



1.0 AMAÇ

KTÜ Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Farabi Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvarında Flow crossmatch; DSA (donor spesifik antikörlerinin) varlığı ve oranını tespit etmek amacı ile geliştirilmiş floresan bağlı monoklonal antikor ile işaretleme temeline dayalı yüksek sensitiviteye sahip bir testtir.

2.0 KAPSAM

DL 'da Flow Ctometry çalışan tüm personeli kapsar.

3.0 KISALTMALAR

DL: Doku Tipleme Laboratuvarı

4.0 TANIMLAR

Flow Crossmatch: Flow sitometri sistemi ile doğrudan verici ve hasta arasında T ve B hücrelerinin uyumsuzluğunun tespiti için yapılan testlerdir.

HLA Class I ve Class II molekülleri polimorfik membran proteinleri olup bireylerde transplant allograftlarının hayatta kalımını tespit eden büyük antijenik sistemdir. HLA antikörleri, hamilelik, kan ürünlerinin transfüzyonu veya önceki transplantasyonların sonucu olarak alloimmunizasyonla ortaya çıkar.

5. 0 SORUMLULAR

• Başhekimlik
• Anabilim/Bilim Dalı/Bölüm Başkanları
• Hastane Başmüdürü
• Kalite Koordinatörlüğü
• Laboratuvar Sorumlusu
• Birim Kalite Temsilcileri
• Bölüm /Birim Sorumluları
• Laboratuvar Çalışanları
• Tüm Çalışanlar

6.0 FAALİYET AKIŞI

6.1 FLOW CROSSMATCH ÇALIŞMASI

6.2 SİSTEMDE 3 KONTROL SİSTEMİ VARDIR

6.3 LENFOSİT İZOLASYONU

6.4 TEST ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

6.5 FLOW CYTOMETRY CİHAZININ ÇALIŞTIRILMASI

6.6 FLOW CYTOMETRY CİHAZINDA TESTİN OKUTULMASI

6.7 SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

6.1 FLOW CROSSMATCH ÇALIŞMASI

Bu prosedür iki ana parçadan oluşmaktadır, "Lenfosit İzolasyonu" ve "Test Prosedürü". Yardımcı olabilecek ipuçları:

- Donör ve alıcı lenfosit izolasyonu test prosedürüne geçmeden önce yapılmalıdır.
- Post-transplant izleme için, karşılaştırma amaçlı olarak pre-transplant hasta serum örneği saklanır.
- Test prosedüründe hem alıcı lenfositlerine hem de verici lenfositlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Donör lenfositleri ile recipient lenfositlerinin izolasyonu ve recipient serumu elde edildikten sonra lenfositlerinin analizi için 6 adet (pbs, negatif, pozitif, crossmatch,1/2 crossmatch, hasta crossmatch) tüp hazırlanır. Hazırlanan lenfosit tüp serilerine serum eklenir. HLA antijenlerinin var ise serumdaki antikörlere bağlanması sağlanır. CD3 ve CD19 inkübasyonu ile T ve B lenfosit ayırımı gerçekleştirilir.

Serbest antikorları uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapılır. Anti Human IgG-FITC 'nin, seconder antikorun inkübasyonu ile oluşan antijen-antikor kompleksine bağlanması sağlanır. Yıkamalarla serbest antikorlar uzaklaştırılır. Tüpler flow cytometry cihazında okutulur.

O	O	O	O	O	O
TPBS	TNEG	TPOZ	TMC	T ^{1/2} CM	THCM

6.2 SİSTEMDE 3 KONTROL SİSTEMİ VARDIR

- İlk Sistem: Pbs tüpü cihazı ayarlamak için kullanılır. Verilen diyagramda hücre dağılımlarına bakılır.
- İkinci Kontrol Sistemi: Kan grubu ABRh- ve PRA negatif olan kişilerden daha önce elde ettiğimiz negatif serum ve donör lenfositlerini içerir. Sistemde antikorların hücrelere bağlanma oranını gösterir crossmatch tüpleri ile karşılaştırma bu değerler ile yapılır.
- Üçüncü Kontrol Sistemi: Önceden PRA pozitifliği tespit edilmiş serum ile donör lenfositlerini içerir. Serumdaki antikorların hücrelere bağlanma oranını gösterir. Pozitifliğin gerçekten var olup olmadığı ve sistemin doğru çalışıp çalışmadığı kontrol edilir.

