



Kullanma Talimatları

i.Mune™ TBNK

i.Mune™ Prep (IM-PREP-01)

i.Mune™ TBNK Amp (IM-AMP-01)

i.Mune™ Check (IM-CHECK-01)

Önemli!

Yalnızca Kullanma Talimatlarının güncel sürümünü kullanın.

Test prosedürüne başlamadan önce <https://www.epimune-dx.com/english/products/client-area/> adresinde bulunan en güncel sürüme sahip olduğunuzdan emin olun

Kullanma talimatları kullanımdan önce dikkatlice okunmalı ve güvenilir sonuçlar elde etmek için tam olarak izlenmelidir.



IFU 002 TR, versiyon 00, telif hakkı © 20 Şubat 2023, Epimune GmbH



IM-PREP-01, IM-AMP-01, IM-CHECK-01



Epimune GmbH, Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin, Almanya

İçindekiler

1	Adı ve Kullanım Amacı	3
2	Özet ve Açıklamalar	3
3	Prosedürün Esasları	4
4	Önlemler ve Güvenlik	5
5	Sağlanan Malzemeler	6
6	Saklama ve Stabilitite	8
6.1	i.Mune™ Prep	8
6.2	i.Mune™ TBNK Amp	8
6.3	i.Mune™ Check	8
7	Gerekli Olan, Ancak Teslimat Kapsamına Girmeyen Malzemeler	9
8	Numune Toplama ve İşleme	11
8.1	Sıvı Venöz Tam Kan	11
8.2	Kurutulmuş Kan Lekesi	11
9	Test Prosedürü	12
9.1	Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	12
9.2	Hücre Lizisi	13
9.2.1	Sıvı Venöz Tam Kan	13
9.2.2	Kurutulmuş Kan Lekesi (DBS)	14
9.3	Bisülfid Dönüşümü	15
9.4	Bağlanma Adımı	15
9.5	İlk Yıkama	16
9.6	İkinci Yıkama	16
9.7	Kurutma	16
9.8	Elüsyon	16
9.9	Bisülfitle dönüştürülmüş (bis)DNA'nın saklanması	17
9.10	PCR Hazırlığı	17
9.10.1	Pipetleme şemasının hazırlanması	17
9.10.2	Standartların Hazırlanması	17
9.10.3	PCR Reaksiyon Karışımlarının hazırlanması	17
9.10.4	PCR Plakalarının Hazırlanması	17
10	Roche LightCycler 480 Instrument II cihazı ile Analiz	19
10.1	Plakanın Yüklmesi	19
10.2	Analiz Ayarları	20
10.3	Veri Analizi	21
11	Kalite Kontrolü	22
11.1	Yürütüm Geçerliliği - Harici Kontroller: i.Mune™ Check Kit (IM-CHECK-01)	22
11.2	Numune Kabulü ve Dâhili Kontrol	22
11.3	Düzeltilici Faaliyetler	23
12	Prosedürün Sınırlamaları	23
13	Performans Özellikleri	24
13.1	Yeniden Üretilirlik ve Tekrarlanabilirlik	24
13.1.1	Sıvı Venöz Tam Kan	24
13.1.2	Kurutulmuş Kan Lekesi	25
13.2	Doğrusallık	25
13.3	Tayin Sınırı (LoQ)	25
13.3.1	Sıvı Venöz Tam Kan	25
13.3.2	Kurutulmuş Kan Lekesi	26
13.4	Güvenilirlik	26
13.4.1	Sıvı Venöz Tam Kan	26
13.4.2	Kurutulmuş Kan Lekesi	26
13.5	Etkileşim	26
13.6	Klinik Performans	27
13.6.1	Sıvı Venöz Tam Kan	27
13.6.2	Kurutulmuş Kan Lekesi	28
13.6.3	Referans Aralıklarının Karşılaştırılması	28
Simgelerin Anlamı		29
14	Referanslar	30
15	İletişim Bilgileri	30
16	Alıcıya Notlar	30

1 Adı ve Kullanım Amacı

i.Mune™ TBNK, sıvı venöz tam kandaki insan lenfosit alt gruplarının yüzdelerini ve mutlak sayılarını belirlemek ve filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş kapiller tam kan numunelerinde (Kurutulmuş Kan Lekesi; DBS) insan lenfosit alt gruplarının yüzdelerini belirlemek için kullanılan bir kantitatif *in vitro* testtir.

Test, aşağıdaki immün hücre tipleriyle ilişkili, immün hücre tipine özgü, demetile genomik hedef bölgelerin tespiti için floresan hidroliz problemleriyle gerçek zamanlı bir polimeraz zincir reaksiyonu kullanır:

- T lenfositler (CD3+)
- B lenfositler (CD19+) (BLC)
- Doğal öldürücü lenfositler (CD16+CD56dim) (Doğal öldürücü hücreler; NKC)
- Yardımcı T lenfositler (CD3+CD4+)
- Sitotoksik T lenfositler (CD3+CD8+).

2 Özet ve Açıklamalar

i.Mune™ TBNK testi, K₂EDTA kan alma tüplerinde toplanan sıvı venöz tam kandan ve filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş kapiller tam kan numunelerinden (Kurutulmuş Kan Lekesi; DBS) izole edilen T-, B- ve NK lenfositlerin demetile genomik DNA hedef bölgelerinin kantitatif tespiti için kullanılan bir *in vitro* gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testidir.

T-/B- ve NK lenfositlerin miktarının belirlenmesi, primer immün yetmezlikler, bulaşıcı hastalıklar, kanser, otoimmünite, otoinflamasyon ve immünosupresyon dâhil olmak üzere, çeşitli hücresel bağışıklık sistemi bozuklukları olan hastaların tespiti ve izlenmesine yönelik temel bir tanı yöntemidir^{1,2,3,4,5}.

Baron ve ark.⁶, 25 sağlıklı donör ve tedavi altındaki 97 HIV pozitif hastadan oluşan kohortlarla yapılan incelemelerde, epigenetik gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) testleri ile elde edilen sonuçların akış sitometrisi ile eşdeğer olduğunu göstermiştir. 97 HIV pozitif hastadan oluşan kohortta sıvı venöz tam kanda epigenetik lenfosit miktar tayini sonuçlarının, kurutulmuş kan lekeli numunelerinden elde edilen epigenetik qPCR ve akış sitometrisi ile iyi bağdaştığı gösterilmiştir.

Ayrıca, yenidoğanlardan alınan 274 kurutulmuş kan numunesinden oluşan bir kohortta epigenetik bağışıklık hücresi ölçümü, doğrulanmış 24 primer immün yetmezlik olgusundan 23'ünü doğru bir şekilde tanımlamıştır⁶. Bir yenidoğan tarama çalışmasında, kurutulmuş kan lekeli bazı epigenetik bağışıklık hücresi ölçümü yanlış pozitif SCID tarama sonuçlarının sayısını azaltmaya yardımcı olmuştur⁷.

Ayrıca, kendi beyanıyla sağlıklı donörlerden ileriye yönelik olarak 112 sıvı venöz tam kan numunesi toplanmış, i.Mune™ TBNK ile analiz edilmiş ve sonuçlar akış sitometrisi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Hem kendi beyanıyla sağlıklı donörlerden ileriye yönelik olarak toplanan sıvı venöz tam kan numuneleri hem de karşılık gelen filtre kağıdında kurutulmuş ilgili kapiller tam kan numuneleri için referans aralıkları tanımlanmıştır. Her iki numune türünün referans aralıkları karşılaştırılmıştır (bakınız "Klinik Performans Değerlendirmesi" bölümü).

3 Prosedürün Esasları

i.Mune™ TBNK, DNA'yı bisülfitle dönüştürmek ve saflaştırmak (i.Mune™ Prep, IM-PREP-01) ve bisülfitle dönüştürülmüş hedef DNA'yı gerçek zamanlı PCR'da çoğaltmak (i.Mune™ TBNK Amp, IM-AMP-01) için iki aşamalı bir prosedür kullanır. Her test yürütümüne Pozitif ve Negatif Kontroller dâhil edilir ve prosedürün başarılı bir şekilde yürütülmesini izlemek ve dolayısıyla sonuçların geçerliliğini sağlamak için kullanılır (i.Mune™ Check, IM-CHECK-01).

K₂EDTA kan alma tüplerinde toplanan sıvı venöz tam kan veya filtre kağıdında kurutulmuş kapiller tam kan (kurutulmuş kan lekeleri) lize edilir ve açığa çıkan genomik DNA bisülfitle dönüştürülür. DNA manyetik partiküllere bağlanır ve iki kez yıkanır. Bir kurutma adımından sonra bisülfitle dönüştürülmüş DNA elüe edilir.

İkinci bir adımda, bir Roche LC480 II cihazında 96 kuyucuklu bir plakada dubleks gerçek zamanlı PCR gerçekleştirilerek, bisülfitle dönüştürülmüş DNA'da hedef hücreye özgü demetile bölgeler eş zamanlı bir dâhili kontrol ölçümü eşliğinde çoğaltılır. Bu dâhili kontrol, saflaştırmayı ve polimeraz zincir reaksiyonuna yeterli DNA girişini doğrulamak için tasarlanmıştır.

i.Mune™ TBNK testi, farklı lenfosit alt kümeleri için hedefe özgü demetile CpG dinükleotid bölgelerini ve yapısal olarak demetile housekeeping (referans) geninden bisülfitle dönüştürülmüş bir DNA dizinini tespit eder.

