline

DTT : Dithiothretiol

NEQAS : National External Quality Assesment Service

ACD : Acid Citrate Dextroz

4.TANIMLAR :

5.SORUMLULAR :

- Sorumlu Öğretim Üyesi
- Laboratuvar Teknikerleri
- Biyolog

6.FAALİYET AKIŞI :

6.1.CİHAZLARA İLİŞKİN TEMİZLİK,BAKIM,ONARIM VE KALİBRASYON SÜREÇLERİNİN TANIMLANMASI

- ❖ Laminair Flow Kabini her çalışma sonrası %10 luk çamaşır suyu ve sonrasında % 70 lik ethanol ile silinip temizlenir.
- ❖ Temizlik sonrası Laminair Flow Kabininin uv lambası açılır ve 1saat kadar açık bırakır.
- ❖ Ez 1 DNA izolasyon cihazı izolasyonlar tamamlandıktan sonra %10 luk çamaşır suyu ve sonrasında % 70 lik ethanol ile silinip temizlenir.
- ❖ Ez 1 DNA izolasyon cihazına yılda en az 1 defa yüklenici firma tarafından cihaz bakımı yapılır ve belgelenir.
- ❖ Kullanılan otomatik pipetler %10 luk çamaşır suyu ve sonrasında % 70 lik ethanol ile silinip temizlenir.
- ❖ Laboratuvarda kullanılan otomatik pipetlerin kalibrasyonları yüklenici firmaya yılda en az bir kez yaptırılır.
- ❖ Thermal Cycle cihazlarına yılda en az 1 defa yüklenici firma tarafından cihaz bakımı yapılır ve belgelenir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	2 / 11

- ❖ Luminex Flouro Analizör cihazı her analiz sonrası cihazın programının yönlendirme butonlarıyla % 70 lik isopropanol alkol ve distile su ile yıkamaları yapılır ve cihaz kapatılır.
- ❖ Luminex Flouro Analizör cihazına yılda en az 1 defa yüklenici firma tarafından cihaz bakımı yapılır ve belgelenir.
- ❖ Kit ve kan ürünlerinin muhafaza edildiği soğutucular saklama koşulları uygun sıcaklık aralarına uygunluğunun takibi için günde iki kez sıcaklıkları ölçülüp sıcaklık takip formuna kaydedilir.

6.2.KULLANILACAK KİT VE KALİBRATÖRLERİN HAZIRLIĞI VE KONTROLÜ

HLA doku tiplleme kitleri SSO ve SSP yöntemlerine göre ikiye ayrılır.SSP doku tiplleme kitleri -20 C de, SSO doku tiplleme kitleri +2 C - +8C de muhafaza edilir.Kullanılan kit miktarları çalışma tarihine bağlı olarak kit stok takip formuna kaydedilir.PRA ve DSA kitleri de +2 C - +8C de muhafaza edilir.Kullanılan kit miktarları çalışma tarihine bağlı olarak kit stok takip formuna kaydedilir.

6.3.TEST KALİBRASYONLARININ İÇ VE DIŞ KALİTEDEĞERLENDİRME ÇALIŞMALARI

DTL laboratuvarında yapılan testlere ait iç kalite kontrol değerlendimesi, kitlerin muhteviyatındaki negatif ve pozitif kontrol serumları ile yapılarak arşivlenir.Dış kalite kontrol değerlendirmeleri ise yüklenici firma organizasyonu ile uluslararası dış kalite kontrol laboratuvarlarına (NEQAS, Balkan EPT gibi) yaptırılır ve arşivlenir.

6.4.TESTLERİN ÇALIŞMA YÖNTEMLERİ,SÜRECİ VE SÜRELERİ

SEROLOJİK ÇALIŞMALAR :

Lenfosit cross match testleri çalışma süresi 4 saattir .Lenfosit cross-match çalışmasında donörün kandan veya dalaktan izole T-lenfosit hücreleri ve B-lenfosit hücreleri kullanılır.Alıcıdan da serum örneği kullanılır.