Reaktifler;

- Her kit için maksimum test sayısı: 50
- CD3-PerCP (BeckmanCoulter-Ancell)
- CD19-PE (BeckmanCoulter-Ancell)
- Anti- Human IgG (H+L)-FITC Goat F(ab')₂ Fragment (BeckmanCoulter)
- PBS
- Negatif kontrol serum.
- Pozitif kontrol serum

Gerekli Materyaller;

- Hasta serumları ve kontrol serumları için test tüpleri.
- 10ul, 10-100ul ve 20-200ul ayarlanabilir mikropipetler ve atılabilir pipet ucu.
- Zaman tutucu
- Flow Cytometry cihazı.
- Deiyonize veya distile su
- Kurutma kağıdı
- Santrifüj
- Folyo
- % 10 luk IgG hazırlanması için tüp
- PBS/FCS Karışımı yapmak için 50ml falcon tüp
- Vorteks
- Facs Flow Sheat
- % 70 lik alkol

Önlemler ;

- Bulanık ya da kontamine olmuş reaktifleri kullanmayınız.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri kullanmayınız.
- Önerilenden daha yüksek hızlarda santrifüj edilmesi lenfositlerin kaybolmasına, kümelenmeye, premature lenfosit lizisine neden olabilir.
- CD3, CD19 ve IgG-FITC kullanılmadan önce 4°C'de saklanmalıdır.
- İnkübasyon süreleri ile PBS ile yıkama yapılırken santrifüj devirlerine dikkat edilmelidir.
- Ortam sıcaklığına dikkat etmeli ortalama 20°C'de çalışmalı.

Uyarılar;

Bu ürün de Pozitif ve Negatif kontrol olarak kullanılan tüm insan serumları HIV, HCV ve HbsAg antikorları yönünden negatif olup olmadığı test edilmediğinden dolayı bu materyallere olası infeksiyöz olarak muamele edilmelidir.

6.2.1 Numune Toplanması

Hücre: Dalak alındıktan sonra 72 saat içinde işleme tabi tutulmalıdır. Periferik kan lenfositleri sodyum heparin veya aseptik teknik kullanılan ACD tüplerine toplanmalı (5-6 cc), oda ısısında saklanmalı, ve toplananlar 72 saat içinde işleme tabi tutulmalıdır.

Serum: Kan aseptik teknikle antikoagülsüz olarak toplanır (3 cc) ve uygun olmayan saklama koşulları ve numunenin kontaminasyonuna bağlı yanlış pozitiflik ve negatiflik oluşma şansını minimuma indirmek için henüz taze iken test edilmelidir.

- Hemen test edilemeyecek serum örnekleri dondurularak veya 2-8°C'de en fazla 48 saat saklanabilir. - 20°C'de veya daha düşük C'de dondurulmuş örnekler 2 yıl süreyle saklanabilir.
- Tekrarlanan dondurma/çözdürme sikluslarının zararlı etkilerini önlemek için, örneklerin küçük hacimlere bölünüp, dondurularak saklanması önerilir.
- Serum saklanacağı veya gönderileceği zaman kırmızı hücrelerden ayrılmalıdır.
- Toplanmış ya da partiküllü serum örnekleri yanlış pozitif veya negatif sonuçlar oluşturabilir. Testten önce partiküllü cisim içeren örnekler santrifügasyon ile saflaştırılmalıdır.
- Bu tahlil için sadece tam insan serumu uygundur.
- Mikrobiyal olarak kontamine olmuş, hemolizli, lipemik, ikterik, veya ısı ile inaktive olmuş serumlar tutarsız sonuçlar verebilir, bunlardan sakınılmalıdır.

6.2.2 Çalışma Prosedürü

Dilasyonları yaparken reaktifleri uygun bir aletle ölçmeye dikkat edin.