4 Önlemler ve Güvenlik

Laboratuvar Önlemleri

- Bu prosedür yalnızca profesyonel laboratuvar kullanımı içindir ve DNA ekstraksiyon yöntemleri ile gerçek zamanlı PCR testlerine vakıf olduğu varsayılır.
- Lizis, bisülfid dönüşümü ve saflaştırma prosedürleri sırasında ve sonrasında numuneler arasında çapraz kontaminasyon riskini en aza indirmek için iyi laboratuvar uygulamalarına uyulması esastır.
- Numunenin çapraz kontaminasyonunu önlemek için yalnızca tek kullanımlık filtre uçları kullanın.
- Kalibre edilmiş pipetlerin kullanılması şiddetle tavsiye edilir.
- Ekstraksiyon prosedürü sırasında nükleazların numunelere karışmasını önlemek için iyi bir laboratuvar tekniği önemlidir.
- Prosedürde birden fazla adımda tüplerden sıvı alırken, manyetik boncukları çıkarmamaya dikkat edin.
- Bir önceki PCR testinde elde edilen PCR ürününden kaynaklanan bir kontaminasyona meydan vermemek için, PCR öncesi işlemlerin (örn. DNA bisülfid dönüştürme ve saflaştırma, PCR kurulumu) ve PCR sonrası işlemlerin (örn. gerçek zamanlı PCR) kesin olarak birbirinden ayrılması şiddetle tavsiye edilir.
- Herhangi bir PCR ürününün salınmasını önlemek için, kullanılmış PCR plakaları PCR cihazından çıkarılmalı ve özel bir atık kabına atılmalıdır.

Biyolojik Önlemler

- Ürün, insanlarda veya hayvanlarda hastalığa neden olan herhangi bir bulaşıcı madde veya ajan içermez.
- Bu testle analiz edilen insan kanı ve plazma numuneleri, Mikrobiyolojik ve Biyomedikal Laboratuvarlarda Biyogüvenlik, çalışanların iş yerinde biyolojik ajanlara maruz kalmayla ilgili risklerden korunmasına ilişkin 2000/54/EC sayılı Direktifte belirtilenler gibi güvenli laboratuvar prosedürleri veya diğer uygun biyogüvenlik uygulamaları kapsamında potansiyel bulaşıcı olarak ele alınmalıdır.

Ek Önlemler

- Kit bileşenlerini kit partileri arasında karıştırmayın.
- Önceden açılmış kitlerden arta kalanları yeni açılmış kitlerle birleştirmeyin.
- Kitleri veya kit bileşenlerini belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın.

5 Sağlanan Malzemeler

i.Mune™ TBNK, i.Mune™ Prep (IM-PREP-01), i.Mune™ TBNK Amp (IM-AMP-01) ve i.Mune™ Check (IM-CHECK-01) ile Microsoft Excel® bazlı bir veri analizi aracından (Epimune Data Analysis Tool, IM-APP-02) oluşur.

İçerik

Tablo 1: i.Mune™ Prep (IM-PREP-01) içeriği. Kit 60 ölçüm için yeterli reaktif içerir. Bu, her biri sekiz (8) numune, bir (1) i.Mune™ Negative Control (*Negatif Kontrol*) ve bir (1) i.Mune™ Positive Control (*Pozitif Kontrol*) kapsayan altı (6) yürütüm için yeterlidir.

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
i.Mune™ Lysis Buffer (<i>Lizis Tamponu</i>)	1 flakon	4,7 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Proteinase S (<i>Proteinaz S</i>)	1 flakon	0,8 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Bisulfite Solution (<i>Bisülfid Çözeltisi</i>)	1 flakon	12,5 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Protection Buffer (<i>Koruyucu Tampon</i>)	1 flakon	4,2 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Binding Buffer (<i>Bağlanma Tamponu</i>)	1 flakon	40,1 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Magnetic Beads (<i>Manyetik Boncuklar</i>)	1 flakon	0,7 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Wash Buffer 1 (WB 1) (<i>Yıkama Tamponu 1</i>)	1 flakon	20,7 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Wash Buffer 2 (WB 2) (<i>Yıkama Tamponu 2</i>)	1 flakon	10,4 ml	15°C ila 30°C
i.Mune™ Elution Buffer (<i>Elüsyon Tamponu</i>)	1 flakon	2,1 ml	15°C ila 30°C

Tablo 2: i.Mune™ TBNK Amp (IM-AMP-01) içeriği. Kit 72 ölçüm için yeterli reaktif içerir. Bu, her biri sekiz (8) numune, bir (1) i.Mune™ Negative Control ve bir (1) i.Mune™ Positive Control, bir (1) i.Mune™ Standard 1 ve bir (1) i.Mune™ Standard 2 kapsayan altı (6) yürütüm için yeterlidir. Primermix'ler (*primer karışımları*) renk kodludur.

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
i.Mune™ PCR Mix	1 flakon	1,2 ml	-30°C ila -15°C
 i.Mune™ TBNK Primermix 1	1 flakon	0,5 ml	-30°C ila -15°C
 i.Mune™ TBNK Primermix 2	1 flakon	0,5 ml	-30°C ila -15°C
 i.Mune™ TBNK Primermix 3	1 flakon	0,5 ml	-30°C ila -15°C
 i.Mune™ TBNK Primermix 4	1 flakon	0,5 ml	-30°C ila -15°C
 i.Mune™ TBNK Primermix 5	1 flakon	0,5 ml	-30°C ila -15°C
 i.Mune™ TBNK Primermix 6	1 flakon	0,5 ml	-30°C ila -15°C

Tablo 3: i.Mune™ Check (IM-CHECK-01) içeriği. Kit 12 yürütüm için yeterli reaktif içerir. Bileşenler renk kodludur.

	Reaktif	Kaplar	Flakon Başına Hacim	Saklama Sıcaklığı
	i.Mune™ Negative Control	2 flakon	0,07 ml	-30°C ila -15°C
	i.Mune™ Positive Control	2 flakon	0,07 ml	-30°C ila -15°C
	i.Mune™ Standard 1	2 flakon	0,13 ml	-30°C ila -15°C
	i.Mune™ Standard 2	2 flakon	0,13 ml	-30°C ila -15°C
	i.Mune™ Quantifier (Miktar Belirleyici)	2 flakon	0,11 ml	-30°C ila -15°C

Güvenlik Bilgileri

Kimyasallarla çalışırken her zaman bir laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldivenler giyin. Kirlenen yüzeyleri suyla temizleyin.

i.Mune™ Proteinase S: subtilizin içerir.

Tehlike ifadeleri: H317: Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir. H318: Ciddi göz hasarına neden olur.

Alınacak önlemlerle ilgili ifadeler: P280: Koruyucu eldiven/koruyucu giysi giyin.

P305+351+338: GÖZLE TEMASINDA: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Varsa ve çıkarması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

i.Mune™ Binding Buffer: guanidin tiyosiyanat içerir.

Tehlike ifadeleri: H302: Yutulduğunda zararlıdır. H312 Ciltle temas ettiğinde zararlıdır. H332 Solunduğunda zararlıdır. H412 Sucul ortamda uzun süre kalıcı, zararlı etki.

Alınacak önlemlerle ilgili ifadeler: P101 Tıbbi tavsiye gerekiyorsa, ambalajı veya etiketi saklayın. P102 Çocukların erişemeyeceği yerde saklayın. P264 Elleçlemeden sonra elleri iyice yıkayın. P271 Sadece dışarıda veya iyi havalandırılan bir alanda kullanın. P273 Çevreye salınmasından kaçının. P501 İçeriği/kabı yerel/ulusal düzenlemeler doğrultusunda bertaraf edin.

i.Mune™ Bisulfite Solution: amonyum hidrojen sülfid içerir.

Tehlike ifadeleri: H319: Ciddi göz tahrişine yol açar.

Alınacak önlemlerle ilgili ifadeler: P280: Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın. P305+P351+P338: GÖZLE TEMASINDA: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Varsa ve çıkarması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. P337+P313: Göz tahrişinin geçmemesi halinde, tıbbi tavsiye alın/doktorunuza başvurun.

Ek Tehlike bilgileri (AB): EUH031 Asitlerle temasında toksik gaz çıkarır.

i.Mune™ Protection Buffer: tetrahidrofurfuril alkol içerir.

Tehlike ifadeleri: H319: Ciddi göz tahrişine yol açar. H360Df: Doğmamış çocukta hasara yol açabilir. Üremeye zarar verme şüphesi var.

Alınacak önlemlerle ilgili ifadeler: P201: Kullanmadan önce özel talimatları okuyun. P305+P351+P338: GÖZLE TEMASINDA: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Varsa ve çıkarması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. P308+P313: Maruz kalınma veya etkileşme halinde, tıbbi tavsiye alın/doktorunuza başvurun.

Ek Tehlike bilgileri (AB): EUH031 Asitlerle temasında toksik gaz çıkarır.



TEHLİKE



UYARI



UYARI



TEHLİKE

i.Mune™ Magnetic Beads: guanidin klorür içerir:

Tehlike ifadeleri: H302: Yutulduğunda zararlıdır. H315: Cilt tahrişine yol açar. H319: Ciddi göz tahrişine yol açar. H332 Solunduğunda zararlıdır.

Alınacak önlemlerle ilgili ifadeler: P261 Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının. P305+P351+P338: GÖZLE TEMASINDA: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Varsa ve çıkarması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin. P311 ZEHİR MERKEZİNİ veya doktoru arayın. P501 İçeriği/kabı yerel/ulusal düzenlemeler doğrultusunda bertaraf edin.



UYARI

Şu bileşenler zararsızdır:

- i.Mune™ Lysis Buffer, i.Mune™ Wash Buffer 1, i.Mune™ Wash Buffer 2, i.Mune™ Elution Buffer
- i.Mune™ PCR Mix, i.Mune™ Primermix'ler 1 ila 6
- i.Mune™ Standard 1, i.Mune™ Standard 2, i.Mune™ Positive Control, i.Mune™ Negative Control ve i.Mune™ Quantifier

6 Saklama ve Stabilité

i.Mune™ Prep, i.Mune™ TBNK Amp ve i.Mune™ Check ile sağlanan reaktifler, belirtildiği şekilde saklandığında ve kullanıldığında son kullanma tarihine kadar stabildir. Son kullanma tarihi geçmiş malzemeleri kullanmayın.

6.1 i.Mune™ Prep



i.Mune™ Prep'i 15°C ila 30°C'de saklayın.

İlk kullanımdan sonra tüm reaktifleri 15°C ila 30°C'de 12 haftaya kadar saklayın.

Doğrudan ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

6.2 i.Mune™ TBNK Amp



i.Mune™ TBNK Amp'ı -30°C ila -15°C'de saklayın.

İlk kullanımdan sonra kiti 2°C ila 8°C'de 12 haftaya kadar saklayın.

Doğrudan ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

6.3 i.Mune™ Check



i.Mune™ Check'i -30°C ila -15°C'de saklayın.

