



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	1/26



T.C. KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
DOKU TİPLEME LABORATUVARI
TEST REHBERİ

2022

Doç. Dr. Filiz ALKAN BAYLAN
Doku Tipleme Laboratuvarı
Sorumlusu Yardımcısı



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	2/26

İÇİNDEKİLER

1.	Doku Tipleme Laboratuvarı Tanımı	3
2.	Doku Tipleme laboratuvarı İstem Formunda Yer Alan Testler	4
2.1	Moleküler Doku Tipleme Testleri	4
2.2	Panel Reaktif Antikor Testleri	4
2.3	Lenfosit Cross-Match Testleri	5
3.	Test İstemi	5
4.	Numunelerin Alınması, Laboratuvara Transferi ve Kabulü	6
4.1	Numune Alınması	6
4.1.1	Doku Tipleme Laboratuvarı İçin Örnek Alım Tüpleri	9
4.1.2	Numune kabul ve red kriterleri	10
4.2	Numunelerin Laboratuvara Transferi	10
4.3	Numunelerin Laboratuvara Kabulü	11
4.4	Numunelerin Çalışılma Zamanı	11
5.	Analiz	12
6.	Sonuçların Onaylanması ve Raporlama	13
7.	Laboratuvar Testleri Sonuç Verme Süreleri	13
8.	Analiz Sonucunu Etkileyen Faktörler	13
9.	Referans Aralığı	13
10.	Kalite Kontrol	14
11.	Doku Tipleme Laboratuvarında Çalışılan Test Protokolleri	14
11.1	Kandan DNA İzolasyonu	14
11.2	Moleküler Doku Tipleme Testleri	15
11.2.1	HLA-ABDR SSP Yöntemi	15
11.2.2	HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ SSO Yöntemi	15
11.2.3	HLA-B27 SSP Yöntemi	17
11.2.4	HLA-B51 SSP Yöntemi	17
11.3	Panel Reaktif Antikor Tarama Testi (Fluoroanalyzer Yöntemi)	17
11.4	Panel Reaktif Antikor Tanımlama Testi (Fluoroanalyzer Yöntemi)	18
11.5	CDC-LCM Testi	19
11.6	DTT'li Mikrolenfositotoksosite Tekniği	22
11.7	FC-LCM Testi	22
12.	Ekler	24
12.1	Doku Tipleme Laboratuvarı Tetkik İstem Formu	24
12.2	Düzenleyici Önleyici Faaliyet Raporu	25
12.3	Personel Yaralanmaları Takip Formu	26



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	3/26

1. Doku Tipleme Laboratuvarı Tanımı

Hastanelerin en önemli birimlerinden olan laboratuvarlar hastaların teşhis, tedavi ve takiplerinin yapılmasında çok büyük öneme sahip birimlerdir.

Doku tipleme laboratuvarları solid ve kök hücre nakillerinin gerçekleşmesinde hizmet veren; test sonuçlarının doğru, güvenilir ve zamanında verilmesinde 7/24 hizmet vermekle yükümlü laboratuvarlardır.

Hastanemiz Doku Tipleme Laboratuvarında, solid organ ve kök hücre nakli testlerinin (İnsan Doku Antijenleri (HLA; Human leukocyte Antigen) ile doku tipi uyumu, panel reaktif antikor tarama ve tanımlama, donore spesifik antikorların belirlenmesi amacıyla lenfosit çapraz uyum testleri) yanı sıra, HLA ile ilişkili diğer hastalıklar için de (Behçet, Ankilozon Spondilit, Romatoid Artrit, Diyabet) doku tipi incelemesi yapılmaktadır.

Misyonumuz: Ulusal ve uluslararası kalite standartlarına ve belirlenen yönerge ve etik kurallara uygun olarak işleyen, sonuçları doğru, güvenilir ve uluslararası standartlarda geçerliliği olan laboratuvar hizmeti sunmaktır.

Vizyonumuz: Güvenilir ve kaliteli laboratuvar hizmeti veren, solid organ ve kök hücre nakillerinin başarısına katkı sağlamayı amaçlayan ve bu amaçlar doğrultusunda bilimsel, yenilikçi, tercih edilen ve kabul görmüş bir laboratuvar olmaktır.

Laboratuvarımızda;

Laboratuvar Sorumlusu	----
Laboratuvar Sorumlu Yardımcısı	Doç.Dr. Filiz ALKAN BAYLAN 3338
Tetkik ve Analiz Sorumlusu	Öğr. Gör. Bekir Mehmet KELLEÇİ 3562
Biyolog	Sefa AVDAĞI 3562
Laboratuvar Teknisyeni	Mehmet Serdar URAL 3562
Memur	Murat KAPTANOĞLU 3561

görev yapmaktadır. Bu hazırlanan test rehberi ise, laboratuvar işleyişini başta klinisyenler olmak üzere diğer hastane çalışanlarıyla paylaşmak, laboratuvar işleyişi konusunda bilgilendirmek ve olabilecek aksaklıkları gidermek amacıyla hazırlanmıştır. Rehberde her testin adıyla birlikte çalışılan örnek türü, örneğin alındığı tüp, çalışılan metot, referans değerler, çalışma günleri ve testlerin çalışılma süreleri belirtilmiştir. Test bilgileri güncellendiğinde, değişiklikler ilgili birimlere bildirilecektir. Daha güvenilir sonuçlar ve kaliteli hizmet verebilmemiz için, test istemleri yapılırken hastayla ilgili bilgilerin, istem yapan doktorun isminin, gönderen birimin, ön tanı kısmındaki bilgilerin eksiksiz doldurulması önemlidir.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	4/26

Bu test rehberinde Doku Tipleme Laboratuvarına ait tetkik istem formunda yer alan testler ve bu testlerle ilgili ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir.

2. Doku Tipleme Laboratuvarı İstem Formunda Yer Alan Testler;

Bir insandan diğerine organ aktarılması halinde aktarılan organın alıcıda reddedilmeden kalması için alıcı ve vericinin majör uyumluluk antijenlerinin birbirine uyması ile immün tolerans sağlanabilir.

Klasik olarak uygun donör seçimi ve transplantın prognozunu tayininde yardımcı olacak immünolojik değerlendirmeler üçe ayrılır:

- 1) Antijen tayini ve uyum (HLA Tiplemesi)
- 2) Serumda antikor arama
- 3) Cross-match

2.1. Moleküler Doku Tipleme Testleri

Bir kişinin doku tipini oluşturan HLA (Human Leukocyte Antigen) gen bölgesi, insanda 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yer almakta olup, 3.6 megabazlık bu bölgede 224 gen lokusu saptanmış, bunların 128 tanesinin eksprese olduğu ve 51 tanesinin de doğrudan immün olaylarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu bölgedeki klasik Class I (HLA-A, -B, -C) ve Class II (HLA-DP, -DQ, -DR) HLA genleri peptit transportu ve antijen prezantasyonu konusundaki fonksiyonları ve gösterdikleri yüksek polimorfizm nedeni ile hakkında en çok bilgi sahibi olduğumuz gen lokuslarıdır.

DNA temelli HLA tayinleri diğer metotlara göre daha doğru ve hassastır. Merkezimizde HLA tayini için, sekansa spesifik primer (SSP), sekansa spesifik oligomer (SSO) ve real time PCR tiplendirme metodu kullanılarak yapılan testler aşağıda listelenmiştir.