- 2 adet uzun cam tüp
- 2 adet kısa cam tüp
- 6 adet santrifüj tüpü
- 4 adet Pastör pipet
- 2 adet uzun cam pipet
- 15 ml ficol
- 15 ml Amonyum Ph: 7.4
- 500 ml izotonik ya da PBS
- 200ul alıcı serumu
- 200ul verici hücreleri (RPMI-FCS ile hücreler Neubauer lamında her karede 25-30 olacak şekilde dilasyon yapılmalıdır.)
- 1 ml PBS ya da İzotonik
- Lam ve lamel

Gerekli Ek Materyaller;

- Hasta örnekleri ve diğer dilasyonlar için test tüpleri.
- Yıkamaların yapıldığı atık kabı
- Zaman tutucu
- Işık mikroskobu
- Neubauer lam ve lamel
- Deiyonize veya distile su
- Kurutma kağıdı
- Santrifüj
- 37°C inkubator veya su banyosu
- Hücre kültür media(RPMI+FCS)
- Lenfosit density ayırma media (1.077g/ml)

6.3 LENFOSİT İZOLASYONU

6.3.1 Tam Kandan Lenfosit İzolasyonu;

- Heparinli enjektörle (hem KBY hastasından hem de vericisinden) 5-6 cc kan alınır.
- Her hasta için 4 tüp hazırlanır:
- Uzun düz cam tüp içine 5-6 ml PBS eklenir.
- 15 cc santrifüj tüpü içine 3 ml Fikol (lymphocyte density separation media'yı (1.077g/ml) eklenir.

- 15 cc santrifüj tüpü boş bırakılır.
- Kısa düz cam tüp (Kısa Pasteur pipeti konur.)
- PBS'in üzerine enjektördeki kan yavaşça boşaltılır ve 5ml'lik pipetle pipetaj yapılır.
- Kan-PBS karışımından alınan 10-12 ml ürün fikolün üzerine dökülür.(Pipetle, tüpün kenarından sızdırarak yavaşça aktarılır.)
- 1-2 dk. bekledikten sonra tüp 2600 RPM'de 20 dk. santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda lenfosit halkası Pasteur pipetiyle dikkatlice alınır (kırmızı hücrelerin minimum sayıda alınmasına özen gösterilmelidir) ve III no'lu tüpe aktarılır.
- Tüpün üzerine 4-5 ml PBS eklenir, pipetaj yapılır ve 1800 RPM'de 5 dk. santrifüj edilir. (Bu işlem gerekirse tekrarlanır.)
- Santrifüj sonunda süpernatant atılır. Hücrelerin üzerine 5 ml NH₄Cl eklenir, 5 dk. beklenir ve 1500 RPM'de 5 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda süpernatant atılır. Hücrelerin üzerine 5 ml PBS eklenir. 1100 RPM'de 5 dk. santrifüj edilir.
- Santrifüj sonunda süpernatant atılır. Hücrelerin üzerine 4ml P.B.S eklenir. 1000 RPM de 4 dk. santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır. Hücrelerin üzerine RPMI-FCS. karışımı (9:1) eklenir. Pipetaj yapılır ve Neubauer lamında sayılır.
- Hücrelerin sayısı her karede 25-30 adet olacak şekilde RPMI-F.C.S. karışımı ile ayarlanır ve plaklara dökülecek hale getirilir.

6.3.2 Dalaktan Lenfosit İzolasyonu

Dalaktan lenfosit hazırlarken, dokuyu küçük parçalara ayırabilmek için yumuşatınız, tam hücre kültür vasatında süspanse ediniz, lymphocyte density seperation media (1.077 g/ml) üzerine tabaka halinde yayınız ve 2600 rpm'de 15- 20 dakika santrifüj ediniz. Density separation media'nın arayüzeyinden hücre tabakasını toplayınız. Diğer aşamaları tam kan izolasyonunda olduğu gibi yürütünüz.

Hazırlanacak Hücre Miktarının Hesaplanması

- Tam kan ya da dalaktan elde edilen hücre pelleti üzerine 200ul RPMI-FCS eklenir. Neubauer lamında her karede 25-30 adet olacak şekilde skorlama yapılır. Bu sayıdan daha fazla hücre sayımı yapıldığında dilusyon oranı arttırılır.
- Hücrelerin kümelenmemiş olmasına ve trombositlerden tam olarak temizlendiğine emin olunuz.
- Bu testte hücre kalitesi testin doğru sonuç verebilmesi için büyük önem arz etmektedir. Mikroskopta hücre sayımı yaparken hücre kalitesinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