İlk kullanımdan sonra kiti -30°C ila -15°C'de 12 haftaya kadar saklayın.

7 Gerekli Olan, Ancak Teslimat Kapsamına Girmeyen Malzemeler

i.Mune™ TBNK testini gerçekleştirmek için aşağıdaki genel laboratuvar ekipmanı gereklidir. Tüm laboratuvar ekipmanı üreticilerin tavsiyelerine göre kurulmalı, kalibre edilmeli, çalıştırılmalı ve bakımı yapılmalıdır.

Gerekli ve özel ekipman ve sarf malzemeleri, önerilen tedarikçiler, katalog ve parça numaraları ile birlikte aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Genel Labortuvar Ekipmanı

Gerekli Ekipman	Tedarikçi ve Parça Numaraları
2,0 ml'lik tüpler için tüp rafları	VWR International, LLC, katalog no. 82010-752 veya eşdeğer
2,0 ml'lik tüpler için tezgah üstü santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5425 katalog no. 540500071 veya eşdeğer
Vortex mikser	VWR International, LLC, katalog no. 58816-121 veya eşdeğer
2,0 ml'lik tüpler için Thermoshaker (<i>termomikser, çalkalamalı ısıtıcı</i>)	Thermomixer® R (<i>termomikser</i>), 2,0 ml kuru ısıtma bloklu, Eppendorf, katalog no. 022670107 ve 022670549 veya eşdeğer <u>Gerekli Doğruluk:</u> ± 100 rpm (<i>devir/dakika</i>); $\pm 2^{\circ}\text{C}$
Manyetik ayırıcı	DynaMag™-2 magnet, Life Technologies, katalog no. 12321D
Şu aralıklarda ayarlanabilir hacimlere sahip pipetler: 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Research® Plus, ayarlanabilir hacimli pipet, Eppendorf, katalog no. 3120000020, 3120000046, 3120000062 veya eşdeğer
Ayarlanabilir bir aralıkta çoklu alikot yapabilen elektronik pipet*	Eppendorf Multipette E3, katalog no. 4987000029 veya eşdeğer
Çok kanallı pipet 10 µl	Eppendorf 8-Channel, 0,5-10 µl katalog no. 3122000019 veya eşdeğer
PCR plakaları için santrifüj	Centrifuge 4-16S, Qiagen Inc., katalog no. 81510 ve 81031 veya eşdeğer
Microsoft Windows işletim sistemine ve Microsoft-Excel® 2016 sürümüne sahip bilgisayar	Not: Microsoft Windows işletim sistemi ve Microsoft-Excel® için dil ayarı İngilizce olmalıdır.

*opsiyonel

Genel Laboratuvar Sarf Malzemeleri ve Reaktifler

Sarf Malzemeleri ve Reaktifler	Tedarikçi ve Parça Numaraları
Etanol, moleküler biyoloji için, ≥%99,5	VWR, katalog no. 1085430250 veya eşdeğer
2-propanol (izopropanol, izopropil alkol), ≥%99,8, p.a.	Carl Roth GmbH, katalog no. 6752.x veya eşdeğer
Aerosol bariyerli pipet uçları	Eppendorf ep Dualfilter T.I.P.S®: - 0,1 - 10 µl, katalog no. 0030078500 veya eşdeğer - 2 - 100 µl, katalog no. 0030078543 veya eşdeğer - 50 - 1000 µl, katalog no. 0030078578 veya eşdeğer
Aerosol bariyerli ve ultra homojen yüzeyli pipet uçları	ep Dualfilter T.I.P.S. LoRetention 0,1 - 10µl veya eşdeğer
0,5 ml, 1 ml, 10 ml* hacimler için Combitips	Eppendorf Combitips Advanced®: - 0,5 ml, katalog no. 0030089421 veya eşdeğer - 1 ml, katalog no. 0030089430 veya eşdeğer - 10 ml, katalog no. 0030089464 veya eşdeğer
2 ml Safe Lock Tüpler	Eppendorf Safe-Lock Tubes 2ml, sipariş no. 0030120094 veya eşdeğer
Nükleaz içermeyen su	Carl Roth GmbH, katalog no. T1431.x veya eşdeğer
Kapağı takılı 0,2 ml tüpler	VWR, katalog no. GREI608281_120 veya eşdeğer
100 ml dereceli silindir veya 50 ml serolojik pipet	Carl Roth, katalog no. C177.2 veya eşdeğer ya da Fisher Scientific, katalog no. 11889181 veya eşdeğer
3,2 mm zımba	Belirtilmemiş
Cımbız	VWR, katalog no. 232-2121 veya eşdeğer
Petri kabı	VWR, katalog no. 391-0467 veya eşdeğer
K ₂ EDTA Kan Toplama Tüpleri	Vacutainer® K ₂ EDTA kan toplama tüpü, Becton Dickinson, katalog no. 368841 veya eşdeğer
Whatman™ 903 Proteinsaver Card	Cytiva Life Science, katalog no 10531018 veya eşdeğer

*opsiyonel

Gerekli Özel Ekipman ve Sarf Malzemeleri

i.Mune™ TBNK testini gerçekleştirmek için aşağıdaki özel ekipman ve sarf malzemeleri gerekli olup, başka ekipmanla değiştirilemez.

Özel Ekipman/Sarf Malzemeleri	Tedarikçi ve Parça Numaraları
LightCycler 480 Yazılımına (Sürüm 1.5.1) sahip Roche LightCycler 480 Instrument II cihazı	Roche, parça no. 05015278001
Roche LightCycler 480 Multiwell Plates 96 (<i>Kuyucuklu Plakalar</i>), beyaz (yalıtıcı folyo dâhil)	Roche, parça no. 04729692001

Kurulum Gereklilikleri

Roche LC480 Cihazının kurulumu, kalibrasyonu, performans doğrulaması ve bakımı üreticinin talimatlarına göre yapılmalıdır.

8 Numune Toplama ve İşleme

8.1 Sıvı Venöz Tam Kan

Sıvı venöz tam kan, bir K₂EDTA kan toplama tüpü kullanılarak laboratuvarınızın ven ponksiyon prosedürüne göre toplanmalıdır.

Kan numunesi aşağıdaki gibi saklanabilir:

- Oda sıcaklığında (15°C ila 30°C) 24 saate kadar

Sıvı venöz tam kanın taşınması ve sevkiyatı yukarıda belirtilen aynı sıcaklık ve zaman gerekliliklerine uygun olmalıdır.

8.2 Kurutulmuş Kan Lekesi

Kapiller tam kan, yayınlanmış prosedürlere göre filtre kağıdı üzerinde toplanmalıdır. Ayrıca, aşağıdaki talimatlar uygulanmalıdır:

- En az bir (1) tam daire gereklidir.
- Doldurulan daire tamamen ıslatılmış olmalıdır (kan kağıdın arkasına nüfuz etmelidir).
- Kağıt sadece bir taraftan doldurulmalıdır.
- Filtre kağıdı doğrudan güneş ışığından korunarak oda sıcaklığında en az dört (4) saat kurutulmalıdır.

Kurutulmuş kan lekesi aşağıdaki gibi saklanabilir:

- Oda sıcaklığında (15°C ila 30°C) ya da dondurulmuş olarak (-30°C ila -15°C) 12 haftaya kadar.

Kurutulmuş kan lekesi numunelerinin taşınması ve sevkiyatı yukarıda belirtilen aynı sıcaklık ve zaman gerekliliklerine uygun olmalıdır.

Pançların Hazırlanması

- 3,2 mm'lik bir zımba kullanarak, lekenin tamamen ıslatılmış bölgelerinden bir petri kabına üç (3) adet panç çıkarın.
- Bir cımbız kullanarak, her bir numune için üç (3) adet pançı bir (1) 2,0 ml tüpe aktarın.

9 Test Prosedürü

i.Mune™ Prep Kiti, 48 adede kadar numuneyi ve kontrolleri işlemek için yeterli reaktif içerir. Her bir bağımsız test yürütümüne bir (1) adet i.Mune™ Positive Control ve bir (1) adet i.Mune™ Negative Control dâhil edilmelidir. Kit, yürütüm başına maksimum sekiz (8) numune ve kontrol olmak üzere, maksimum altı (6) bağımsız test yürütümüne olanak sağlayacak şekilde tasarlanmıştır.

Not: Bu talimatın birkaç adımında, kapaktan damlaları çıkarmak ve/veya kalan sıvıyı toplamak için tüplerin kısa süreli santrifüjlenmesi ('Tüpleri kısaca santrifüjlesin' şeklinde belirtilmiştir) gereklidir. Bir tezgah üstü santrifüj kullanılarak 5 ila 10 saniye santrifüjleme önerilir. Bu adımlarda, manyetik boncuk peletlerinin sıkışmasını önlemek için daha güçlü santrifüjlemeden kaçının.

Not: Bu talimatın birkaç adımında, sıvının homojen bir şekilde karışmasını sağlamak için tüplerin ve flakonların vortekslenmesi gereklidir. Numunelerin orta hızda 5 ila 10 saniye boyunca vortekslenmesi önerilir.

Not: Her numune için benzersiz ve izlenebilir bir kimlik (ID) atanmalı ve veri analizi de dâhil olmak üzere tüm iş akışı boyunca kullanılmalıdır.

9.1 Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

i.Mune™ Wash Buffer 1'in Hazırlanması

- Steril bir dereceli silindir veya serolojik pipet kullanarak i.Mune™ Wash Buffer 1'e 14,0 ml 2-Propanol (İzopropanol, ≥%99,8, p.a.) ekleyin.
- Kapağı kapatın, şişeyi beş kez ters çevirerek iyice karıştırın, köpük oluşumunu önleyin. Şişeyi seyreltme tarihi ile etiketleyin ve "İzopropanol eklendi" onay kutusunu işaretleyin.

i.Mune™ Wash Buffer 2'nin Hazırlanması

- Steril bir dereceli silindir veya serolojik pipet kullanarak i.Mune™ Wash Buffer 2'ye 24,0 ml Etanol (moleküler biyoloji için, ≥%99,5) ekleyin.
- Kapağı kapatın, şişeyi beş kez ters çevirerek iyice karıştırın. Şişeyi seyreltme tarihi ile etiketleyin ve "Etanol eklendi" onay kutusunu işaretleyin.

i.Mune™ Positive ve Negative Control, i.Mune™ Positive Quantifier'ın Hazırlanması

- i.Mune™ Positive Control, i.Mune™ Negative Control ve i.Mune™ Quantifier'ı 15°C ila 30°C'de eritin.
- Çözüldükten sonra 60 dakika içerisinde lizis işlemine başlayın.