HLA-A,B,DR Genotip Analizi (PCR-SSP, PCR-SSO düşük çözünürlük)

HLA-C Genotip Analizi (PCR-SSO, düşük çözünürlük)

HLA-DQ Genotip Analizi (PCR-SSO, düşük çözünürlük)

HLA-B27 Genotip Analizi (Real-Time PCR)

HLA-B51 Genotip Analizi (Real-Time PCR)

2.2. Panel Reaktif Antikor Testleri

Serumda antikor taraması ya da humoral sensitizasyon taraması da diyebileceğimiz panel reaktif antikor testleri ile hastada vericisine karşı daha önceden oluşmuş anti-HLA sitotoksik antikorların varlığı araştırılır. Böbrek nakillerinde graft sağ kalımını etkileyen en önemli faktörlerden biri olan bu antikorlar, red olmuş nakiller, gebelik ve kan transfüzyonları nedeniyle oluşabilmektedir. Anti-HLA antikorları diye de adlandırılan bu



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	5/26

antikorlar, böbrek naklinin hemen ardından çok hızlı bağışıklık sistemi reaksiyonlarına yol açıp hasta yaşamını tehdit edebilir. Bu durumu engellemek amacıyla böbrek nakilleri öncesi hasta serumunda doku grubu antijenlerine karşı antikorlar aranır. Panel reaktif antikorların oluşup oluşmadığı, eğer oluşmuşsa hangi antijenlere karşı olduğu tespit edilir. Panel reaktif antikor testinin sonucunun negatif olması nakil için uygun olduğunun göstergelerinden birisidir. Merkezimizde PRA tarama ve tanımlama testleri için fluoroanaliz yöntemi kullanılmakta olup, yapılan testler aşağıda listelenmiştir.

Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-I tarama

Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-II tarama

Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-I tanımlama

Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-II tanımlama

2.3. Lenfosit Cross-Match Testleri

Cross-match testleri ile alıcının serumunda vericinin lenfositlerine karşı HLA antikorlarının varlığı araştırılmaktadır. Antikor mevcut ise, bu durum alıcının immün sistemini verici antijenlerine karşı duyarlandırır ve greft etkin bir şekilde red edilir. Doku tiplleme laboratuvarlarında, cross-match testleri olarak, kompleman bağımlı mikrolenfositotoksiste ve akım sitometrik cross-match testleri kullanılmaktadır. Laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz cross-match testleri aşağıda listelenmiştir.

Lenfosit Cross-Match (T ve B hücre)

Lenfosit Cross-Match (T ve B hücre, DTT'li)

Lenfosit Cross-Match (Akım Sitometri Yöntemi ile)

3. Test İstemi

Hastanemiz bölümlerine ait polikliniklerden ve hizmet alımı anlaşması yapılmış hastanelerden ilgili poliklinik doktoru tarafından, hastane otomasyon sisteminde yer alan istem modülü kullanılarak, tetkik adı veya tetkik kodu ile istem yapılır. İstem modülünün giriş sayfası açılarak testin kodu işaretlenerek girişi yapılır. Test girişi tamamlandıktan sonra hastalar kan alma birimine yönlendirilir.

HLA doku antijenleri testleri için T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Organ ve Doku Bilgi Sisteminde hasta için kayıt açılmış olmalıdır.

4. Numunelerin Alınması, Laboratuvara Transferi ve Kabulü

İstemi yapılan testlerin laboratuvar bilgi sistemine (MIA) kaydı yapıldıktan sonra, kan örnekleri alınır. Kan örneği için testlere göre uygun örnek tüpü seçimi yapılır.

- **Moleküler doku tiplleme testleri için bir adet 2 ml EDTA'lı tam kan,**



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	6/26

- Panel reaktif antikor testleri için bir adet 5 ml jelli tüp kan,
- Her bir lenfosit cross-match testi için ayrı olmak üzere alıcıdan bir adet 5 ml jelli tüpe ve bir adet 2 ml EDTA'lı tüpe; donörden ise üç adet 2 ml EDTA'lı tüpe kan alınmalıdır.

Seçilen tüplere hasta bilgilerini içeren barkot etiketleri yapıştırılır ve kan alma işlemi gerçekleştirilir. Kan alma işlemi tamamlanan hastalar test hakkında bilgilendirilmek için doku tipleme laboratuvarına yönlendirilebilir. İlgili personel kan alma biriminde toplanan örnekleri Doku Tipleme Laboratuvarı Örnek Kabul Birimine getirir. Servislerde ise hastaların örnekleri kendi birimlerinde alınır. Damar yolu açık hastalarda kan alma için hastanın diğer kolu kullanılmalıdır. Kan alma işlemi hemşireler tarafından gerçekleştirilir. Numune alma ve transfer talimatı aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

4.1. Numune Alınması

Numunenin doğru teknikle, yeterli miktarda alınarak güvenli bir şekilde laboratuvara ulaşmasını sağlamak amacıyla aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir.

- Hasta bilgilerini içeren barkod numune alınacak tüplerin üzerine dik olarak yapıştırılır.
- Eller yıkanır ve her numune alımından önce eldiven giyilir.
- Kayıt masasında belgeleri kontrol edilen hasta kan alma koltuğuna oturur.
- Hastanın test kağıdı incelenip, testler için gerekli olan koşullar sorgulanır,
- Kan alma tüplerine şu sırayla kan almaya özen gösteriniz. Önce katkı maddesiz kırmızı yada sarı kapaklı düz tüplere sonra sitrat içeren mavi kapaklı koagülasyon tüplerine sonra sıra ile kırmızı yada sarı kapaklı jelli düz tüpler, yeşil kapaklı heparinli tüpler, mor kapaklı, EDTA içeren, hemogram tüpleri ve gri kapaklı okzalit-fluoridli tüplere kan alınmalıdır.
- Kan alınacak kol sağlam yere dayandırılır.
- Hastanın kolundaki damarlar incelenip, uygun damar bulunur,
- Vene girilmeden önce nabız alınmalıdır. Nabız varsa ven değil arter olduğu düşünülmelidir
- Dirsek bükümünün biraz üzerine turnike takılır.
- Venin yeterli derecede şiştiğinden emin olunur, bölgeye daha fazla kan sağlamak için hastanın yumruğunu birkaç kez açıp kapaması sağlanır.
- %70'lik alkollü pamuk ile kan alınacak saha silinir ve kuruması beklenir.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	7/26

- İğne ile 15°'lik açı yapacak şekilde cilt altına girilir. Biraz deri altında ilerledikten sonra damara girilir.
- Enjeksiyon pistonu yavaş yavaş çekilerek kanın enjektöre dolması beklenir.
- Turnike açılır ve enjektör iğnesi damardan çıkarılır.
- Kuru pamuk ile kapatılarak bir iki dakika baskı uygulanır.
- Kanamanın olmadığı durumlarda kateterin çekildiği bölgeye kontaminasyondan korunmak için airstrip yapıştırılır.
- Enjektörün ucundaki iğne çıkartılır, kan tüpün kenarından sızacak şekilde dikkatlice tüpün içine boşaltılır.
- Hastadan alınan kan test istem formu ile birlikte laboratuvara teslim edilir.
- Kan alma için kullandığınız iğne uçları ve enjektör uçlarını da sarı renkli tıbbi atık kovasına atınız.
- Personel yaralanmalarında Personel Yaralanmaları Takip Formu doldurulur.
- Sıvı veya kan almada vermede kullanılan bir damar ve setten örnek alınmamalıdır. Mecbur kalınırsa infüzyona 10-20 dakika ara verildikten sonra numune alınabilir. Bu durumlarda diğer kol tercih nedeni olmalıdır.
- Alınan numuneler kan ise aynı gün çalışılmıyorsa +4 °C derecede buzdolabında 1 gece bekletilebilir. Daha uzun süreler kalacaksa serumları ayrılarak -20 °C derecede dondurulup saklanır. Çalışılacağı zaman çözündürülür.