6.4 TEST ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

- Lenfositler elde edildikten sonra Her hasta için 6 adet tüp hazırlanır.
 - **PBS X DTBL**=50ul PBS +50UL verici lenfosit
 - **Negatif Kontrol X DTBL**=50ul N K serumu +50ul verici lenfosit
 - **Pozitif Kontrol X DTBL**=50ul P K serumu +50ul verici lenfosit
 - **HS x DTBL** =50ul Hasta serumu+50ul verici lenfosit
 - **HS ½ x DTBL**= 50ul hasta serumu facs flow karışımı (50ul hasta serum + 100ul facs flow karıştırılır) + 50ul verici lenfosit
 - **HS x HTBL**= 50ul hasta serumu + 50ul alıcı lenfosit
- Tüplere belirtilen miktarlarda belirtilen materyaller eklendikten sonra önce tüpler vortekslenir sonra su banyosunda 30 dk 37 derecede inkübe edilir.
- İnkübasyondan sonra tüplere 3 ml PBS / FCS karışımı eklenir. (Karışım için 9 PBS 1 FCS oranında koyuyoruz. 100 ml bir karışım için 90 ml PBS 10 ml FCS konup çalkalanması yeterli. Karışım her aşamada soğuk olmalı +4 idealdir.) Vortekslenir ve 4000 rpm 4 dk santrifüj edilir.
- 1. yıkama için tüpler ters çevrilip tek hamlede sarsmadan dökülür üzerlerine 3 ml PBS / FCS karışımı eklenir, vortekslenir ve 4000 rpm 4 dk santrifüj edilir.
- Tüpler ters çevrilip tek hamlede sarsmadan dökülür üzerlerine 5ul CD3 ve 5ul CD19 Markerları eklenir ve son olarak tüplere 50ul diliv edilmiş IG eklenir. (IG 1/40 oranında facs flowla diliv edilir. Bir hasta 6 tüp için 7.5ul IG ile 292.5ul facs flow karıştırılır, bu karışımdan 50ul her tüpe dağıtılır.)
- Tüpler +4 derecede karanlıkta 30 dk inkübe edilir.

- İnkübasyondan sonra üzerlerine 3 ml PBS / FCS karışımı eklenir, vortekslenir ve 4000 rpm 4 dk santrifüj edilir.
- 2. yıkama için tüpler ters çevrilip tek hamlede sarsmadan dökülür üzerlerine 3 ml PBS / FCS karışımı eklenir, vortekslenir ve 4000 rpm 4 dk santrifüj edilir.
- Tüpler ters çevrilip tek hamlede sarsmadan dökülür üzerlerine 300ul PBS / FCS karışımı eklenir ve **Flow Cytometry Cihazında** okutulur.

6.5 FLOW CYTOMETRY CİHAZININ ÇALIŞTIRILMASI

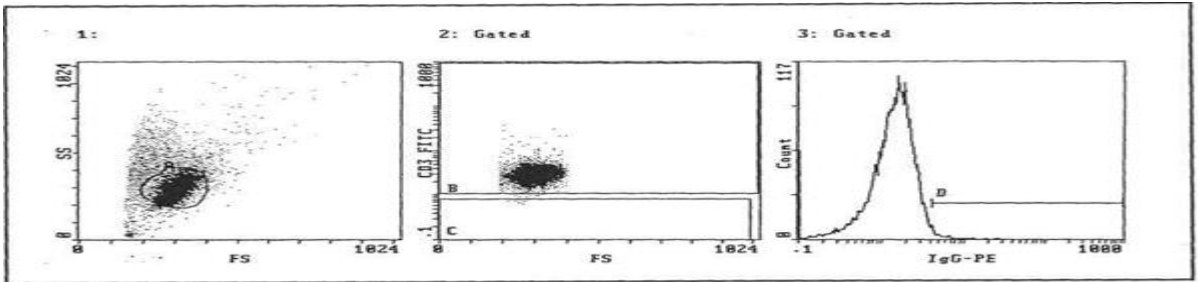
Cihaz ve monitör power düğmelerinden açılır. Software programı açılır. Cytometre linkinden startup yapılır ve sırasıyla önce tank bağlantıları yapılır sonra uygun nozzle takılır ve sistemin kendisini açma işlemi sırasıyla takip edilir. Açılan ana sayfada protokol kısmından istenilen protokol seçilir. Sonra daha önceden yaptığımız kompenzasyon ayarı seçilir. Protokol hazırlamada kullanılacak kadar tüp isimleri ve içerisine ekleyeceğimiz CD markerler browser menüsü yardımıyla önceden yapılır. Ayrıca worksheat menüsünde uygun dot-plot ve histogram grafiklerimiz çizilerek hazır hale getirilir. Cihaza ilk olarak distile su tüpü okutması yaptırılır (Yıkama işlemi). Tüpler sırası ile okutulduktan sonra cihaza tekrar distile su ile yıkama yaptırılır.