KANDAN T VE B LENFOSİT HÜCRE İZOLASYONU :

- ❖ Hastadan 8 ml ACD li tüpe veya EDTA'lı tüpe kan alınır
- ❖ 1500 rpm de 15 dk santrifüj edilir.
- ❖ 2/3 kan serumu atılır.(LCM de 2/3 lük serum boş bir polipropilen tüpe alınır)
- ❖ Daha sonra tüpten 2 mlt buffy-coat toplanarak boş polipropilen tüpe konur. (buffy-coat serumla eritrosit fazlarının arasındaki beyazımsı tabakadır)
- ❖ Boş tüpe alınan numunenin üzerine 5 mlt sitratlı PBS solüsyonu eklenir.(PBS, solüsyonların hazırlanışı kısmında açıklanacaktır).
- ❖ Üzerine 50 ul lenfobeat eklenir. T lefositleri için Class1, B lenfositleri için ise Class2 lenfobeati eklenir.(Lenfobeat hücrelerin tutunduğu sıvı şeklinde manyetik boncuktur) ve rotatorda 5 dk çevrilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	3 / 11

- ❖ Tüp, magnete konur ve 1,5 dk tutulup süre sonunda süpernatant dökülür.(Magnet, lenfosit hücrelerinin ayrışması için kullanılan mıknatıslı yapıya sahip olan bir alettir)
- ❖ Tüp, magnetten çıkartılıp üzerine 7-8 mlt PBS eklenir ve 1 dk magnette tutulup supernatant dökülür. Bu işlem ikikez tekrarlanır.
- ❖ Bu işlemler sonunda tüpün duvarında kahve telvesi görüntüsünde lenfobeat görünür.Bu lenfobeatte kendisine tutunmuş olan hücreler mevcuttur.
- ❖ Hücrelerin üzerine 100 ul %5 lik Fetal Calf Serum+RPMI eklenir ve pipetajlanır.
- ❖ Daha sonra bu hücre süspansiyonundan boş bir teresaki plağına 1 ul pipetlenip üzerine 5 ul boya (Acridineorange/ Ethidiumbromide (AO/EB)) eklenip floresan mikroskopta hücrelerin canlılığı ve yoğunluğuna bakılır.
- ❖ Bu işlemden sonra istediğimiz hücreleri izole etmiş oluruz.

DALAKTAN T VE B LENFOSİT HÜCRE İZOLASYONU :

- ❖ Mevcut dalaktan bistüri ile bir parça kesilip serum fizyolojik ile yıkanır.
- ❖ İçinde 20 cc RPMI olan petri kabına alınarak bistüri vasıtasıyla hücre sağımı yapılır.
- ❖ İşlem sonunda petri içindeki RPMI pasteur pipeti yardımıyla partikülleri almadan dikkatlice çekilerek 10 cc lik edta lı tüpe alınır ve renk değişimine bakılır.RPMI ın rengi sararırsa hücreler ölü demektir.
- ❖ Renk sararmamışsa RPMI boş bir polipropilen tüpe alınır.
- ❖ Boş tüpe alınan numunenin üzerine 5 mlt sitratlı PBS solüsyonu eklenir.(PBS, solüsyonların hazırlanışı kısmında açıklanacaktır).
- ❖ Üzerine 50 ul lenfobeat eklenir. T lefositleri için Class1, B lenfositleri için ise Class2 lenfobeati eklenir.
- (Lenfobeat hücrelerin tutunduğu sıvı şeklinde manyetik boncuktur) ve rotatorda 5 dk çevrilir.
- ❖ Tüp, magnete konur ve 1,5 dk tutulup süre sonunda süpernatant dökülür.(Magnet, lenfosit hücrelerinin ayrışması için kullanılan mıknatıslı yapıya sahip olan bir alettir)
- ❖ Tüp, magnetten çıkartılıp üzerine 7-8 mlt PBS eklenir ve 1 dk magnette tutulup supernatant dökülür. Bu işlem ikikez tekrarlanır.
- ❖ Bu işlemler sonunda tüpün duvarında kahve telvesi görüntüsünde lenfobeat görünür.Bu lenfobeatte kendisine tutunmuş olan hücreler mevcuttur.
- ❖ Hücrelerin üzerine 100 ul %5 lik Fetal Calf Serum+RPMI eklenir ve pipetajlanır
- ❖ Daha sonra bu hücre süspansiyonundan boş bir teresaki plağına 1 ul pipetlenip üzerine 5 ul

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	4 / 11

boya (Acridineorange/ Ethidiumbromide (AO/EB)) eklenip floresan mikroskopta hücrelerin canlılığı ve yoğunluğuna bakılır.