Kan aldıktan sonra;

- Antikoagülanlı tüplere kan aldıysanız tüpleri nazik bir şekilde en az 5-6 defa alt üst etmeyi unutmayın
- Tüm tüpleri hastanın ismi veya kimlik numarası, kan alınan saat ve tarih ve kan alan kişinin baş harflerinin yazılı olduğu barkotla etiketleyip, test istem formundaki doldurulması gereken bilgileri kontrol edin.
- Serumları ayırmadan önce kırmızı ya da sarı kapaklı tüpleri tercihen dik pozisyonda 10-20 dakika süreyle (45 dakikayı geçmemeli) pıhtılaşmaya bırakın.
- Tüpler sallanmamalıdır. Kuvvetli bir karıştırma köpürmeye ya da hemolize neden olur. Serum tüpleri yetersiz veya gecikmiş karıştırılma, geciken pıhtılaşmaya neden olur. Antikoagulant tüplerdeki, yetersiz karıştırma işlemi trombositlerin birikimine neden olur ve pıhtılaşmaya ya da yanlış test sonuçlarına sebep olur.

Kan örneği alınamazsa;



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	8/26

- İğnenin pozisyonunu değiştirin, iğne venin çok uzağından giriş yaptıysa iğne geri çekilmeli,
- İğne venin çok uzağında değilse vene doğru ilerletilmelidir. İğne yarım tur döndürülebilir.
- Başka bir tüp deneyin, tüpün vakumu kalmamış olabilir.
- Turnikeyi gevşetin. Çok sıkı uygulanmış böylece kan akımını durdurmuş olabilirsiniz.
- Vene sondaj yapmak (iğneyi dik sokmak) hastada ağrıya yol açtığı için bu hareketten kaçının. Çoğu zaman ilk girilen bölgenin altında bir yere girilmesi önerilir.
- Hiç bir zaman iki defadan fazla giriş yapmayın

Kan Vermeden Önce Hastanın Uyması zorunlu Olduğu Kurallar

- Kan vermeden önce yarım saat kadar dinlenmelidir.
- Düzenli kullanılan ilaçlar var ise kesilmeden önce doktora danışılması, kan verme sırasında istem formuna not düşülmesi için görevliye bilgi verilmelidir.

Kan Örnekleri Verilmeden Önce Dikkat Edilmesi Gereken Kurallar

Doku tiplleme laboratuvarında yapılan testlerin hiç biri **ön hazırlık gerektiren testler değildir.** Ancak kan vermeden önce dikkat edilmesi gereken bazı konular vardır. Kronik böbrek yetmezliği hastalarının PRA kontrollerinde ve Lenfosit çapraz uyum testlerini yaptırmadan önce aşı olmaları, diyalize girme zamanları (aynı gün kan verilmemesi önerilir), hastaların geçirdikleri enfeksiyon hastalıkları, varsa daha önceki nakil bilgileri, kan transfüzyonları ve bayan hastaların geçirdiği gebeliklerin bilinmesi bu testlerin sonuçlarının analizinde önemlidir.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	9/26

4.1.1. Doku Tipleme Laboratuvarı İçin Örnek Alım Tüpleri

Tüpler	İçerik	Etkisi	Kullanıldığı Testler
	EDTA	Ca'u bağlayarak pıhtılaşmayı engellemek	HLA A,B,C,DR, HLA B27 HLA B51 CDC Cross Match Flow Cross Match
	Pıhtı aktivatör ve jel separatör	Pıhtı oluşumunu hızlandırmak	PRA HLA Class I Tarama PRA HLA Class II Tarama PRA HLA Class I Spesifik Ag Tanımlama PRA HLA Class II Spesifik Ag Tanımlama CDC Cross Match (Serolojik) Flow Cross Match

4.1.2 Numune Kabul ve Red Kriterleri

- a- Numunelerin test girişi ve numune kabulünün yanlış yapılması
- b- Numune üzerine yanlış barkod yapıştırılması
- c- Okunmayan barkodlu örnekler
- d- Yanlış örnek tüpüne alınmış örnekler
- e- Yetersiz miktarda alınmış örnekler
- f- Hasta bilgilerinin tam olmaması
- g- Vakumlu tüplerde son kullanma tarihine dikkat!!!.
- h- Son kullanma tarihi geçmiş tüplerle gönderilen örnekler.
- ı- Hemolizli kan örnekleri
- j- Pıhtılı örnekler

Moleküler doku tiplleme testleri için gelen tüplerin üzerinde barkodun yanı sıra mutlaka hastaya ait ad ve soyad yazılması, eğer kan örneği donöre ait ise donörün adı, soyadı ve hasta yakınlık derecesi mutlaka belirtilmelidir.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	10/26

4.2. Numunelerin Laboratuvara Transferi

Alınan tüm kanlar kan alma biriminde ve oda sıcaklığında biriktirilir. Bu odanın oda sıcaklığının 25 °C olup olmadığı düzenli aralıklar ile kontrol edilir.

Görevli personel gün içerisinde saat 10.00, 14.00 ve 16.00 olmak üzere üç defa “ Kan Alma Talimatı”na göre alınmış örnekleri örnek taşıma kabında laboratuvarımıza imza karşılığında teslim etmektedir.

Bu transfer esnasında personele ve çevreye bulaşı önlemek için taşıma işlemi azami dikkat göstererek yapılır.

Transfer işlemi esnasında personel koruyucu eldiven giymelidir.

Numune kapaklarının sıkıca kapandığından emin olmalıdır.

Numune kapları taşıma kabına devrilmelerini önleyecek şekilde dikey olarak yerleştirilmelidir.

Taşıma kabı seri bir şekilde doğrudan laboratuvara ulaştırılır.

Transfer esnasında sert ve ani hareketlerden kaçınılmalı, numunelerin çalkalanmamasına dikkat edilmelidir

Taşıma kaplarının temizliğine dikkat edilmelidir. Her akşam mesai bitiminde önce deterjanlı su, ardından %1 lik çamaşır suyu ile temizlenir. Eğer kap içine biyolojik materyal bulaşmışsa üzerine %10 luk çamaşır suyu ile ıslatılmış gazlı bez, kağıt havlu vb.ile kapatılıp 15 dk bekledikten sonra temizlenir.

İlgili çalışanlara örnek alımı ve transferi konusunda eğitim verilmiş olmalıdır.

Ayrıca kadavra donör için doku tipleme ve organ nakli adaylarına Lenfosit Crossmatch testleri çalışılmaktadır. Kadavradan organ nakillerinde numuneler bekletilmeden laboratuvara teslim edilmelidir.

4.3. Numunelerin Laboratuvara Kabulü

Örnekler ve test istem formları laboratuvara gelince görevli personel tarafından imza karşılığında teslim alınır. Laboratuvar bilgi sisteminden yapılan test isteklerine bakılarak örnek tüpünün uygunluğunu, örnek miktarı, pıhtılaşma, örnek tüpünün üzerindeki barkotta hasta bilgilerinin doğruluğu vb. kontrolü yapılır. Uygun örneklerin laboratuvara kabul işlemi yapılarak kabul zamanı kayıt altına alınır.

Örnekler test rehberinde belirtilen kabul ve ret kriterlerine göre kabul edilir.

Laboratuvar tarafından reddedilen örnekler aylık olarak analiz edilmeleri için kayıt altına alınır. Bu örnekler için gerekli düzenleyici önleyici faaliyet başlatılır.

4.4. Numunelerin Çalışılma Zamanı



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	11/26

PRA tarama ve tanımlama testleri için çalışılacak kan örnekleri hafta içi her gün mesai saatleri (8:00-16:30) içinde kabul edilir. PRA için jelli tüpte gönderilen kan örneklerinden serum ayrılarak çalışma yapılır. PRA testleri acil durumlar dışında biriktirilerek çalışılır. Hemen çalışılmayacaksa serumlar -20 °C ‘de saklanır.