9.2 Hücre Lizisi

Not: Kullanmadan önce, i.Mune™ Lysis Buffer içeren şişeyi kısaca çalkalayın ve çökelti olup olmadığını görsel olarak kontrol edin. Çökelti varsa, i.Mune™ Lysis Buffer'ı 37°C'de bir su banyosunda ısıtın ve çökelti tamamen çözülene kadar hafifçe çalkalayın.

Not: Hücre lizis işlemi sıvı venöz tam kan ve kurutulmuş kan lekeleri (DBS) için farklılık gösterir. Lütfen sıvı venöz tam kan için 9.2.1 ile, kurutulmuş kan lekeleri (DBS) için ise 9.2.2. ile devam edin.

9.2.1 Sıvı Venöz Tam Kan

Numuneler

- İlgili sayıda numunenin test edilmesini sağlamak için yeterli miktarda Lysis Master Mix (*Lizis Ana Karışımı*; +2 reaksiyon) hazırlayın.

Kit Bileşeni	1 Reaksiyon için Hacim - Sıvı Venöz Tam Kan Numunesi [µl]
i.Mune™ Lysis Buffer	25,4
i.Mune™ Proteinase S	4,0
i.Mune™ Quantifier	1,6
Toplam Lysis Master Mix Hacmi	31,0

- 2,0 ml'lik tüpleri numune kimlikleriyle işaretleyin.
- Etiketli 2,0 ml'lik bir tüpe şunları ekleyin:
 - 40,0 µl Sıvı Venöz Tam Kan
 - 31,0 µl Lysis Master Mix

Kontroller

- 2,0 ml'lik tüpleri PK ve NK kimlikleriyle işaretleyin.
- Etiketli 2,0 ml'lik bir tüpe şunları ekleyin:
 - PK
 - 10,0 µl i.Mune™ Positive Control
 - 30,0 µl nükleaz içermeyen su
 - 27,0 µl i.Mune™ Lysis Buffer
 - 4,0 µl i.Mune™ Proteinase S
 - NK
 - 10,0 µl i.Mune™ Negative Control
 - 30,0 µl nükleaz içermeyen su
 - 27,0 µl i.Mune™ Lysis Buffer
 - 4,0 µl i.Mune™ Proteinase S
- Tüpleri kapatın ve 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Tüpleri bir termoshaker içinde 56°C'de 15 ± 1 dakika boyunca hafifçe çalkalayarak (900 rpm) inkübe edin.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.

9.2.2 Kurutulmuş Kan Lekesi (DBS)

Numuneler

- İlgili sayıda numunenin test edilmesini sağlamak için yeterli miktarda Lysis Master Mix (+2 reaksiyon) hazırlayın.

Kit Bileşeni	1 Reaksiyon için Hacim – DBS Numunesi [µl]
i.Mune™ Lysis Buffer	68,0
i.Mune™ Proteinase S	11,0
i.Mune™ Quantifier	1,0
Toplam Lysis Master Mix Hacmi	80,0

- 2,0 ml'lik tüpleri numune kimlikleriyle işaretleyin.
- Etiketli 2,0 ml'lik bir tüpe şunları ekleyin:
 - Numune başına üç (3) adet 3,2 mm kurutulmuş kan lekesi pançı.
 - 80,0 µl Lysis Master Mix

Kontroller

- 2,0 ml'lik tüpleri PK ve NK ile işaretleyin.
- Etiketli 2,0 ml'lik bir tüpe şunları ekleyin:
 - PK
 - 10,0 µl i.Mune™ Positive Control
 - 69,0 µl i.Mune™ Lysis Buffer
 - 11,0 µl i.Mune™ Proteinase S
 - NK
 - 10,0 µl i.Mune™ Negative Control
 - 69,0 µl i.Mune™ Lysis Buffer
 - 11,0 µl i.Mune™ Proteinase S
- Tüpleri kapatın ve 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Tüpleri bir termoshaker içinde 56°C'de 15 ± 1 dakika boyunca hafifçe çalkalayarak (900 rpm) inkübe edin.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.

9.3 Bisülfite Dönüşümü

- Lize edilmiş numune/kontrol içeren her bir 2,0 ml'lik tüpe şu reaktifleri ekleyin (9.2):

Sıvı Tam Kan Protokolü	Kurutulmuş Kan Lekesi Protokolü
- 135,0 µl i.Mune™ Bisulfite Solution	- 180,0 µl i.Mune™ Bisulfite Solution
- 45,0 µl i.Mune™ Protection Buffer	- 60,0 µl i.Mune™ Protection Buffer

- Tüpleri kapatın ve 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Tüpleri bir termoshaker'e yerleştirin ve 45 ± 1 dakika boyunca 80°C 'de hafifçe çalkalayarak (900 rpm) inkübe edin.
- Tüpleri termoshaker'den çıkarın.
- Termoshaker'in sıcaklığını 21°C 'ye düşürün ya da daha sonra kullanmak üzere ikinci bir termoshaker'i 21°C 'ye ayarlayın.

9.4 Bağlanma Adımı

Not: i.Mune™ Magnetic Beads süspansiyonunda boncuk süspansiyonunun homojen olması düzgün bir performans için zaruridir. Belirtilen boncuk miktarından sapmalar hatalı sonuçlara yol açabilir. Doğru manyetik boncuk konsantrasyonunu sağlamak için pipetlemeden hemen önce tüp iyice karıştırılmalıdır. Tüpün dibinde tortu görülmemelidir. Pipetleme adımları arasında süspansiyonun homojen olması sağlanmalıdır.

Not: Aşağıdaki adımların bir çeker ocak altında gerçekleştirilmesi önerilir.

- Bisülfite reaksiyonunu içeren 2,0 ml'lik tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Her bir tüpe şu bileşenleri ekleyin:

Sıvı Kan Protokolü	Kurutulmuş Kan Lekesi Protokolü
- 400,0 µl i.Mune™ Binding Buffer - 200,0 µl 2-Propanol (İzopropanol $\geq 99,8$, p.a.)	- 580,0 µl i.Mune™ Binding Buffer - 380,0 µl 2-Propanol (İzopropanol $\geq 99,8$, p.a.)
	- Aşağı yukarı pipetleyerek kısaca karıştırın. - Sıvıyı yeni bir 2,0 ml tüpe aktararak filtre pançlarından ayırın. Not: Yeni tüpleri orijinal tüplerle aynı numune kimliği ile işaretlediğinizden emin olun.

- 10 µl i.Mune™ Magnetic Beads (yeni süspanse edilmiş) ekleyin.
- Tüpleri kapatın ve 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Termoshaker 21°C 'ye ulaşana kadar bekleyin.
- Tüpleri termoshaker'e yerleştirin ve 7 ± 1 dakika boyunca 21°C ve 1400 rpm'de inkübe edin.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Termoshaker'in sıcaklığını 65°C 'ye düşürün ya da daha sonra kullanmak üzere ikinci bir termoshaker'i 65°C 'ye ayarlayın.
- Tüpleri 10 - 30 saniye süreyle bir manyetik rafın üzerine yerleştirin.
- 100 - 1000 µl'lik bir pipet kullanarak, tüpler halen manyetik rafta iken manyetik boncukları çıkarmamaya dikkat ederek mümkün olduğunca çok sıvı alın.

- Tüpler halen manyetik rafta iken, manyetik boncukları çıkarmamaya dikkat ederek kalan sıvıyı 10 - 100 µl pipetle alın.

9.5 İlk Yıkama

- Yıkama ve vorteksleme için numune rafını mıknatıstan çıkarın.
- Her bir tüpe 500,0 µl i.Mune™ Wash Buffer 1 ekleyin.
- Tüpleri kapatın ve 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Tüpleri 10 - 30 saniye süreyle bir manyetik rafın üzerine yerleştirin.
- 100 - 1000 µl'lik bir pipet kullanarak, tüpler halen manyetik rafta iken manyetik boncukları çıkarmamaya dikkat ederek mümkün olduğunca çok sıvı alın.
- Tüpler halen manyetik rafta iken, manyetik boncukları çıkarmamaya dikkat ederek ikinci bir kez tüm numunelerde kalan sıvıyı 10 - 100 µl pipetle alın.

9.6 İkinci Yıkama

- Yıkama ve vorteksleme için numune rafını mıknatıstan çıkarın.
- Her bir tüpe 500,0 µl i.Mune™ Wash Buffer 2 ekleyin.
- Tüpleri kapatın ve 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Tüpleri 10 - 30 saniye süreyle bir manyetik rafın üzerine yerleştirin.
- 100 - 1000 µl'lik bir pipet kullanarak, tüpler halen manyetik rafta iken manyetik boncukları çıkarmamaya dikkat ederek mümkün olduğunca çok sıvı alın.
- Tüpleri tekrar kısaca santrifüjleyin.
- Tüpleri 10 - 30 saniye süreyle bir DynaMag™-2 manyetik rafın üzerine yerleştirin.
- 10 - 100 µl'lik bir pipet kullanarak, tüpler halen manyetik rafta iken manyetik boncukları çıkarmamaya dikkat ederek kalan sıvının mümkün olduğu kadar çoğunu alın.

9.7 Kurutma

Not: Aşırı kurutma bisülfitle dönüştürülmüş DNA geri kazanımını azaltabileceğinden kurutma süresini veya sıcaklığını artırmayın.

- Tüpün kapağını açın.
- Açık tüpleri termosshaker'e yerleştirin.
- Boncukları çalkalamadan 65°C'de 10 ± 1 dakika kurumaya bırakın.

9.8 Elüsyon

Not: Eluatın berrak olduğundan emin olun. Kahverengimsi renk yıkama işleminin yetersiz olduğunu gösterir ve qPCR'yi olumsuz etkileyebilir. Kahverengimsi eluat içeren numuneleri atın ve dönüştürme ve hazırlama işlemlerini tekrarlayın.