❖ Bu işlemden sonra istediğimiz hücreleri izole etmiş oluruz.

LENFOSİT CROSS- MATCH (LCM) ANALİZİ:

Kullanılan Materyaller:

*%2 lik FCS+RPMI1640 *Hasta serumu*Verici Plazması*Vericinin T ve B lenfosit hücreleri Vericinin T ve B lenfositleri izole edilir.

PLAK DÜZENİ:

a: T lenfosit kontrol ((1 ul %2 FCS+RPMI)+(vericinin T hücrelerinden 1 ul))
a: B lenfosit kontrol ((1 ul %2 FCS+RPMI)+(vericinin B hücrelerinden 1 ul))
a: T lenfosit otokontrol (1 ul vericinin plazması + vericinin T lenfositlerinden 1 ul)
a: B lenfosit otokontrol (1 ul vericinin plazması + vericinin B lenfositlerinden 1 ul)
a: T LCM (1 ul hasta serumu+ vericinin T lenfositlerinden 1 ul)
a: B LCM (1 ul hasta serumu+ vericinin B lenfositlerinden 1 ul)

1. Parafinlenmiş plaklara ekim yukardaki düzende olduğu gibi yapılır.
2. 20 dakika oda ısısında inkübe edilir.
3. Süre sonunda 5 ul kompleman ekilir 40 dakika inkübe edilir.
4. Süre sonunda 5 ul boya ekilir(AO/EB) 5-10 dakika inkübe edilip mikroskopta okunur.

DTT li LENFOSİT CROSS-MATCH (LCM) ANALİZİ:

Kullanılan Materyaller:

* DTT solüsyonu(16 mg DTT(D,L- Dithiothreitol) + 10 ml PBS (Ph 7.4 olacak))* Cystine solüsyonu (16 mg cystine + 10 ml PBS)* %20 lik FCS+ RPMI1640 (40 ul FCS+ 160 ul RPMI)* Hasta serumu* Verici Plazması* Vericinin T ve B lenosit hücreleri Vericinin T ve B lenfositleri izole edilir ve DTT solüsyonuyla diliüe edilir.

PLAK DÜZENİ:

a: T lenfosit kontrol ((1 ul %20 FCS+RPMI)+(vericinin T hücrelerinden 1 ul))
a: B lenfosit kontrol ((1 ul %20 FCS+RPMI)+(vericinin B hücrelerinden 1 ul))
a: T lenfosit otokontrol (1 ul vericinin plazması + vericinin T lenfositlerinden 1 ul)
a: B lenfosit otokontrol (1 ul vericinin plazması + vericinin B lenfositlerinden 1 ul)
a: T LCM (1 ul hasta serumu+ vericinin T lenfositlerinden 1 ul)
a: B LCM (1 ul hasta serumu+ vericinin B lenfositlerinden 1 ul)

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	5 / 11

1. Parafinlenmiş plaklara ekim yukardaki düzende olduğu gibi yapılır.
2. Hücre inkübasyonu 37 derecede 30 dakika inkübe edilir.
3. Süre sonunda 1 ul cystine solüsyonu ekilir oda ısısında 5 dakika inkübe edilir.
4. Süre sonunda 5 ul komplement ekilir oda ısısında 60 dakika inkübe edilir
5. Süre sonunda 5 ul boya ekilir(AO/EB) oda ısısında 5-10 dakika inkübe edilip mikroskopta okunur.

KULLANILAN SOLÜSYONLARIN HAZIRLANIŞI:

PBS Solüsyonu:

1 lt hazırlamak için 5 lt hazırlamak için

NaCl.....8 gr.....40gr

KCL.....0,2gr.....1gr

Na2HPO4.....0.92gr.....4.6gr

KH2PO4.....0.2 gr.....1gr

Bu maddeler 1 veya 5 litre distile su ile sulandırılır.

Not : 1 lt PBS solüsyonu içine 6 gr sodyum sitrat konularak sitratlı PBS solüsyonu hazırlanır.