Cross-match testleri randevu sistemi ile sabah 8:00-9:00 saatleri arasında kanların alınması ve laboratuara kabul işlemlerinin ardından çalışılır. Cross-Match testleri için test taze kan örnekleri ile aynı gün çalışılır ve aynı gün sonuçlandırılır. Cross-Match testinde hastadan 1 adet biyokimya tüpüne 10 ml, donörden 3 adet EDTA’lı tüpe 2’şer ml ve bir adet biyokimya tüpüne 10 ml kan alınmalıdır.

HLA Moleküler Doku tiplleme testleri için çalışılacak kan örnekleri hafta içi her gün mesai saatleri (8:00-16:30) içinde kabul edilir. Doku tiplleme testleri için EDTA’lı tüpte laboratuara gelen kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hemen çalışılabilir ya da hemen çalışılmayacaksa 1-2 gün +4 °C’de, daha uzun süre bekletilecekse -20 °C’de muhafaza edilir.

Test Adı	Örnek türü		Tüp	Yöntem	Örnek	Sonuç Verme Süresi	Numuneleri Çalışma Süresi
	Hasta	Donör					
Moleküler Doku Tiplleme Testleri	Tam Kan	Tam Kan	EDTA’lı Tüp	Moleküler	2-8°C’de saklanabilir.	15 gün içinde	3-7 iş günü
Panel Reaktif Antikor Testleri	Serum	-	Jelli Tüp	Serolojik	-20°C’de saklanabilir.	30 gün içinde	3-7 iş günü
Lenfosit Cross-Match Testleri	Serum		Jelli Tüp	Serolojik	Kan numuneleri en kısa sürede laboratuvara gönderilmelidir!	1 gün içinde	1 iş günü
	Tam Kan	Tam Kan	EDTA’lı Tüp				

5. Analiz

Moleküler Doku Tiplleme Testleri için EDTA’lı tüpte gelen örneklerden öncelikle genomik DNA izole edilir. Her testin kendi protokolüne göre PCR işlemleri yapılır. Diğer



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	12/26

işlemler tamamlandıktan sonra her test değerlendirmeye alınarak sonuçlandırılır. Moleküler testlerde kitte bulunan kontroller dikkate alınır.

Panel Reaktif Antikor Testleri için gelen kan örneklerinin serumları ayrıldıktan sonra her test için uygun kit kullanılarak flow cytometry (akım sitometri) cihazında çalışma gerçekleştirilir ve sonuçlar değerlendirilir.

Lenfosit Cross-Match testleri için EDTA'lı ve biyokimya tüplerinde gelen örneklerden aynı gün çalışma yapılır.

Ayrıca serolojik testlerde negatif ve pozitif olmak üzere en az iki kontrol örneği çalışılır. Kadavradan organ transplantasyonlarında kadavradan alınan numunelerin çalışıldığı alan rutin çalışmalarda kullanılan alanlardan ayrı bir yerde olmalıdır. Kadavra çalışmalarında çift eldiven, farklı bir önlük kullanılmalıdır. Gerek görülürse maske takılmalıdır. Çalışılan alanın temizliği %10'luk çamaşır suyu ile sağlanmalıdır. Kullanılan malzemeler, kan ve doku örnekleri tıbbi atık poşetine konup ağzı kapatılmalıdır. Bu poşet tıbbi atık kabına atılmalıdır.

6. Sonuç Onaylanması ve Raporlama

Laboratuvar sorumlu / sorumlu yardımcısı tarafından analiz süreci tamamlanmış test sonuçları kontrol edilip değerlendirildikten sonra onaylanır. Sonuç raporu laboratuvar sorumlusu/laboratuvar sorumlu yardımcısı ve tetkik-analiz sorumlusu tarafından imzalanarak doktoruna iletilir. Sonuç ile beraber değerlendirilmesi gereken görüşler açıklama kısmına eklenir.

Onayı tamamlanmış moleküler doku tiplleme testlerinden HLA-A,B,DR sonuçları doktor veya ilgili hastaya ya da hastanın birinci dereceden yakınına imza karşılığında zarf içerisinde verilmekte olup ayrıca Sağlık Bakanlığı sitesine bu sonuçlar girilmektedir (<https://tods.saglik.gov.tr/Login.aspx>). Diğer moleküler doku tiplleme test sonuçları değerlendirildikten sonra doktor ya da doktorun görevlendirdiği personele yine imza karşılığında zarf içerisinde teslim edilmektedir. Lenfosit cross-match ve PRA testlerinin sonuçları zarf içerisinde ilgili doktor veya hemşireye teslim edilmektedir. Bu testler dışındaki diğer bütün test sonuçları LİS'e girilir ve onaylanır.

7. Laboratuvar testlerinin sonuç verme süreleri

- Moleküler doku tiplleme sonuçları **en geç 15 gün** içinde verilmektedir.
- PRA Class I ve Class II tarama ve tanımlama sonuçları **en geç 30 gün** içinde verilmektedir.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	13/26

- Cross-Match testleri laboratuvarından randevu alınarak **aynı gün** çalışılmakta ve gün içerisinde verilmektedir.

8. Analiz sonucunu etkileyen faktörler

Numunenin uygun olmayan şartlarda alınması ve gönderilmesi, hemolizli kan örnekleri, pıhtılı kan örnekleri analiz sonucunu etkilemektedir. Bu nedenle bu tür örnekler kabul edilmemektedir.

9. Referans aralığı

Moleküler doku tiplleme testleri tam kandan izole edilen genomik DNA ile PCR işlemi gerçekleştirilir. Agaroz jel elektroforezinde görülen bantlar hem manuel olarak hem de bilgisayar programı ile değerlendirilir.

Panel reaktif antikor testleri akım sitometri yöntemiyle çalışılır. Sonuçlar pozitif veya negatif kontrollere göre değerlendirme yapılarak sonuçlandırılır.

Cross-Match testi lenfositotoksiste yöntemi ve Akım sitometri yöntemiyle çalışılır. Mikroskopta ya da akım sitometre cihazında negatif ve pozitif kontrollere göre değerlendirme yapılarak sonuçlandırılır

Akım sitometri yöntemiyle çalışılan panel reaktif antikor tarama tanımlama testlerinin referans aralığı kullanılan negatif ve pozitif kontrollere göre belirlenir (negatif < %5, pozitif > %5).

Akım sitometri yöntemiyle çalışılan lenfosit cross-match testinin referans aralığı bu testte kullanılan negatif ve pozitif kontrollere göre belirlenir (negatif < %5, pozitif > %5).

10. Kalite Kontrol

Laboratuvarımız kalite güvenirliği açısından iç ve dış kalite kontrol programlarınca kontrol edilmektedir. Laboratuvarımızda bulunan bütün cihazların gerekli günlük, aylık ve yıllık kontrol, kalibrasyon ve bakımları yapılır, reaktifler belirli aralıklarla güncellenir. Testlere özgü kalibratör ve kontroller (negatif, pozitif, oto, vs..) test protokollerinde belirtildiği şekilde her bir çalışma için kullanılmaktadır. Elde edilen sonuçlar kayıt altına alınmaktadır.

Doku tiplleme laboratuvarımız dış kalite kontrol değerlendirmesi için Balkan Eksternal Kalite Kontrol Programı (BEPT) üyesidir ve düzenli olarak kalite kontrol programlarına katılmaktadır. Gelen örnekler hasta gibi çalışılmakta ve elde edilen değerler kuruluşun internet web sayfası üzerinden gönderilmektedir. Aylık değerlendirme sonuçları PDF formatında mail olarak gelmektedir. Gelen sonuçlara göre laboratuvarımızın



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	14/26

performans değerlendirilmesi kayıt altına alınıp gerekli değerlendirmeler yapılmaktadır. Sonuç değerlendirme raporu hazırlanıp dosyalanarak saklanır.