- Tüpleri manyetik olmayan bir rafa aktarın.
- Her bir tüpe 30,0 µl i.Mune™ Elution Buffer ekleyin.
- Tüpleri kapatın.
- Tüpleri 5 - 10 saniye boyunca vorteksleyerek manyetik boncukları yeniden süspanse edin.
- Tüpleri bir termosshaker'de 65°C'de 7 ± 1 dakika 1400 rpm'de inkübe edin.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Tüpleri 10 - 30 saniye süreyle bir manyetik rafın üzerine yerleştirin.

- 10 - 100 µl'lik bir pipet kullanarak, her bir tüpün tüm eluatını (~ 30 µl DNA çözeltisi) yeni 0,2 ml'lik tüplere aktarın.

9.9 Bisülfite dönüştürülmüş (bis)DNA'nın saklanması

Saflaştırılmış bisDNA hemen kullanılmayacaksa materyali 2°C ila 8°C'de 24 saate kadar ya da -30°C ila -15°C arasında 3 güne kadar saklayın.

9.10 PCR Hazırlığı

Not: Pipetleme şemasında geriye dönük olarak değişiklik yapılması durumunda (örn. numune adı düzeltilmesi), pipetleme şeması yeniden oluşturulmalı ve LightCycler'a aktarılmalıdır.

Not: Başlamadan önce Epimune Veri Analizi Aracının en güncel sürümünü kullandığınızdan emin olun ("Veri Analiz Aracı"; IM-APP-02).

Not: Doğru numune türünü seçtiğinizden emin olun (Sıvı kan veya Kurumuş Kan Lekeleri).

9.10.1 Pipetleme şemasının hazırlanması

- Veri Analiz Aracını açın.
- Numune türünü seçin ve "Generate sample table" (*Numune tablosu oluştur*) seçeneğini tıklayın.
- Yeni açılan sekmede numunelerinizi adlandırın (standartların ve kontrollerin konumu değiştirilemez).
- Her numuneye bir yorum eklenebilir.
- Reaktif lot numaralarını girin.
- "Save & Export" (*Kaydet ve Dışarı Aktar*) seçeneğini tıklayın. Bu işlem çalışma sayfasını kaydedecek ve pipetleme şemasının yanı sıra LC Numune giriş tablosunu (.txt dosyası) dışarı aktaracaktır.
- Bir klasör seçin ve benzersiz bir deney adı girin ve "ok"i tıklayın.
- Açılır pencereyi onaylayarak pipetleme şemasını pdf'ye aktarın ve pipetleme şemasını yazdırın.

9.10.2 Standartların Hazırlanması

- i.Mune™ Standard 1 ile i.Mune™ Standard 2'yi 15°C ila 30°C'de eritin.
- Çözüldükten sonraki 60 dakika içerisinde işleme devam edin.

9.10.3 PCR Reaksiyon Karışımlarının hazırlanması

Not: PCR Reaksiyon Karışımlarını hazırladıktan hemen sonra kullanın. Saklamayın.

- i.Mune™ PCR Mix ve i.Mune™ Primermix'ler 1-6'yı eritin.
- 5 - 10 saniye vorteksleyin, tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- Veri analiz aracı tarafından oluşturulan pipetleme şemasındaki tabloya göre PCR Reaksiyon Karışımları 1 ila 6'yı hazırlayın.
- PCR Reaksiyon Karışımlarını 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Damlaları kapaktan çıkarmak için PCR Reaksiyon Karışımlarını kısaca santrifüjleyin.

9.10.4 PCR Plakalarının Hazırlanması

Not: PCR Reaksiyon Karışımlarını pipetlemek için ayarlanabilir bir aralıkta çoklu alikot yapabilen bir elektronik pipet kullanılması önerilir.

Not: İşlenmiş numuneleri ve kontrolleri pipetlemek için ultra homojen yüzeye sahip pipet uçlarının kullanılması önerilir (örn. ep Dualfilter T.I.P.S. LoRetention).

- PCR plakasını hazırlayın. Düzen, veri analiz aracı tarafından oluşturulan pipetleme şemasında gösterilir (bkz. 9.10).
- Bisülfite dönüştürülmüş DNA'yı 5-10 saniye vorteksleyerek kısaca karıştırın ve tüpleri kısaca santrifüjleyin.

- 3,0 µl
 - i.Mune™ Standard 1 (STD1) ve i.Mune™ Standard 2'yi (STD2)
 - işlenmiş i.Mune™ Positive Control (PK) ve i.Mune™ Negative Control'ü (NK)
 - işlenmiş numuneyi (bisülfitle dönüştürülmüş DNA)

Veri Analizi Aracı tarafından oluşturulan pipetleme şemasına göre 96 kuyucuklu plakaya aktarın.

- İlgili kuyucukların her birine 7,0 µl PCR Reaksiyon Karışımı ekleyin.
- Plakayı dikkatlice yapışkanlı folyo ile yalıtın.
- Plakayı bir plaka santrifüjünde 20 saniye kısaca santrifüjleyin.

10 Roche LightCycler 480 Instrument II cihazı ile Analiz

10.1 Plakanın Yüklenmesi

Not: Tanımlanan çevrim ve analiz ayarlarıyla birlikte bir şablon dosyasının (*.ixo) kaydedilmesi önerilir.

- LightCycler 480II cihazını devreye alın.
- LightCycler 480 yazılımını başlatın.
- Genel bakış ekranından "New Experiment"i (*Yeni Deney*) seçin.
- Deneyi aşağıdaki Tablo 7'de ayrıntıları verilen PCR programı parametrelerine göre tanımlayın.
- "Sample Editor"u (*Numune Düzenleyici*) tıklayın.
- "Import"u (*İçeri Aktar*) tıklayın ve Veri Analizi Aracı ile oluşturulan .txt dosyasını seçin.
- "Scan File" (*Dosya Tara*) düğmesine basın ve ✓ düğmesine basın.
- "Experiment" (*Deney*) seçeneğine geri dönün.
- Tepsiyi açın.
- PCR plakasını çerçeveye yerleştirin (A1 konumu sol üst köşeye bitişir), plakanın çerçeveye tam olarak oturduğundan emin olun. Tepsiyi kapatın.
- "Start Run" (*Yürütümü Başlat*) düğmesine basın
- Yürütümü kaydetmeniz istenecektir. Veri Analizi Aracındaki yürütüm kimliğini kullanın.
- ✓ Düğmesine basın ve yürütümü başlatın.

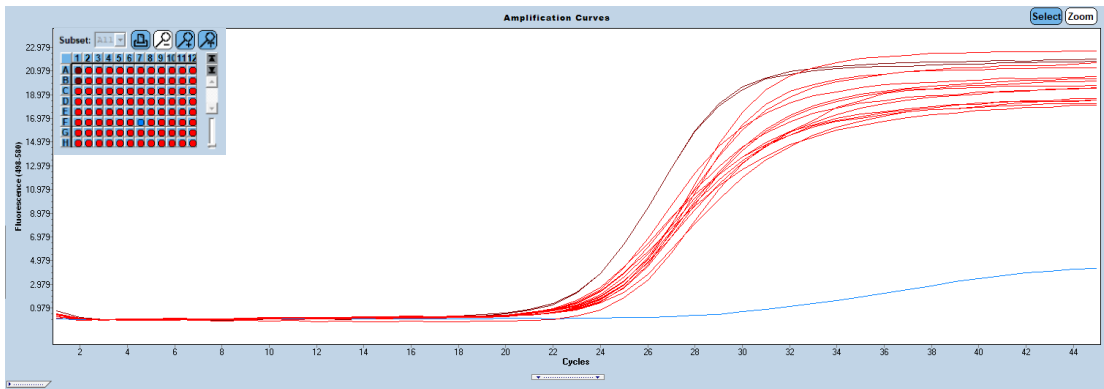
Tablo 7: LightCycler 480 Instrument II için Standart PCR Programı.

Yürütüm Protokolü Düzeni				
Tespit Formatı	4 Renkli Hidroliz Probu			
Reaksiyon hacmi	10 µl			
Program Parametreleri	Denatürasyon	Çevrim		Soğutma
Analiz Modu	Yok	Kantifikasyon		Yok
Döngüler	1	45		1
Segment	1	1	2	1
Hedef [°C]	95	95	61	42
Tutma [ss:dd:ss]	00:35:00	00:00:15	00:01:00	00:00:05
Eğim Oranı [°C/s]*	4,4	4,4	2,2	2,2
Alım Modu	Yok	Yok	Tek	Yok

10.2 Analiz Ayarları

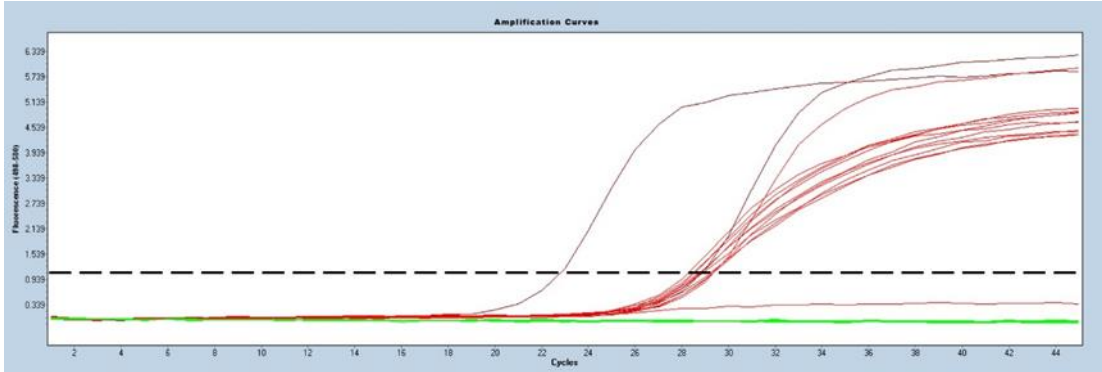
- LightCycler 480 Temel Yazılım Modülü çubuğunda "Analysis" (Analiz) üzerine tıklayarak "Analysis Overview" (Analize Genel Bakış) penceresini açın.
- "Abs Quant/2nd Derivative Max" (Mutl Kant/2. Türev Maks) seçeneğini seçin.
- "All samples" (Tüm numuneler) alt setini seçin.
- Analizi başlatmak için ✓ tuşuna basın; yeni bir pencere açılacaktır.
- Bu pencerenin altındaki parametreleri "High confidence" (Yüksek güven) olarak ayarlayın ve FAM filtresini (498-580) seçin.
- Verileri analiz etmek için "Calculate" (Hesapla) düğmesine tıklayın.
- Ham verileri .txt dosyası olarak dışarı aktarmak için, "Samples" (Numuneler) tablosuna sağ tıklayın ve "Export table" (Tabloyu dışarı aktar) seçeneğini seçin. Tüm kuyucukların seçilmiş olduğundan emin olun.
- Sağ üst köşedeki "+" işaretine tıklayarak "Analysis Overview" penceresini açın.
- "Abs Quant/2nd Derivative Max" seçeneğini seçin.
- "All samples" alt setini seçin.
- Analizi başlatmak için ✓ tuşuna basın; yeni bir pencere açılacaktır.
- Bu pencerenin altındaki parametreleri "High confidence" olarak ayarlayın ve kuyu içi kontroller için Red610 (533-610) filtresini seçin.
- Verileri analiz etmek için "Calculate" düğmesine tıklayın.
- Ham verileri .txt dosyası olarak dışarı aktarmak için, "Samples" tablosuna sağ tıklayın ve "Export table" seçeneğini seçin. Tüm kuyucukların seçilmiş olduğundan emin olun.