Değerlendirme işlemleri yapıldıktan sonra cihaz cytometre linkinden shutdown ile kapatılır. Önce nozzle çıkarılır sonra tank bağlantıları kapatılır daha sonra distile su verilerek sistem yıkaması yapılarak sistem kapatılır. Cihaz ve monitör kapatılır ve tankların havası alınır çalışma ortamı alkolle dezenfekte edilerek çalışma bitirilir.

6.6 FLOW CYTOMETRY CİHAZINDA TESTİN OKUTULMASI:

Tüpler ayrı ayrı olacak şekilde aşağıdaki sıra ile cihaza verilerek okutulur.

- **Pbs tüp cihazı ayarlamak için kullanılır.** Tüp cihaza verilerek **1. diyagramda** hücrelerin dağılımı gözlenir. Lenfositlerin diğer hücelere göre daha yoğun ve belli bir bölgeye düştüğü bölge A ile adlandırılan bit map içerisine alınır. Bu işlem ile cihazın sadece işaretlenen bölgedeki hücreleri analiz etmesi sağlanır..
- **2.diyagramda** Bit map içine alınmış hücrelerden T hücre için CD3-PerCP boyalı T lineer doğrusu ile boyanmamış hücreleri ayrılması sağlanır. B hücre içinde CD19-PE boyalı B lineer doğrusu ile boyanmamış hücreleri ayrılması sağlanır.
- **3.diyagramda;** 2.diyagramda lineer doğrunun üstünde kalan hücre grubunda IgG-FITC işaretlenmiş hücrelerin, total hücre miktarına oranını gösterir. Diyagramda bulunan D doğrusu IgG-FITC işaretlenmiş hücreleri içine almaktadır. Yükselip inen pik işaretlenmemiş hücre topluluğudur ve bu kısım *dara* olarak kabul edilir. D doğrusu ileri ve geri hareket ettirilerek pikin bittiği ve işaretlenmiş hücrelerin başladığı noktaya getirilerek bırakılır. D doğrusunun altında kalan bölgenin % oranı değerlendirme için gerekli olan orandır.



**Cihaz daha sonra verilen tüpleri de bu ayarlarla okuyup değerlendirecektir*

- 2. Negatif tüp daha önce negatifliği kanıtlanmış serumda antikorların hücelere bağlanma oranını gösterir. Bu değer önemlidir çünkü crossmatch ile karşılaştırma bu değerle yapılır.
- 3.Pozitif tüp daha önce pozitifliği kanıtlanmış serumda antikorların hücelere bağlanma oranını gösterir. Pozitifliğin gerçekten var olup olmadığının kontrolünü sağlar. Sistemin doğru çalıştığından emin olunur.
- 4. Crossmatch tüpü vericinin lenfositleri ile alıcının serumundaki antijenlerin birleşme oranını verir.
- 5.1/2 Crossmatch tüpü CM tüpünün teyidini sağlar. Değeri CM ile yakın veya eşit ise yapılan uygulamanın doğruluğunu teyit eder.

- 6. Hasta tüpü alıcının lenfositleri ile serumu inkübe edildiğinden otoantikorların oranını verir. Otoantikor varlığı değerlendirmede oldukça önemlidir.

6.7 SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sonuçlar tek tek kaydedilir. Negatif serumu için enaz 20 ABRh(-) ve PRA (-) şahıstan serum(karışık kontrol serumu) kullanılır. Bu serumlar negatif serumla birlikte enaz 20 hastada test edilir. Ortalama negatif değer ve karışık kontrol değer hesaplanır.

Ort(KK)-ort(N)=ort(CM-N) değeridir.

Limitler: Tort(KK)-Tort(N)= %3-5

Bort(KK)-Bort(N)= %0-3

Bu da demektirki; **TCM-TN=%3-5** büyük ise pozitif, küçük ise negatiftir.

BCM-BN=%0-3 büyük ise pozitif, küçük ise negatiftir.

7.0 İLGİLİ DOKÜMANLAR