11.Doku Tipleme Laboratuvarında Çalışılan Test Protokolleri

11.1. Kandan DNA İzolasyonu

Moleküler doku tipleme testleri için yapılan DNA izolasyonu ticari kit kullanılarak yapılmaktadır. Her hasta için 2 adet 1.5 ml eppendorf tüplere hasta etiketlemesi ve numaralandırılması yapıldıktan sonra ilk tüpe 200 µl kan örneği, 20 µl proteinaz K, 20 µl RNAase-A ve 200 µl lizis solüsyonu eklenip, vorteks yapılır. 55° C’de 10 dk inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası 200 µl alkol eklenip, vorteks yapılır ve spin kolona transfer edilir. İlk santrifüj 5000xg de 1 dk yapılır. Santrifüj sonrası kolon değiştirilir ve kitin içeriğinde bulunan tampon çözeltisinden (Buffer I) spin kolona 500 µl eklenenerek 5000xg de ikinci santrifüj yapılır. Aynı şekilde kolon değiştirilir ve kitin içeriğindeki ikinci bir tampon çözelti (Buffer II) ile ikinci yıkama yapılır ve örnekler 16602xg de 3 dk santrifüj edilir. İzolasyon için etiketlenen ikinci eppendorfa spin kolon transfer edilir. 100 µl elusyon tamponu eklenerek 5000xg de 1dk santrifüj yapılır. Spin kolon atılırken, eppendorftaki örnek, moleküler doku tipleme testleri için saklanır.

11.2. Moleküler Doku Tipleme Testleri

11.2.1. HLA-ABDR SSP Yöntemi

2000 µl lik ependorf tüpüne 1000 µl mastermiks konulur (Mastermiks kit içinde hazır bulunur). 7 µl Taq Polimeraz enzimi eklenir ve vortekslenir. Bu karışımdan 1H nolu numaralı tüpe 10 µl konulur (HLA-ABDR kiti 96 kuyucuktan oluşmaktadır ve bunlardan 1H numaralı kuyucuk kontrol kuyusudur). Kalan karışıma 125 µl örnek DNA konulur. Vortekslelendikten sonra, diğer kuyulara 10 ar µl dağıtılır. Daha sonra tüpler kendine özel seal (yapışkan bant) ile kapatılıp iyice sıkıştırılır. Sonra bu düzenek PCR cihazına konulup, uygun program seçilip, cihaz çalıştırılır. Daha sonra % 2’lik agaroz jel çözeltisi hazırlanıp (1 gr agarose bir erlenmayere konulup, üzerine 1X Tris-borat EDTA (TBE) 50 ml eklenip, mikrodalga fırında eritilir) özel tank kalıbına dökülür ve kalıbın 96 kuyu oluşturacak tarakları yuvalarına yerleştirilir. Jelin donması beklenir. Jel üzerine seviyesini geçecek şekilde 1X’lik TBE eklenir. PCR cihazından çıkarılan 96 kuyulu PCR ürünü jele uygun sırada yüklenir ve güç kaynağıyla 110 volt, 50 miliamperde 7 dk yürütülür. İşlemden sonra jel, tankından çıkarılarak jel görüntüleme sistemine konur ve lambası yakıldığında jelde görülen bant numaraları analiz kâğıdına yazılır. Bu bant numaraları kitin kitapçığında ve



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	15/26

Ready-Gene® programında değerlendirilerek hastanın HLA-ABDR doku grubu sonuçları raporlanır.

11.2.2. HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ SSO Yöntemi

Çalışma 4 aşamadan oluşmaktadır;

I. PCR

II. Hibridizasyon

III. Luminex100 IS cihazında okutulması

IV. Match-IT DNA programında dataların değerlendirilmesi

I – PCR

Her antijen ayrı PCR tüpünde çalışılacağından bir hasta için (A, B ve DR) 3 ayrı tüp hazırlanır.

Tam kandan izole edilen, 5 – 20ng aralığındaki genomik DNA'dan her tüpe 4ul bırakılır.

Kit içerisinde çıkan her grup için ayrı olan mixlerden ve her tüpe 10ul bırakılır. Yine her tüp için 6ul su eklenir

Her tüp için 0.2ul Taq Polimeraz enzimi eklenerek Thermal-Cycler cihazında SSO PCR 2 programı seçilerek 1 saat 15 dakikalık reaksiyon başlatılır.

- 4ul DNA + 6ul su + 10ul mix + 0.2ul Taq = 20ul (Toplam Hacim)

II – HİBRİDİZASYON

PCR sonrası oluşan üründen 5'er ul alınarak Luminex Platelerine bırakılır. Her antijen grubu için ayrı olan problemlerden 15ul üzerine eklenerek kısa pipetaj yapılır.

- Problemler eklenmeden önce ısıtıcı blokta 7dk 56 C'de bekletilip sonrasında 15sn vortexlenir.

Üzeri sale ile kapatılan plate, Thermal Cycler cihazında 20dk SSO Hibridizasyon programına bırakılır.

Program bitiminde 56 C'de sonsuz bekletmeye alındığı anda Streptavidin boyası eklenir

- Streptavidin hazırlanışı → 170ul Dilution Solusyonu + 0.85ul Streptavidin (Kuyucuk başına)

Streptavidin eklendikten sonra 10sn daha 56C'de bekletilip cihazda okutmaya geçilir.

- Boya, 56C'de Thermal-Cycler üzerinde eklenir, seri olmaya dikkat edilir ve eklemeler sırasında 170ul'lik mix kuyucuklara hızlı bir şekilde bırakılır.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	16/26

III – LUMINEX100 IS CİHAZINDA OKUTMA

Cihaz açıldığında sırası ile Warm Up (cihaz kendi yapmaktadır), Prime, Alkol (Çamaşır Suyu), Alkol (Alkol) ve Su ile yıkama (3 kerre) açılış yıkalamaları yapılır. Hasta listesinin taslağı Match IT programında hazırlanarak Luminex100 IS Software programına çekilir ve okuma başlangıcı verilir.

Okuma sırasında CON, proble bağlanma bölgeleri ve probe miktarları kontrol edilerek okuma takip edilir.

IV- MATCH IT DNA PROGRAMINDA DATALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yürütme sonrası oluşan datalar Match IT programına çağrılarak datanın değerlendirilmesi yapılır.

Değerlendirme esnasında; CON değerleri, probe bağlanma grafikleri ve Allel numaralandırmadaki eşleştirmeler kontrol edilerek sonuç verilir.

11.2.4. HLA-B27

Çalışma, Diagen marka Ankylosing Spondylitis HLA-B*27 Real Time kiti ile yapılır. Kit içerisinde Mix-A (Mavi Kapak), Mix-B (Kahverengi Kapak), Pozitif Kontrol ve Nükleaz içermeyen su bulunmaktadır. Her bir örnek tek tüpte çalışılır. 1 hasta için optik kapak PCR tüpüne, 10ul Mix – A + 3,5ul Mix – B + 3,5ul Nükleaz içermeyen su + 3ul DNA örneği eklenerek reaksiyon hazırlanır. Esco Swift Spectrum 48 cihazına gerekli etiketlemeler tüpün kenarına yapılarak yerleştirilir ve kit içerisinde bulunan uygun PCR Programı girilerek reaksiyon başlatılır. 1 saat 35 dakika süren program bitimiyle kontrol eğrisi olan HEX ile allel eğrisi olan FAM kontrol edilerek analiz edilir ve sonuç verilir.