Not: "Include" (Dâhil Et) üzerine çift tıklayıp işareti kaldırarak FAM (498 - 580) filtresinde veya Red610 (533 - 610) filtresinde mavi (güvenilmez) işaretli numuneleri ve kontrolleri analizden hariç tutun (aşağıdaki Şekil 1'e bakın).



Şekil 1: LightCycler yazılımı tarafından bir eğrinin "güvenilmez" olarak sınıflandırılması.

- "Include" üzerine çift tıklayıp işareti kaldırarak FAM Filtresinde (498 - 580) veya Red 610 Filtresinde (533 - 610) floresans sinyali 1'in altında olan numuneleri ve kontrolleri analizden hariç tutun (aşağıdaki Şekil 2'ye bakın).



Şekil 2: Floresansı 1'in altında olan eğri. Kesikli, siyah çizgi floresans kesme değerini temsil eder.

Not: FAM filtresinde numuneleri hariç tutarsanız, Red610 filtresi analiz edildiğinde bunları tekrar dâhil ettiğinizden emin olun.

10.3 Veri Analizi

- Veri Analizi Aracını açın.
- Ana sekmede "Import & analyse LC Results" (*LC Sonuçlarını İçeri Aktar ve Analiz Et*) seçeneğine tıklayın.
- Açılır penceredeki talimatları izleyin ve Filtre 1'den, yani Filtre Comb FAM'dan (498 - 580) ham verileri içeri aktarın.
- Bunun ardından, açılır penceredeki talimatları izleyin ve Filtre 2'den, yani Filtre Comb Red610'dan (533 – 610) ham verileri içeri aktarın.
- Tüm sonuçları içeren bir sonuç raporu oluşturulacaktır.

11 Kalite Kontrolü

Kalite kontrol prosedürleri, reaktif performansını izlemek ve test sonuçlarının geçerliliğini sağlamak için tasarlanmıştır. Kontrol sonuçlarının beklenen değerleri vermemesi durumunda sonuçlar rapor edilmez. Her laboratuvar, kendi kalite güvence programının ve akreditasyon kuruluşunun gerekliliklerine uygun olarak kendi laboratuvarları, ilgili düzenleyici kurumlar veya akreditasyon kuruluşları tarafından oluşturulan kılavuzlara ve prosedürlere başvurmaktadır.

Harici kontroller (i.Mune™ Positive Control, i.Mune™ Negative Control), i.Mune™ Check Kit (IM-CHECK-01) kapsamına dâhildir ve i.Mune™ Prep (IM-PREP-01) ve i.Mune™ TBNK Amp (IM-AMP-01) ile kullanılmak için tasarlanmıştır. Her hedefle birlikte bir dâhili kontrol amplifiye edilir (kuyucuk içi kontrol) ve i.Mune™ TBNK Amp'in (IM-AMP-01) bir parçasıdır.

11.1 Yürütüm Geçerliliği - Harici Kontroller: i.Mune™ Check Kit (IM-CHECK-01)

i.Mune™ TBNK test kiti kullanılarak numuneler test edilirken her yürütüme bir i.Mune™ Positive (PK) ve bir i.Mune™ Negative Control (NK) dâhil edilmelidir. Bu kontroller, test sonuçlarının geçerliliğini sağlamak için test iş akışının başarılı bir şekilde yürütülmesini izler.

Her bir kontrol/standart için kriterler karşılandığında bir yürütüm geçerli kabul edilir. Bu, Veri Analizi Aracında otomatik olarak kontrol edilir.

Eksik amplifikasyon eğrisi veya düşük floresans yoğunluğu nedeniyle LightCycler yazılımı tarafından tek bir test için Cp değeri hesaplanmazsa, kontrol "invalid (no signal)" (*geçersiz (sinyal yok)*) olarak belirtilecektir.

i.Mune™ Positive Control ve/veya i.Mune™ Negative Control ve/veya i.Mune™ Standard 1 ve/veya i.Mune™ Standard 2 geçersizse, kontrollerle birlikte işlenen numunelerin verileri yorumlanamaz ve "invalid" (*geçersiz*) olarak işaretlenir. Bu durumda, lütfen Düzeltici Faaliyetler bölümüne bakın (bkz. bölüm 11.3).

11.2 Numune Kabulü ve Dâhili Kontrol

Her bir PCR kuyucuğunda hedefle birlikte bir dâhili kontrol çoğaltılır. Bu kuyucuk içi kontrol numune kalitesini, numune hazırlığını ve numunenin yeterli DNA konsantrasyonunu izler.

Dâhili kontrolün sonucu yeterli dönüştürme, saflaştırma ve tek PCR'ye DNA girişi gösteriyorsa ve bireysel hücre tipine özgü tahlilin Cp değeri miktar belirleme alt sınırının üzerindeyse, ilgili numunenin sonucu sonuç raporunda belirtilecektir. Dâhili kontrol kabul edilen aralığın dışındaysa ve dolayısıyla bir proses hatasına işaret ediyorsa, bireysel numune "failed" (*başarısız*) olarak işaretlenecektir.

Eksik amplifikasyon eğrisi veya düşük floresans yoğunluğu nedeniyle LightCycler yazılımı tarafından tek bir test için Cp değeri hesaplanmazsa, numune "failed (no signal)" (*başarısız (sinyal yok)*) olarak belirtilecektir.

Her iki durumda, lütfen Düzeltici Faaliyetler bölümüne bakın (bkz. bölüm 11.3). Bu değerlendirme, Veri Analizi Aracı tarafından otomatik olarak yapılır.

Bireysel testin Cp değeri kabul edilen aralığın dışındaysa (LOQ'nun altında) ancak yeterli miktarda dâhili kontrol kopyasının yanı sıra yeterli miktarda housekeeping (referans) gen kopyası tespit edilirse, numune "low target cell content" (*düşük hedef hücre içeriği*) olarak belirtilecektir. Bu durumda, yeterli lökosit tespit edilmesine rağmen hedef hücre tipi miktar belirleme sınırının altındadır. Bu durum büyük olasılıkla test edilen hastanın klinik durumundan kaynaklandığından, tekrarlanan analizler önerilmemektedir (ayrıca bkz. Bölüm 12 "Prosedürün Sınırlamaları").

11.3 Düzeltici Faaliyetler

Kontroller veya standartlar (ya da her ikisi) tek bir hücre tipine özgü deney için geçerlilik kriterlerini karşılamıyorsa, bu deney için numune test sonuçları "invalid" olarak kabul edilecek ve rapor edilmeyecektir. i.Mune™ Positive Control ve i.Mune™ Negative Control ve numuneleri içeren tüm deney tekrarlanmalıdır. İkinci kez de geçersiz sonuçlar elde edilirse, yardım için lütfen Epimune Müşteri Desteği ile iletişime geçin.

Kabul kriterlerini (dâhili kontrol ve deneye özgü Cp aralığı) karşılamayan bir numune için yalnızca o tek PCR sonucu "failed" olarak değerlendirilir ve numunenin sonucu raporlanmaz.

Her laboratuvar, test sonuçlarını raporlamadan önce kendi kalite güvence programına göre düzeltici faaliyetler gerçekleştirmelidir.

12 Prosedürün Sınırlamaları

- i.Mune™ TBNK herhangi bir klinik tanı ve/veya tedavi kararı için tek gösterge olarak kullanılmak üzere tasarlanmamıştır.
- i.Mune™ TBNK, yalnızca i.Mune™ Prep, i.Mune™ TBNK Amp ve i.Mune™ Check kombinasyonu için doğrulanmıştır. Bu kitler ve bileşenler diğer üreticilerin ürünleriyle değiştirilemez veya ikame edilemez.
- i.Mune™ TBNK, K₂EDTA kan alma tüplerinde toplanan sıvı venöz kan ve filtre kağıdında toplanan kapiller kan için doğrulanmıştır. Bu testi diğer klinik numune türleriyle veya diğer kan alma tüpleriyle ya da önerilenden başka filtre kağıtlarıyla kullanmayın.
- i.Mune TBNK referans aralıkları 18-71 yaş arası bir Kafkas popülasyonunda oluşturulmuştur. Diğer etnik kökenler veya yaş grupları için referans aralıkları verilen aralıklardan farklı olabilir.
- i.Mune™ TBNK yalnızca Roche LightCycler 480 Instrument II cihazı ve belirtilen yazılım sürümü ile kullanım için doğrulanmıştır. Diğer cihazlar ve yazılım sürümleri ile kullanmayın.
- Bu testin kullanımı, PCR testlerini gerçekleştirme konusunda deneyimli ve eğitimli personel ile sınırlıdır. İyi teknik zaruridir ve bu talimatlarda verilen talimatlara uyulmaması hatalı sonuçlar doğurabilir.
- Bir bireydeki öngörülemez polimorfizmler yanlış sonuçlara yol açabilir. Deney oluşturulurken bilinen polimorfizmler dikkate alınmıştır.
- Bazı klinik durumlar referans aralığının dışında sonuçlara yol açabilir. Bu tür sonuçlar "low target cell content" olarak rapor edilir. Bu durumlar bağışıklık sistemini baskılayıcı tedavileri, kemoterapileri veya immünolojik bozuklukları kapsayabilir.
- Antihipertansif ilaç grubuna dâhil edilebilecek ilaçların alımı, Doğal Öldürücü Hücrelerin (NKC) mutlak miktar tayini (hücre/μl) için referans aralığının dışında sonuçlara yol açabilir.
- Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların alımı, Lökositlerin, CD3 Hücrelerinin, B lenfositlerin (BLC) ve Doğal Öldürücü Hücrelerin (NKC) mutlak miktar tayini (hücre/μl) için referans aralığının dışında sonuçlara yol açabilir.