Boya Solüsyonu (AO/EB) :

a)Stok Boya Solüsyonu (AO/EB) : 50mg Ethidium bromide + 15 mg Acridine orange karışımı 1 ml %95 lik etanolde çözülür ve üzerine 49 ml distile su eklenir.Daha sonra bu karışım 50 adet ependorf tüpüne 1 ml şeklinde bölünüp -20 C de saklanır.

b)Çalışma Boya Solüsyonu : 1 ml stok boya solüsyonu 9 ml PBS ile karıştırılarak solüsyon hazırlanır.Plaklar çalışma solüsyonu ile boyanır.

MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR:

Moleküler çalışmalar için gerekli materyal kandan izole edilen DNA dır.

KANDAN DNA İZOLASYONU:

EZ 1 otomatik DNA izolasyon cihazı vasıtasıyla DNA izolasyonu yapılır

HLA TİPLENDİRME PROTOKOLÜ (SSP)

HLA-ABDR(SSP) ANALİZİ:Testin çalışma süresi 3 saattir

- ❖ 2000 ul lik ependorf tüpüne 312 ul mastermiks konulur.(mastermiks hazır gelen bir kittir)
- ❖ Üzerine 505 ul dH2O ve 8,3 ul Taq Polimeraz enzimi eklenir ve vortekslenir.
- ❖ Bu karışımdan 96 numaralı kuyuya 10ul konulur.(HLA-ABDR kiti 96 adet kuyudan oluşmaktadır.Bunlardan 96 numaralı kuyu kontrol kuyusudur)
- ❖ Kalan karışıma 202 ul DNA konulur vortekslenip, diğer kuyulara 10 ar ul dağıtılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
		REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	6 / 11
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR		

- ❖ Daha sonra kuyular kendine özel seal(yapışkan bant)ile kapatılıp iyice sıkıştırılır.
- ❖ Sonra bu düzenek PCR cihazına konulup, uygun program seçilip, cihaz çalıştırılır.
- ❖ Daha sonra 2 gr agarose bir erlenmayere konulup,üzerine %5 lik TBE den 100 mlt eklenip, mikrodalga fırında pişirilerek özel kalıbına dökülür ve kalıbın 96 kuyu oluşturacak tarakları yuvalarına yerleştirilir.Jelin donması beklenir.
- ❖ Jel, jel elektroforezine yerleştirilip üzerine seviyesini geçecek şekilde %5 lik TBE eklenir.
- ❖ PCR cihazından çıkarılan 96 kuyulu PCR ürünü jele uygun sırada yüklenir ve güç kaynağıyla 140 wat,40 amper, 20 dk yürütülür.
- ❖ İşlemden sonra Jel tankından çıkarılarak transilminatöre konur ve lambası yakıldığında jelde görülen bant numaraları analiz kağıdına yazılır ve Jel görüntüleme cihazında fotoğrafı çekilerek kayıt altına alınır.
- ❖ Bu bant numaraları kitin kitapçığından veya run score programında değerlendirilerek hastanın HLA-ABDR moleküler sonucu ortaya çıkartılır.

HLA-DR(SSP) ANALİZİ: Testin çalışma süresi 3 saattir.

- ❖ 500 ul lik ependorf tüpüne 84 ul mastermiks konulur.(mastermiks hazır gelen bir kittir)
- ❖ Üzerine 132,8 ul dH2O ve 2.2 ul Taq Polimeraz enzimi eklenir ve vortekslenir.
- ❖ Bu karışımdan 24 numaralı kuyuya 10 ul konulur.(HLA-DR kiti 24 adet kuyudan oluşmaktadır.Bunlardan 24 numaralı kuyu kontrol kuyusudur)
- ❖ Kalan karışıma 54 ul DNA konulur vortekslenip, diğer kuyulara 10 ar ul dağıtılır.
- ❖ Daha sonra kuyular kendine özel kapakçıklarla kapatılıp iyice sıkıştırılır.
- ❖ Sonra bu düzenek PCR cihazına konulup, uygun program seçilip, cihaz çalıştırılır. (Cihazda bir defada 4 adet HLA-DR çalışması yapılabilir)
- ❖ Daha sonra 2 gr agarose bir erlenmayere konulup,üzerine %5 lik TBE den 100 mlt eklenip, mikrodalga fırında pişirilerek özel kalıbına dökülür ve kalıbın 96 kuyu oluşturacak tarakları yuvalarına yerleştirilir.Jelin donması beklenir.
- ❖ Jel, jel elektroforezine yerleştirilip üzerine seviyesini geçecek şekilde TBE eklenir.
- ❖ PCR cihazından çıkarılan PCR ürünleri jele uygun sırada yüklenir ve güç kaynağıyla 140 w,40 A, 20 dk yürütülür.
- ❖ İşlemden sonra jel tankından çıkarılarak transilminatöre konur ve lambası yakıldığında jelde görülen bant numaraları analiz kağıdına yazılır ve Jel görüntüleme cihazında fotoğrafı çekilerek kayıt altına alınır.
- ❖ Bu bant numaraları kitin kitapçığından veya run score programında değerlendirilerek hastanın HLA-DR moleküler sonucu ortaya çıkartılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
		REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	SAYFA NO	7 / 11