11.2.5. HLA-B51

Çalışma, SNP marka HLA – B*51 Real Time kiti ile yapılır. Kit içerisinde HLA – B*51 Miks-1, HLA – B*51 Miks-2, Pozitif Kontrol DNA ve Negatif Kontrol DNA bulunmaktadır. Her bir örnek iki tüpte çalışılır. 1 hasta için 2 PCR tüpüne ayrı ayrı Miks-1 ve Miks-2'den 20'şer ul konur. Üzerlerine 5'şer ul hasta DNA'sı eklenerek reaksiyon hazırlanır. Esco Swift Spectrum 48 cihazına gerekli etiketlemeler tüpün kenarına yapılarak yerleştirilir ve kit içerisinde bulunan uygun PCR Programı girilerek reaksiyon başlatılır. 1



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	17/26

saat 35 dakika süren program bitimiyle kontrol eğrisi olan HEX ile allel eğrisi olan FAM kontrol edilerek analiz edilir ve sonuç verilir.

11.3. Panel Reaktif Antikor Tarama Testi (Fluoroanalyzer Yöntemi)

Kullanılacak boş kuyulara 300µl distile su eklenerek kuyular ısıtılır. 2-5 dakika sonra vakumlanır. Bu sırada boncuklar 30 saniye vorteks edilir ve sonrasında çok kısa santrifüj edilir. Her bir kuyuya sırasıyla 40 µl wash buffer, 12.5 µl serum örneği ve 5 µl HLA I/II boncukları eklenir. Plate'in üzeri kapatılır ve ışıktan uzak tutulur. Oda ısısında, yatay çalkalayıcıda 125 rpmde 30 dakika inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sırasında 45 µl wash buffer + 5 µl konsantre konjugat olacak şekilde çalışma konjugatı hazırlanır, kullanılıncaya kadar karanlıkta bekletilir. İlk inkübasyondan sonra kullanılan tüm kuyulara, 100µl. Wash Buffer eklenir, karıştırılır ve aspire edilir. Bu işlemden sonra kullanılan tüm kuyulara, 250µl. Wash Buffer eklenir, aspire edilir ve bu işle 3 kez tekrarlanır. Üçüncü yıkamadan sonra hazırlanan konjugattan 50 µl kullanılan tüm kuyulara eklenir. Plate'in üzeri kapatılır ve ışıktan uzak tutulur. Oda ısısında, yatay çalkalayıcıda 125 rpmde 30 dakika ikinci inkübasyon bırakılır. Inkübasyon sonunda kuyulara 150µl. Wash Buffer eklenir ve karıştırılır. Luminex / Life-Match cihazında okunur. MatchIT programında analiz edilir.

11.4. Panel Reaktif Antikor Tanımlama Testi (Fluoroanalyzer Yöntemi)

Kullanılacak boş kuyulara 300µl distile su eklenerek kuyular ısıtılır. 2-5 dakika sonra vakumlanır. Bu sırada boncuklar 30 saniye vorteks edilir ve sonrasında çok kısa santrifüj edilir. Her bir kuyuya sırasıyla 40 µl wash buffer, 12.5 µl serum örneği ve 5 µl HLA I veya HLA II boncukları eklenir. Plate'in üzeri kapatılır ve ışıktan uzak tutulur. Oda ısısında, yatay çalkalayıcıda 125 rpmde 30 dakika inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sırasında 45 µl wash buffer + 5 µl konsantre konjugat olacak şekilde çalışma konjugatı hazırlanır, kullanılıncaya kadar karanlıkta bekletilir. İlk inkübasyondan sonra kullanılan tüm kuyulara, 100µl. Wash Buffer eklenir, karıştırılır ve aspire edilir. Bu işlemden sonra kullanılan tüm kuyulara, 250µl. Wash Buffer eklenir, aspire edilir ve bu işle 3 kez tekrarlanır. Üçüncü yıkamadan sonra hazırlanan konjugattan 50 µl kullanılan tüm kuyulara eklenir. Plate'in üzeri kapatılır ve ışıktan uzak tutulur. Oda ısısında, yatay çalkalayıcıda 125 rpmde 30 dakika ikinci inkübasyon bırakılır. Inkübasyon sonunda kuyulara 150µl. Wash Buffer eklenir ve karıştırılır. Luminex / Life-Match cihazında okunur. MatchIT programında analiz edilir.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	18/26

11.5. CDC-LCM Testi

Lenfosit cross-match testi alıcının serumunda vericinin HLA antijenlerine karşı antikor varlığını araştırmak için yapılır. Kompleman bağımlı lenfosit cross match (CDC-LCM) testinde terasaki plağındaki kuyucuklarda alıcının serumu ile vericinin lenfositleri birlikte inkübe edilir. Ortama tavşan komplemanı eklenir. Eğer serumda HLA antijenlerine karşı antikor varsa antikor–antijen birleşmesi sonucu kompleman aktive olur. Lenfositler ölür, pozitif sonuç görülür. Aksi halde lenfositler canlı kalır ve negatif sonuç görülür. CDC-LCM testi, doku tiplendirme laboratuvarlarında her nakil öncesinde uygun solid organ alıcısını seçmek için çalışılmaktadır.

Mikrolenfositotoksiste Tekniği

I. Reaktiflerin Hazırlanışı

Lenfositleri yıkamak için PBS+Sitratlı PBS kullanılır

- PBS 8,1 gr NaCl
0,157gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{XH}_2\text{O}$
1,98 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{X}12\text{H}_2\text{O}$ 1lt distile suda çözülür. pH 7,2 ye ayarlanır
- Sitratlı PBS 8,1 gr NaCl
0,157gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{XH}_2\text{O}$
1,98 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{X}12\text{H}_2\text{O}$ 1lt distile suda çözülür. pH 7,2 ye ayarlanır
6 gr sodyum sitrat eklenir.
- Class I –II Boncukları: Kullanıma hazır. 2-8 °C de saklanmaktadır.
- %5’lik FCS: 1ml RPMI 1640 medyumuna üzerine 50 mikrolitre FCS (fetal calf serum) eklenir.
- DTT (Sigma D-0632, MW:154.2): 1.6 mg DTT 1 ml PBS içinde çözündürülür (0.01 M). Hazırlandıktan sonra porsiyonlara ayrılır ve -20 °C’de saklanır.
- L-Cystine (Sigma C-8755, MW: 240.3): 16 mg cystine 10 ml PBS içinde çözündürülür ve +4 C’de saklanır. Kullanılmadan önce oda ısısına getirilir. Cystine tam olarak çözünmez, bunun için her kullanımdan önce mutlaka iyice karıştırılır.

II. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

- Örnek Tipi Hastadan 1 tane düz biyokimya tüpü
Vericiden 2 tane EDTA’lı tam kan alınır.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	19/26

Kandan T ve B hücre izolasyonu + Crossmatch prosedürü

Hasta ve vericiden alınan EDTA'lı kan örnekleri 15 dakika 2500 rpm de santrifüj edilir. Vericiden B ve T lenfositleri izole edileceği için iki ayrı tüp hazırlanır. Santrifüj sonrası üstte kalan plazma kısmı ayrılır. Oluşan buffy –coat tabakasından pastör pipeti ile 2 ml alınır. Tüplere konur. Üzerine 2 ml sitratlı PBS eklenir. T LENFOSİT tüpüne 50 µl Class I boncukları, B LENFOSİT tüpüne 70 µl Class II boncukları konur. 5 dakika karıştırıcıda karıştırılır. Tüpler 3 dakika manyetik rackta bekletilir. Tüpler rackta iken kanlar boşaltılır, racktan alınarak üzerine 2 ml sitratlı PBS eklenir, nazıkçe alt-üst edilir. 1 dakika manyetik rackta bekletilir. Bu yıkama işlemi 2 kere sitratlı PBS + 3 kere PBS ile yapılır. Son yıkama dökülmeden pastör pipetiyle çekilir. Lenfositlerin üzerine 100 mikrolitre RPMI-1640 (%5 lik FCS'li) eklenir ve resüspanse edilir. Boş bir plağa elde ettiğimiz B ve T lenfositleri 1'er mikrolitre pipetlenir. Üzerine 1 damla akridin orange boyası damlatılır. Parafin kaplı plaklar hazırlanır.