13 Performans Özellikleri

13.1 Yeniden Üretilirlik ve Tekrarlanabilirlik

13.1.1 Sıvı Venöz Tam Kan

CLSI'nin "EP05-A3 Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Kesinliğinin Değerlendirilmesi" belgesine göre, i.Mune TBNK ürününün tekrarlanabilirliğinin yanı sıra merkez içi kesinliğini belirlemek üzere, tek merkezli bir çalışma gerçekleştirildi. Varyasyon kaynağı olarak, günler ve yürütümden yürütüme varyasyon seçilen tasarımla analiz edildi (10 gün x günde 2 yürütüm x numune konsantrasyonu başına 4 tekrar x 3 numune konsantrasyonu).

Ayrıca, i.Mune TBNK ürününün tekrar üretilebilirliğini belirlemek için çok merkezli bir çalışma gerçekleştirildi. Varyasyon kaynağı olarak, günler, merkezler, operatör ve cihaz seçilen tasarımla analiz edildi

(2 merkez x 5 gün x günde 2 yürütüm x 4 kopya x 3 numune konsantrasyonu).

Tablo 8: Üç (3) farklı ölçülen büyüklük (sıvı venöz tam kan) için tek merkezli çalışmadan elde edilen sonuçlar

Repeatability			
	Sample Input: 40 µl venous whole blood	Sample Input: 30 µl venous whole blood	Sample Input: 20 µl venous whole blood
%CV for CD3 [cells/µl]	7,86	8,51	6,30
%CV for CD4 [cells/µl]	9,40	7,08	9,04
%CV for CD8 [cells/µl]	9,81	8,98	8,85
%CV for BLC [cells/µl]	11,86	11,91	12,29
%CV for NKC [cells/µl]	7,70	8,25	7,01
%CV for Leukocytes [cells/µl]	10,28	8,85	7,43
%CV for CD3 % of Leukocytes	7,36	6,02	6,98
%CV for CD4 % of Leukocytes	8,79	8,07	7,36
%CV for CD8 % of Leukocytes	12,09	10,36	8,41
%CV for BLC % of Leukocytes	11,70	8,97	10,66
%CV for NKC % of Leukocytes	8,74	7,81	7,19

Within-Laboratory Precision			
	Sample Input: 40 µl venous whole blood	Sample Input: 30 µl venous whole blood	Sample Input: 20 µl venous whole blood
%CV for CD3 [cells/µl]	18,96	19,67	15,22
%CV for CD4 [cells/µl]	16,25	13,75	19,91
%CV for CD8 [cells/µl]	16,41	16,05	15,58
%CV for BLC [cells/µl]	22,69	21,97	22,67
%CV for NKC [cells/µl]	16,50	16,43	16,18
%CV for Leukocytes [cells/µl]	22,34	17,84	19,30
%CV for CD3 % of Leukocytes	11,05	10,41	9,31
%CV for CD4 % of Leukocytes	16,50	12,36	10,52
%CV for CD8 % of Leukocytes	21,35	11,54	12,73
%CV for BLC % of Leukocytes	12,75	12,00	11,48
%CV for NKC % of Leukocytes	11,00	9,68	8,83

[%CV=%DK=Değişim Katsayısı]

Tablo 9: Üç (3) farklı ölçülen büyüklük düzeyi (sıvı venöz tam kan) için çok merkezli çalışmadan elde edilen sonuçlar

Reproducibility			
	Sample Input: 40 µl venous whole blood	Sample Input: 30 µl venous whole blood	Sample Input: 20 µl venous whole blood
%CV for CD3 [cells/µl]	16,32	16,32	16,56
%CV for CD4 [cells/µl]	14,19	15,50	17,30
%CV for CD8 [cells/µl]	19,69	19,14	22,30
%CV for BLC [cells/µl]	20,94	22,61	24,30
%CV for NKC [cells/µl]	19,61	19,18	20,52
%CV for Leukocytes [cells/µl]	18,96	17,45	19,74
%CV CD3 % of Leukocytes	13,39	11,94	10,76
%CV CD4 % of Leukocytes	16,98	15,40	13,34
%CV CD8 % of Leukocytes	17,92	14,58	12,65
%CV BLC % of Leukocytes	17,82	17,99	15,50
%CV NKC % of Leukocytes	18,53	17,27	14,11

[%DK]

Within-Laboratory Precision			
	Sample Input: 40 µl venous whole blood	Sample Input: 30 µl venous whole blood	Sample Input: 20 µl venous whole blood
%CV for CD3 [cells/µl]	13,81	13,55	14,29
%CV for CD4 [cells/µl]	14,19	14,21	14,64
%CV for CD8 [cells/µl]	19,45	16,67	17,97
%CV for [cells/µl]	18,25	20,21	20,27
%CV for [cells/µl]	15,40	15,92	14,84
%CV for Leukocytes [cells/µl]	16,94	16,40	16,79
%CV for CD3 % of Leukocytes	13,15	11,92	10,76
%CV for CD4 % of Leukocytes	15,96	15,40	13,34
%CV for CD8 % of Leukocytes	16,99	14,33	12,24
%CV for BLC % of Leukocytes	17,03	17,71	15,31
%CV for NKC % of Leukocytes	15,59	16,97	13,80

13.1.2 Kurutulmuş Kan Lekesi

Kurutulmuş kan lekeleri (DBS) kullanılarak i.Mune TBNK'nin tekrarlanabilirliğini ve laboratuvar içi kesinliğini belirlemek için, K₂EDTA kan alma tüplerinde toplanmış sıvı venöz tam kan kullanılarak kurutulmuş kan lekeleri numuneleri hazırlandı. Tek merkezli bir çalışmada üç farklı ölçülen büyüklük seviyesi, yani üç farklı kan örneği hacmi, her bir yürütümde dört bağımsız kopya olarak ölçüldü (yürütüm başına toplam 12 numune).

Tablo 10: Üç (3) farklı ölçülen büyüklük düzeyi (DBS) için tek merkezli çalışmadan elde edilen sonuçlar [%DK]

Repeatability				Within-Laboratory Precision			
	Sample Input: 100%	Sample Input: 80%	Sample Input: 60%		Sample Input: 100%	Sample Input: 80%	Sample Input: 60%
%CV for CD3 % of Leukocytes	10,07	13,94	17,44	%CV for CD3 % of Leukocytes	13,05	17,94	19,34
%CV for CD4 % of Leukocytes	5,57	13,15	18,08	%CV for CD4 % of Leukocytes	9,88	15,64	19,20
%CV for CD8 % of Leukocytes	7,11	13,60	19,54	%CV for CD8 % of Leukocytes	9,53	15,42	19,72
%CV for BLC % of Leukocytes	8,21	14,39	22,06	%CV for BLC % of Leukocytes	12,63	20,06	24,09
%CV for NKC % of Leukocytes	7,83	10,86	18,31	%CV for NKC % of Leukocytes	14,69	19,67	20,79

13.2 Doğrusallık

i.Mune TBNK'nin farklı hücre tiplerinde doğrusal sonuçlar (akış sitometrisi ile belirlenen normal aralıkta) üretebildiğini göstermek için, CLSI'nin "EP06 Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi: İstatistiksel Bir Yaklaşım" belgesine göre bir çalışma yapıldı. Buna bağlı olarak, bir K₂EDTA kan alma tüpünde toplanan tam kan örneğinden taze hazırlanmış dilüsyonlar test edildi. Bunun için dokuz farklı ölçülen büyüklük seviyesi, yani dokuz farklı kan örneği hacmi kullanıldı. Tüm ölçülen büyüklük seviyeleri iki bağımsız kopya olarak ölçüldü.

i.Mune TBNK'nin sıvı venöz tam kanın 10 µl ila 40 µl giriş hacmi aralığında ölçülen tüm hücre tipleri için doğrusal sonuçlar sağladığı gösterildi.

13.3 Tayin Sınırı (LoQ)

Miktar tayininin alt sınırını, yani DK <%25 olan tanımlanmış laboratuvar içi kesinlik sınırı ile tespit edilebilen en düşük demetile hedef kopya sayısını belirlemek için CLSI'nin "EP05 Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Kesinliğinin Değerlendirilmesi" belgesine göre bir çalışma gerçekleştirildi.

13.3.1 Sıvı Venöz Tam Kan

Sıvı venöz tam kan numuneleri için LoQ'yu belirlemek üzere, K₂EDTA kan alma tüpünde toplanan bir tam kan numunesinden taze hazırlanmış dilüsyonlar test numuneleri olarak kullanıldı. Sekiz farklı ölçülen büyüklük seviyesi, yani sekiz farklı kan örneği hacmi kullanıldı. Tüm ölçülen büyüklük seviyeleri her yürütümde üç bağımsız kopya olarak ölçüldü (yürütüm başına toplam 24 numune). Her bir deney için, her bir hücre tipinde 70 kopyanın altında sonlu bir miktar tayini alt sınırı belirlendi.