HLA-ABC(SSP) ANALİZİ: Testin çalışma süresi 3 saattir

- ❖ 2000 ul lik ependorf tüpüne 312 ul mastermiks konulur.(mastermiks hazır gelen bir kittir)
- ❖ Üzerine 505 ul dH2O ve 8,3 ul Taq Polimeraz enzimi eklenir ve vortekslenir.
- ❖ Bu karışımdan 96 numaralı kuyuya 10ul konulur.(HLA-ABDR kiti 96 adet kuyudan oluşmaktadır.Bunlardan 96 numaralı kuyu kontrol kuyusudur)
- ❖ Kalan karışıma 202 ul DNA konulur vortekslenip, diğer kuyulara 10 ar ul dağıtılır.
- ❖ Daha sonra kuyular kendine özel seal(yapışkan bant)ile kapatılıp iyice sıkıştırılır.
- ❖ Sonra bu düzenek PCR cihazına konulup, uygun program seçilip, cihaz çalıştırılır.
- ❖ Daha sonra 2 gr agarose bir erlenmayere konulup,üzerine %5 lik TBE den 100 mlt eklenip, mikrodalga fırında pişirilerek özel kalıbına dökülür ve kalıbın 96 kuyu oluşturacak tarakları yuvalarına yerleştirilir.Jelin donması beklenir.
- ❖ Jel, jel elektroforezine yerleştirilip üzerine seviyesini geçecek şekilde %5 lik TBE eklenir.
- ❖ PCR cihazından çıkarılan 96 kuyulu PCR ürünü jele uygun sırada yüklenir ve güç kaynağıyla 140 wat,40 amper, 20 dk yürütülür.
- ❖ İşlemden sonra Jel tankından çıkarılarak transilminatöre konur ve lambası yakıldığında jelde görülen bant numaraları analiz kağıdına yazılır ve Jel görüntüleme cihazında fotoğrafı çekilerek kayıt altına alınır.
- ❖ Bu bant numaraları kitin kitapçığından veya run score programında değerlendirilerek hastanın HLA-ABC moleküler sonucu ortaya çıkartılır.

SSP TESTLERİNDE KULLANILAN SOLÜSYONLARIN HAZIRLANIŞI:

TBE Solüsyonu: 100 ml TBE çözeltisi üzerine 1900 mlt dH2O eklenerek % 5 lik şekilde hazırlanır.

HLA TİPLENDİRME PROTOKOLÜ (SSO): Testin çalışma süresi 4 saattir

- ❖ Her örnek için yapılacak test sayısı kadar 0,2 ul lik PCR tüpü kullanılır.
- ❖ PCR tüplerinin dibine 4 ul DNA pipetlenir
- ❖ Daha sonra her bir tüp için 6ul master Mix + 10 ul dH2O+0,2 ul taq polymerase enzimi karışımı pipetlenir.
- ❖ Tüplerin kapakları kapatılarak thermal cyclere konur ve aşağıdaki programa göre çalıştırılır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	8 / 11

1 döngü	12 döngü	28 döngü	1 döngü	1 döngü
5 C de 3 dk	95C de 15 sn 60C de 30 sn 72C de 30 sn	95C de 10 sn 3C de 30 sn 2C de 30 sn	2C de 2 dk	4 C de 60 dk

- ❖ PCR işlemi sonunda 5 ul PCR ürünü alınarak costar plate ' pipetlenir
- ❖ Kit içinden Baed mix(Probe mix) ısı bloğunda 55 C de 7 dk ısıtılır.
- ❖ 15 sn Sonkatör cihazında sonike edildikten sonra 15 sn vortekslenir.
- ❖ 15 ul Baed mix(Probe mix) ilgili testin tüm kuyularına pipetlenir.
- ❖ Pipetleme sonunda platenin üzeri seal(yapışkan bant) ile kaplanır.
- ❖ Aşağıdaki programla hibridizasyon için thermal cyclere konur.