Terasaki plağının

1. sırasına Negatif Kontrol (RPMI-1640 (%5 lik FCS'li) + Verici B lenfosit)
2. sırasına Pozitif Kontrol Serum + Verici B lenfosit
3. sırasına Verici B lenfosit + Hasta serumu
4. sırasına Verici B lenfosit + Hasta serumu
5. sırasına Hasta B lenfosit + Hasta serumu
6. sırasına Negatif Kontrol (RPMI-1640 (%5 lik FCS'li) + Verici T lenfosit
7. sırasına Pozitif Kontrol Serum + Verici T lenfosit
8. sırasına Verici T lenfosit + Hasta serumu
9. sırasına Verici T lenfosit + Hasta serumu
10. sırasına HastaT lenfosit + Hasta serumu eklenir.

Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 20 dakika inkübasyona bırakılır. 20 dakikanın sonunda her kuyucuğa 5 mikrolitre kompleman ekilir. 40 dk. inkübasyondan sonra 5 mikrolitre boya (EtBr-Akridin oranj) eklenir. Mikroskopta değerlendirilir.

Lenfositler yeşil renkli ise canlı (negatif)

Lenfositler kırmızı renkli ise ölü (pozitif) olarak kabul edilir.

Ölüm oranına göre % pozitif verilerek rapor edilir.

III. Dalaktan T ve B lenfosit hücre izolasyonu + crossmatch prosedürü

Dalaktan bistüri ile bir parça kesilip serum fizyolojik ile yıkanır. İçinde 20 ml RPMI olan petri kabına alınarak bistüri vasıtasıyla hücre sağımı yapılır. İşlem sonunda



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	20/26

petri içindeki RPMI pasteur pipeti yardımıyla partikülleri almadan dikkatlice çekilerek 10 ml'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 ml sitratlı PBS solüsyonu eklenir. Üzerine 50 µl T lenfositleri için Class I izolasyon boncuğu, B lenfositleri için ise Class II izolasyon boncuğu eklenir ve 5 dakika karıştırıcıda karıştırılır. Tüpler, 1,5 dk manyetik rackta (magnet) tutulup süre sonunda süpernatant dökülür. Tüpler, magnetten çıkartılıp üzerine 7-8 ml PBS eklenir ve 1 dk magnette tutulup supernatant dökülür. Bu işlem iki kez tekrarlanır. Bu işlemler sonunda tüpün duvarında kahve telvesi görüntüsünde izolasyon boncukları görünür. Bu boncuklarda kendisine tutunmuş olan hücreler mevcuttur. Hücrelerin üzerine 100 µl %5 lik Fetal Calf Serum + RPMI eklenir ve resüspanse edilir. Daha sonra bu hücre süspansiyonundan boş bir teresaki plağına 1 µl pipetlenip üzerine 5 µl boya (Acridineorange/ Ethidiumbromide (AO/EB)) eklenip floresan mikroskopta hücrelerin canlılığı ve yoğunluğuna bakılır. Bu işlemden sonra istediğimiz hücreleri izole etmiş oluruz. Elde edilen hücrelere cross-match prosedürü uygulanabilir.

11.6. DTT'li Mikrolenfositotoksosite Tekniği

IgM'i inaktive eden DTT ile yıkanan donör hücreleri, alıcı serumu ile karşılaştırılır. Majör cross-match (+), DTT'li cross-match (-) ise test hastada IgM HLA antikorlarının varlığını gösterir.

Prosedür

Son hücre yıkanmasından sonra ortama konan ve RPMI (%5 FCS'li) içeren tüp magnete konularak 1 dk. bekletilir. Bir pastör pipeti ile tüpün dibine kadar inilerek tüp içerisindeki sıvı çekilir ve uzaklaştırılır. Tüp magnetten alınarak içerisine 100 mikrolitre (hücre konsantrasyonuna göre) DTT konur ve pipetaj yapılarak homojen hale getirilir. Hücreler normal Cross-Match prosedüründe olduğu gibi Terasaki plaklarına ekilir. 37 °C'de ve nemli ortamda 30 dk. inkübe edilir. İnkübasyonun bitimine 5 dk. kala kuyucuklara 1'er mikrolitre sistin eklenir. 5 dk. oda sıcaklığında bekletilir. Bu süre sonunda kuyucuklara 5'er mikrolitre kompleman eklenir. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. Her bir kuyucuğa 5'er mikrolitre EtBr/AO boya karışımı konularak mikroskopta değerlendirilir.

Lenfositler yeşil renkli ise canlı (negatif)

Lenfositler kırmızı renkli ise ölü (pozitif) olarak kabul edilir.

Ölüm oranına göre % pozitif verilerek rapor edilir.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	21/26

11.7. FC-LCM Testi

FC-LCM yönteminin amacı hastada, vericinin antijenlerine karşı bulunan antikorları hassas bir şekilde belirleyerek rejeksiyon riskini en aza indirmektir. Yöntemin prensibi, vericinin T ve B hücrelerinin yüzeyinde bulunan HLA antijenleriyle, hastanın serumunda bulunan anti-HLA antikorları arasındaki immünolojik reaksiyonları flow cytometry cihazı kullanılarak hassas ve doğru bir şekilde gösterilmesine dayanmaktadır. Uygulanacak yöntem aşağıda verilmiştir.

Vericiden (dönör) alınan 5 ml kan PBS ile 1:1 sulandırıldıktan sonra 3 ml Histopaque 1077 üzerine yayılır. 2500 rpm'de 15 dk. santrifüj edildikten sonra lenfositler bir pastör pipeti yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak temiz bir tüpe aktarılır. Hücreler PBS ile üç kez yıkanır (400xg'de 10 dk). Son yıkama işleminden sonra PBS uzaklaştırılır, dipte kalan pellet üzerine 1 ml kadar %5 FCS'li RPMI eklenir ve Thoma lamında sayım yapılarak hücre konsantrasyonu 5×10^5 olarak ayarlanır. Lenfositler üzerine 20 µl hasta serumu eklenir ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edilir. PBS ile iki kez yıkanır (600 x g'de 5 dk). Son yıkamadan sonra PBS uzaklaştırılır ve pellet üzerine PE (fikoeritrin) ile konjuge anti-CD3 monoklonal antikor (T lenfositler için) ya da APC (allofikosiyanın) ile konjuge anti-CD19 monoklonal antikor, bunun üzerine de FITC ile konjuge F(ab')₂ anti-human IgG antikor eklenir ve karanlıkta 30 dk. inkübe edilir. İnkübasyon sonrası üç kez yıkama yapılır (%5 FCS'li PBS) ve hücreler 500 µl PBS içinde resüspanse edilerek Flow cytometry cihazında okunur. Okuma sonunda pozitif ve negatif kontrollere göre değerlendirme yapılarak sonuçlar yorumlanır.