13.3.2 Kurutulmuş Kan Lekesi

Filtre kağıdında kurutulmuş kapiller tam kan numunelerinin LoQ'sunu belirlemek için, bir K₂EDTA kan alma tüpünde toplanan bir tam kan numunesinden kurutulmuş kan lekeleri (DBS) hazırlandı. Altı farklı ölçülen büyüklük düzeyi kullanıldı, yani kurutulmuş kan lekelerini hazırlamak için altı farklı K₂EDTA kan dilüsyonu kullanıldı. Beklenen LoQ ölçülen büyüklük seviyeleri çevresinde ölçülen büyüklük seviyeleri ve, sağlam bir tahmini kolaylaştırmak için, beklenen LoQ'nun altında veya üstünde ek seviyeler belirlendi. Tüm ölçülen büyüklük seviyeleri her yürütümde beş bağımsız kopya olarak ölçüldü (yürütüm başına toplam 30 numune). Her bir deney için, her bir hücre tipinde 80 kopyanın altında sonlu bir miktar tayini alt sınırı belirlendi.

13.4 Güvenilirlik

13.4.1 Sıvı Venöz Tam Kan

K₂EDTA kan alma tüplerinde 113 sıvı venöz tam kan örneği toplandı. Yürütüm başına 8 numuneden oluşan setlerle analiz gerçekleştirildi. Test edilen klinik numunelerin %99'unda (113 numuneden 112'si) kantitatif bir sonuç elde edildi.

13.4.2 Kurutulmuş Kan Lekesi

113 donörden filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş kapiller tam kan numuneleri toplandı ve yürütüm başına 8 numunelik setler halinde analiz edildi. 4 numune, numune materyali miktarı yetersiz olduğu için dışlandı. Test edilen klinik numunelerin %99'unda (109 numuneden 108'si) kantitatif bir sonuç elde edildi.

13.5 Etkileşim

K₂EDTA kan alma tüplerinde toplanan ve kan numunelerinde sıklıkla bulunan maddeler eklenen tam kan numuneleriyle yapılan testler, test performansı üzerinde herhangi bir etki göstermedi (CLSI'nin EP 037 Klinik Kimyada Etkileşim Testi belgesine göre). Aşağıdaki etkileşim maddeleri ve konsantrasyonları test edildi: Bilirubin (0,4 mg/ml), Hemogloblin (10 mg/ml), Trigliseritler (15 mg/ml) ve Protein (İnsan Serum Albümini) (150 mg/ml).

13.6 Klinik Performans

13.6.1 Sıvı Venöz Tam Kan

13.6.1.1 Akış Sitometrisi ile Korelasyon

Klinik performans DIN EN 13612 normuna göre değerlendirildi. Bunun için ileriye yönelik olarak, kendi beyanıyla sağlıklı donörlerden alınan 113 sıvı venöz tam kan örneği K₂EDTA kan alma tüplerinde toplandı. Bir (1) test numunesi dışında, i.Mune™ TBNK ile analiz edilen 112 test numunesinin epigenetik verileri, her bir deney için Spearman korelasyon katsayısı (Spearman r) kullanılarak akış sitometrik verileriyle karşılaştırıldı (% ve hücre/μl). Hesaplanan Spearman r Tablo 11'de görülebilir.

Tablo 11 Akış sitometrisi verileriyle (sıvı venöz tam kan) karşılaştırmalı olarak her bir epigenetik deney için Spearman'ın sıra korelasyon katsayısına (Spearman r) ve p değerine genel bakış.

Deney	Spearman r	p değeri
CD3 hücreleri/μl	0,82	<0,0001
CD4 hücreleri/μl	0,70	<0,0001
CD8 hücreleri/μl	0,55	<0,0001
BLC hücreleri/μl	0,79	<0,0001
NKC hücreleri/μl	0,70	<0,0001
Lökositler/μl	0,70	<0,0001
Lökositlerin CD3 %'si	0,85	<0,0001
Lökositlerin CD4 %'si	0,76	<0,0001
Lökositlerin CD8 %'si	0,53	<0,0001
Lökositlerin BLC %'si	0,86	<0,0001
Lökositlerin NK %'si	0,78	<0,0001

13.6.1.2 Referans Aralıkları

i.Mune™ TBNK ile analiz edilen 112 sıvı venöz kan numunesinin sonuçlarına dayanarak (bkz. 13.6.1.1.) kendi beyanıyla sağlıklı denekler (18 ila 71 yaş; kadın ve erkek) için referans aralıkları, her parametre için alt ve üst sınır kullanılarak, 2,5 ila 97,5 persentil uygulanarak tanımlandı.

Tablo 12 Kendi beyanıyla sağlıklı denekler için tanımlanmış referans aralıkları [hücre/μl ve Lökosit %'si olarak] (sıvı venöz tam kan)

	Lökositler [hücre/μl]	CD3 [hücre/μl]	CD4 [hücre/μl]	CD8 [hücre/μl]	BLC [hücre/μl]	NKC [hücre/μl]
Alt Sınır	4299	1026	723	172	213	163
Üst Sınır	12248	2965	1519	653	661	751
		CD3 [%]	CD4 [%]	CD8 [%]	BLC [%]	NKC [%]
Alt Sınır		13,38	7,90	2,03	2,42	2,26
Üst Sınır		45,11	26,81	10,12	9,93	9,03

13.6.2 Kurutulmuş Kan Lekesi

13.6.2.1 Referans Aralıkları

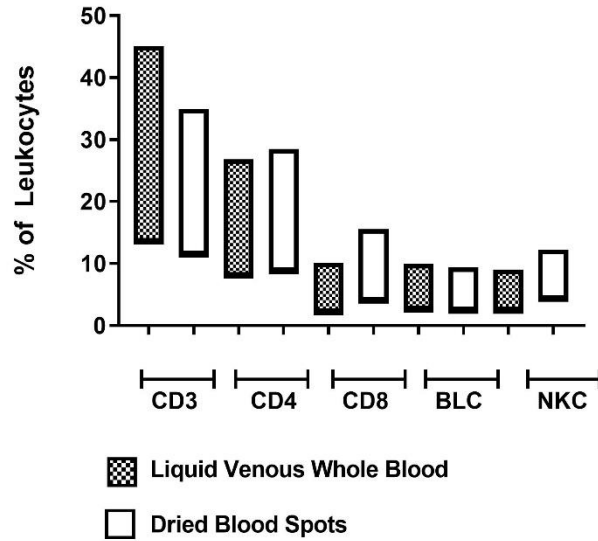
Kendi beyanıyla sağlıklı deneklerden (18 ila 71 yaş; kadın ve erkek) ileriye yönelik olarak 108 kapiller tam kan örneği toplandı. Kapiller kan filtre kağıdı üzerinde kurutuldu ve i.Mune™ TBNK ile analiz edildi. Referans aralıkları, her bir parametre için alt ve üst sınır kullanılarak 2,5 ila 97,5 persentil uygulanarak tanımlandı.

Tablo 14 Kendi beyanıyla sağlıklı denekler için tanımlanmış referans aralıkları [Lökosit %'si olarak] (DBS)

	CD3 [%]	CD4 [%]	CD8 [%]	BLC [%]	NKC [%]
Alt Sınır	11,32	8,67	3,90	2,28	4,18
Üst Sınır	34,95	28,49	15,56	9,36	12,21

13.6.3 Referans Aralıklarının Karşılaştırılması

Kendi beyanıyla sağlıklı bireylerin sıvı venöz tam kan numuneleri ve filtre kağıdında kurutulmuş kapiller tam kan numuneleri (DBS) için referans aralıkları karşılaştırıldı. Karşılaştırma Şekil 3'te canlandırılmıştır.



Şekil 3 Sıvı venöz tam kan numuneleri ile filtre kağıdında kurutulmuş kapiller tam kan numunelerinin (Kurutulmuş Kan Lekesi) referans aralıklarının [Lökosit %'si] karşılaştırması

Simgelerin Anlamı

 İn Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz

 Kullanma Talimatlarına Başvurun

 Katalog Numarası

 Parti kodu

 Son kullanma tarihi

 Üretici

 Sıcaklık sınırı

 Pozitif Kontrol

 Negatif Kontrol

 Test Sayısı

14 Referanslar

- 1 Aluri J, et al. Clinical, Immunological, and Molecular Findings in 57 Patients With Severe Combined Immunodeficiency (SCID) From India. *Front Immunol*. 2019 Feb 4;10:23
- 2 Ford N, et al. The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. *Curr Opin HIV AIDS*. 2017 Mar;12(2):123-128
- 3 Omana-Zapata I, et al. Accurate and reproducible enumeration of T-, B-, and NK lymphocytes using the BD FACSLytic 10-color system: A multisite clinical evaluation. *PLoS One*. 2019 Jan 28;14(1):e0211207
- 4 Riley RS. Laboratory evaluation of the cellular immune system. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 23rd ed. St Louis, MO: Elsevier; 2017:chap 45
- 5 Hallek M, et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5446-56
- 6 Baron U *et al.*, Epigenetic immune cell counting in human blood samples for immunodiagnostics. *Sci Transl Med*. 2018 Aug 1;10 (452).
- 7 M. Blom, L. Vissers, J. Schulze, J. Werner, M. Van der Burg; EPIGENETIC IMMUNE CELL COUNTING AS A SECOND TIER TEST IN NEWBORN SCREENING FOR SCID; 19th Biennial Meeting of The European Society of immunodeficiencies (ESID); 14-17 Oct 2020, Oral Presentation

15 İletişim Bilgileri

Sorularınız, bilgi talebiniz veya Müşteri Desteği için lütfen aşağıdaki yollardan biri üzerinden Epimune ile iletişime geçin:

Müşteri Desteği support@epimune-dx.com
+49 30 23 59 32 83

Epimune GmbH
Rudower Chaussee 29
12489 Berlin, Almanya

16 Alıcıya Notlar

i.Mune™, Epimune GmbH'nin ABD, Avrupa ve diğer seçili ülkelerde tescilli ticari markasıdır. Burada yer alan diğer tüm ticari markalar, markalar ve isimler ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.

Roche LightCycler 480 Instrument II, Roche'un tescilli ticari markasıdır; DynaMag™, Life Technologies Corporation'ın ticari markasıdır; ROX™ ve FAM™, Applied Biosystems Corporation'ın tescilli ticari markalarıdır; BD Vacutainer®, Becton Dickinson Inc./Corporation'ın tescilli ticari markasıdır; Thermomixer®, Research®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S.®, Combitips Advanced®, Repeater® Plus, Research® Plus, Eppendorf AG'nin tescilli ticari markalarıdır; MS-Excel®, Microsoft'un tescilli ticari markasıdır