97 C de 2 dk	47 C de 10 dk	56 C de 8 dk	56 C de 60 dk
--------------	---------------	--------------	---------------

- ❖ Hibridizasyonun 3. aşamasının son 5 dakikasında her kuyu için 170ul Dilution solution + 0,85 ul Streptavidin karışımı hazırlanır.(Dilution soüsyonu laboratuvara teslim alındığında bir defaya mahsuz 45 C de 5 dk ısıtılır ve oda sıcaklığında saklanır)
- ❖ Hibridizasyonun son aşamasında plate üzerindeki seal kaldırılarak 170 ul streptavidin karışımı kuyulara pipetlenir.
- ❖ Luminex-Life-Match cihazında okunur.
- ❖ MATCH-IT DNA programında analiz edilir.

PRA KLAS I / II TARAMA VE TANIMLAMA TESTLERİ: Testin çalışma süresi 3 saattir

(Çalışmada millipore filtreli plate kullanılır)

- ❖ 300ul distile su, platenin kullanılacak boş kuyularına eklenerek kuyular ısıtılır.2-5 dakika sonra vakumlanır.
- ❖ Bu sırada tarama veya tanımlama kitlerine ait beadler 30 sn santrifüj edilir ve sonrasında vortexlenir.
- ❖ Her bir kuyuya sırasıyla aşağıdakiler eklenir.
 - - 40 ul Wash Buffer
 - -12,5 ul Serum Örneği
 - -5 ul HLA I / II Beads
- ❖ Platenin üzeri kapatılıp karanlıkta,oda ısısında 30 dk shaker de inkübe edilir.
- ❖ İnkübasyon sırasında, konjugat + wash buffer (her bir kuyu için 45 ul wash buffer + 5ul konjugat) hazırlanır ve 8. basamağa kadar karanlıkta saklanır.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
		REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	9 / 11

- ❖ Süre sonunda 100 ul wash buffer kuyulara girilir, karıştırılır ve vakumlanır.
- ❖ Kullanılan tüm kuyulara 250 ul yıkama solüsyonu eklenir ve vakumlanır.(bu işlem 3 kez tekrarlanır)
- ❖ Daha önceden hazırlanan konjugattan 50 ul kullanılan tüm kuyulara eklenir.
- ❖ Platenin üzeri kapatılıp karanlıkta, oda ısısında 30 dk shaker de inkübe edilir.
- ❖ Süre sonunda 150ul yıkama solüsyonu eklenir ve karıştırılır.
- ❖ Luminex-Life-Match cihazında okunur.
- ❖ MATCH-IT ANTİBODY programında analiz edilir.

DONÖR SPESİFİK ANTİKOR TESTİ(DSA): Testin çalışma süresi 3 saattir.

1.Hasta sayısına göre uygun bir eppendorf tüpüne yada 0,2 ml lik eppendorf tüpüne aşağıdaki tabloya göre bead- lizat süspansiyonu hazırlanır.Bu süspansiyonu hazırlarken hasta sayısına ilave olarak LCR için +1 testlik fazladan hazırlanır.1 test için süspansiyon oran 8 ul lizat + 5ul bead gereklidir.Bead eklenmeden önce 30 sn vortexlenir.

Kuyu Sayısı	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Bead Miktarı	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
Lizat Miktarı	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104	112	120	128

2. Lizat ve beadleri karanlıkta oda sıcaklığında (20-24°C) 30 dakika (30') inkübasyona bırakınız. Her 5-10 dakikada bir bead/lizat karışımını vorteksleyiniz yada inkübasyonu shaker üzerinde yapınız.

3.Inkübasyon sırasında LCR yi hazırlayınız.LCR yi 30 saniye vortexleyiniz.Dilue edilmiş LCR'yi hazırlamak için kullanılan her kuyu başına 5µl LCR'yi 45µl Specimen Diluent'e ekleyiniz. Kullanılana kadar oda ısısında karanlıkta tutunuz.