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	22/26



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKU TİPLEME LABORATUVARI TETKİK İSTEM FORMU



Ad Soyad:
Protokol No:
Doğum Tarihi:
Kan Grubu:

☐

Alıcı

İstem Tarihi ve Saati:

☐

Donör, Donör ise yakınlık derecesi:

Alıcının Adı ve Soyadı:

ÇALIŞILACAK TEST KODU/TEST ADI	Sonuç Verme Süresi	İstenen Örnek Cinsi Miktarı (Örneklerin transferi 2-8 °C'de gerçekleştirilmelidir)	
		Alıcı Örneği/Miktarı	Donör Örneği/Miktarı
MOLEKÜLER DOKU TİPLEME TESTLERİ			
☐ 1 HLA-A,B,DR Genotip Analizi (PCR-SSP, PCR-SSO düşük çözünürlük) 904.800 HLA-A,B,C (moleküler düşük çözünürlükte) (x2) HLA-DR,DP,DQ (moleküler düşük çözünürlükte)	904.810		
☐ 2 HLA-C Genotip Analizi (PCR-SSP, PCR-SSO düşük çözünürlük) 904.800 HLA-A,B,C (moleküler düşük çözünürlükte)			
☐ 3 HLA-DQ Genotip Analizi (PCR-SSP, PCR-SSO düşük çözünürlük) 904.810 HLA-DR,DP,DQ (moleküler düşük çözünürlükte)	15 gün içinde	1 adet EDTA'lı Kan (2ml x1)	1 adet EDTA'lı Kan (2mlx1)
☐ 4 HLA-B27 Genotip Analizi (PCR Multiplex) 908.726 HLA-B27			
☐ 5 HLA-B51 Genotip Analizi (PCR Multiplex) 908.726 HLA-B51			
PANEL REAKTİF ANTİKOR TESTLERİ			
☐ 6 Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-I tarama 905.170 PRA class I tarama		1 adet jelli tüp kan (5ml x1)	-----
☐ 7 Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-II tarama 905.190 PRA class II tarama		1 adet jelli tüp kan (5ml x1)	-----
☐ 8 Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-I tanımlama 905.160 PRA class I antijene spesifik	30 gün içinde	1 adet jelli tüp kan (5ml x1)	-----
☐ 9 Panel Reaktif Antikor (PRA) Class-II tanımlama 905.180 PRA class II antijene spesifik		1 adet jelli tüp kan (5ml x1)	-----
LENFOSİT CROSS-MATCH TESTLERİ			
(Lenfosit Cross-Match testleri için önceden randevu alınması gerekmektedir. Randevulu hasta ve donör kanları en geç 09.30'a kadar laboratuvara ulaştırılmalıdır)			
☐ 10 Lenfosit Cross-Match (T ve B hücre) (Her bir donör için) 905.390 T ve B lenfosit çapraz karşılaştırma,total, tek donör (x2)		1 adet jelli tüp kan (5ml x1) + 1 adet EDTA'lı tüp kan (6ml x1)	3 adet EDTA'lı tüp kan (6ml x3)
☐ 11 Lenfosit Cross-Match (T ve B hücre)(DTT'li Cross-Match) (Her bir donör için) 905.390 T ve B lenfosit çapraz karşılaştırma,total, tek donör (x2)	1 gün içinde	1 adet jelli tüp kan (5ml x1) + 1 adet EDTA'lı tüp kan (6ml x1)	3 adet EDTA'lı tüp kan (6ml x3)
☐ 12 Lenfosit Cross-Match (T ve B hücre)(Flow Cytometry ile) (Her bir donör için) 905.395 T ve B lenfosit çapraz karşılaştırma, tek donör		1 adet jelli tüp kan (5ml x1) + 1 adet EDTA'lı tüp kan (6ml x1)	3 adet EDTA'lı tüp kan (6ml x3)

TESTİN İSTEM AMACI

Doku Tipleme Laboratuvarı Adına Kabul Eden/İmza/Kaşe
Tarih/Saat:

İstemi yapan Dr./Kurum/Görevi/Kaşe/İmza

☐

Numune Uygun

☐

Numune Reddedildi!

Numune Red Bildirim No:

	DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ	Doküman Kodu	DL.RH.01
		Yayın Tarihi	17.02.2016
		Revizyon No	2
		Revizyon Tarihi	05.09.2022
		Sayfa No	25/ 24

DÜZELTİCİ / ÖNLEYİCİ FAALİYET FORMU

İLGİLİ BİRİMLER:

DÜZENLEYEN AD SOYAD:

İMZA:

DÜZENLEME TARİHİ:/...../.....

FAALİYET TÜRÜ ☐ **DÜZELTİCİ**
FAALİYET

☐ **ÖNLEYİCİ FAALİYET**

UYGUNSUZLUĞUN TANIMI (Lütfen detaylı olarak yazınız)

LAB. SORUMLUSUNUN DEĞERLENDİRMESİ

☐ Yukarıda tanımlanan uygunsuzluk için düzeltici-önleyici faaliyet başlatılması uygun görülmüş ve formun Kalite Yönetim Sorumlusuna havale edilmesine onay verilmiştir.

DTL Sorumlusu Ad-Soyad /İmza

KALİTE YÖNETİM SORUMLUSUNUN DEĞERLENDİRMESİ

☐ Yukarıda tanımlanan uygunsuzluk için düzeltici-önleyici faaliyete gerek görülmüştür.

DTL Kalite Kontrol Sorumlusu Ad-Soyad /İmza

DÜZELTİCİ/ÖNLEYİCİ FAALİYET PLANI						
AŞAMA NO	FAALİYET ADI	SORUMLUSU	KONTROL EDEN	TARİH ARALIĞI	EK SÜRE	
1						
2						
3						

DÜZELTİCİ / ÖNLEYİCİ FAALİYET SONUÇ DEĞERLENDİRMESİ

☐ Uygunsuzluk Eksiksiz Olarak Giderilmiştir.

DÖF Kapatma Tarihi:
...../...../.....

☐ Uygunsuzluk Devam Etmektedir.

DTL Kalite Kontrol Sorumlusu
Ad-Soyad /İmza

Ek Süre Tarihi:
...../...../.....

DTL Sorumlusu
Ad-Soyad /İmza



DOKU TİPLEME LABORATUVARI TEST REHBERİ

Doküman Kodu	DL.RH.01
Yayın Tarihi	17.02.2016
Revizyon No	2
Revizyon Tarihi	05.09.2022
Sayfa No	26/26

PERSONEL YARALANMALARI BİLDİRİM FORMU

ADI SOYADI
ÇALIŞTIĞINIZ BÖLÜM
YARALANMA TARİHİ
YARALANMA SAATİ
GÖREVİ

YARALANMAYA NEDEN OLAN ALET/MARUZ KALINAN MATERYAL NEDİR?

Alet İğne Ucu Bistüri Kateter Lam/Lamel Kırık Cam Malz Diğer (ismini belirtiniz)

Materyal kan Serum Kimyasal Malz (ismini belirtiniz) Diğer (ismini belirtiniz)

YARALANMANIN GERÇEKLEŞTİĞİ YER

YARALANAN VÜCUT BÖLGESİ

YARALANMAYA NEDEN OLAN ALET BİR HASTANIN VÜCUT MATERYALİ İLE KONTAMİNE OLMUŞ MU?

Evet Hayır Kaynağı Belli Değil!

SORUNUN CEVABI EVET İSE HASTANIN KAN YOLU İLE BULAŞAN BİR HASTALIĞI VAR MI?

HIV HEPATİT B HEPATİT C KIRIM DİĞER
KONGO

OLAY ESNASINDA KİŞİSEL KORUYUCU EKİPMAN KULLANIYORMUYDUNUZ?

Evet Hayır

SORUNUN CEVABI İSE HANGİLERİ OLDUĞUNU İŞARETLEYİNİZ

Tek Kat Eldiven Çift Kat Eldiven Önlük Göz Maskesi Yüz maskesi Cerrahi Maske

YARALANMANIN ŞİDDETİ NEDİR?

Yüzeysel Mukoza Derin

HEPATİT B AŞINIZ VAR MI?

Evet Hayır

ENJEKTÖR KULLANIRKEN

Plastiği Kapatırım Plastiği kapatmam

KAZAYI KISACA TANIMLAYINIZ?

KAYNAK HASTAYA AİT SEROLOJİ SONUÇLARI

Hbs-Ag Anti-Hbs Anti-HCV Anti-HIV

PERSONELE AİT SEROLOJİ SONUÇLARI

Hbs-Ag Anti-Hbs Anti-HCV Anti-HIV

PERSONELE YAPILAN UYGULAMALAR