4.Filtreli plağın kuyularını hazırlayınız.Kuyuları 200 ul dH2O ile ıslatıp 2-5 daika bekletip vakumlayınız.

5.30 dakikalık inkübasyon sonrasında hasta sayısına göre gerekli miktardaki Wash Bufferı Bead / Lizat karışımına ekleyiniz.Karışımı 30 saniye vortexleyiniz.(Wash Buffer miktarını aşağıdaki tabloya göre hazırlayınız (Tablo +1 LCR göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur)

Kuyu Sayısı	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Eklenecek Wash	84	126	168	210	252	294	336	378	420	462	504	546	588	630	672

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
		REVİZYON NO	02
		REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	10 / 11

Buffer															
Miktarı															

6. Beat+Lizat+Wash buffer karışımını 55'er mikrolitre kuyulara paylaştırınız Filtireli plağın ilk kuyusunu

LCR için diğer kuyuları ise hastalar için ayarlayınız.Kuyulara 100 ul Wash Buffer ekleyip vakumlayınız.

7.İşlem sonunda kuyulara 250 ul Wash Buffer ekleyip vakumlayınız.Bu işlemi 3 defa tekrarlayınız.

8.Karanlıkta bekleyen Dilue edilmiş LCR yi uygun kuyuya (50µl) pipetleyiniz.

9.Hastalar için ayrılmış kuyulara 38 ul Specimen Diluent pipetleyiniz.Üzerlerine 12 ul hasta serumlarını pipetleyip plağın üzerini yapışkan bantla kaplayınız.Plağı shakere koyup 30 dakika karanlıkta inkübe ediniz.

10.İnkübasyon sırasında LCR kuyusu için konsantre SA-PE ile hastalara ait kuyular için konsantre cojugate, wash buffer ile dilüe edilir ve karanlıkta saklanır.SA-PE ve Conjugate hazırlama oranı aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Kuyu Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
SA-PE Conjugate	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
Wash Buffer	45	90	135	180	225	270	315	360	405	450	495	540	585	630	675

11.30 dakikalık inkübasyon sonrasında dikkatli bir şekilde yapışkanlı plastik kaplayıcıyı plaktan çıkartınız. Her kuyuya 100µl Wash Buffer ekleyiniz ,karıştırınız ve plağı aspire ediniz.

12. İşlem sonunda kuyulara 250 ul Wash Buffer ekleyip vakumlayınız.Bu işlemi 3 defa tekrarlayınız.

13. Daha önceden hazırlanmış dilue edilmiş SA-PE yi LCR içeren kuyulara 50µl ekleyiniz.

14. Daha önceden hazırlanmış dilue edilmiş Conjugate i hasta serumlarını içeren kuyulara 50µl ekleyiniz.

15. Plağın üzerini yapışkan bantla kaplayınız.Plağı shakere koyup 30 dakika karanlıkta inkübe ediniz.

16.30 dakikalık inkübasyon sonrasında dikkatli bir şekilde yapışkanlı plastik kaplayıcıyı plaktan çıkartınız. Her kuyuya 150µl Wash Buffer ekleyip karıştırınız.

17. Luminex-Life-Match cihazında okunur.

18. Match-it antibody programında analiz edilir.

	T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ	DOKÜMAN KODU	DL.PR.04
		YAYIN TARİHİ	01.01.2016
	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TESTLERİN ÇALIŞMA SÜRECİNE YÖNELİK PROSEDÜR	REVİZYON NO	02
		REVİZYON TARİHİ	01.01.2024
		SAYFA NO	11 / 11

6.5.SONUÇLARIN YORUMLANMASI , ONAYLANMASI VE RAPORLANMASI

Analiz sonuçları laboratuvar sorumlusu veya ilgili öğretim üyesi ile birlikte laboratuvar analiz sorumlusu ile birlikte yorumlanır ve HBYS den onaylanır.

Hastalara ve donörlere ait raporlar her bir analiz için ayrı ayrı olarak raporlandırılır.Analiz sonuçları HBYS ne girilmez.Word programında yazılır ve elektronik ortamda arşivlenir.Raporlar sekreterlikten hastaların kendisine yada irinci derece yakınlarına verilir.

7.İLGİLİ DÖKÜMANALAR:

- DL.FR.23 Doku Tipleme Sıcaklık Takip Formu