

Kullanma Talimatları

i.Mune® NEO

i.Mune® Prep (IM-PREP-01)

i.Mune® NEO Amp (IM-AMP-03-1) or

i.Mune® NEO Amp Lite (IM-AMP-03-2) or

i.Mune® NEO Amp CD3 (IM-AMP-03-3)

i.Mune® NEO Check (IM-CHECK-03)

i.Mune® NEO Analysis Tool (IM-APP-03)

Önemli!

Yalnızca Kullanma Talimatlarının güncel sürümünü kullanın.

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



IFU 005 TR, versiyon 00, telif hakkı © 20 Şubat 2023, Epimune GmbH



IM-PREP-01, IM-AMP-03-1, IM-AMP-03-2, IM-AMP-03-3, IM-CHECK-03



Epimune GmbH, Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin, Almanya

İçindekiler

1	Adı ve Kullanım Amacı.....	3
2	Özet ve Açıklamalar.....	3
3	Prosedürün Esasları.....	3
4	Önlemler ve Güvenlik.....	4
5	Sağlanan Malzemeler	5
6	Saklama ve Stabilite	7
6.1	<i>i.Mune Prep</i>	<i>7</i>
6.2	<i>i.Mune NEO Amp/ i.Mune NEO Amp Lite/ i.Mune NEO Amp CD3.....</i>	<i>7</i>
6.3	<i>i.Mune NEO Check.....</i>	<i>7</i>
7	Gerekli Olan, Ancak Teslimat Kapsamına Girmeyen Malzemeler.....	8
8	Numune Toplama ve İşleme	10
8.1	<i>Kurutulmuş Kan Lekesi</i>	<i>10</i>
9	QuantStudio'nun Kalibrasyon Prosedürü	10
10	Test Prosedürü	10
10.1	<i>Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması</i>	<i>11</i>
10.2	<i>Hücre Lizisi.....</i>	<i>11</i>
10.3	<i>Bisülfid ile Dönüştürme</i>	<i>12</i>
10.4	<i>Bağlanma Adımı.....</i>	<i>12</i>
10.5	<i>İlk Yıkama</i>	<i>13</i>
10.6	<i>İkinci Yıkama</i>	<i>13</i>
10.7	<i>Kurutma.....</i>	<i>13</i>
10.8	<i>Elüsyon</i>	<i>13</i>
10.9	<i>Bisülfitle dönüştürülmüş (bis)DNA'nın saklanması.....</i>	<i>13</i>
10.10	<i>PCR Hazırlığı</i>	<i>14</i>
11	QuantStudio 6 flex Real-Time PCR System ile Analiz	15
11.1	<i>Plakanın Yüklenmesi.....</i>	<i>15</i>
11.2	<i>Analiz Ayarlarını Yürütün (QuantStudio Real-Time PCR Yazılımı).....</i>	<i>17</i>
11.3	<i>Veri Analizi (i.Mune NEO Analiz Aracı)</i>	<i>18</i>
12	Kalite Kontrolü	18
12.1	<i>Yürütüm Geçerliliği - Harici Kontroller: i.Mune NEO Check Kit (IM-CHECK-03)</i>	<i>18</i>
12.2	<i>Numune Kabulü ve Dâhili Kontrol</i>	<i>18</i>
12.3	<i>Düzeltilici Faaliyetler</i>	<i>19</i>
13	Performans Özellikleri	19
13.1	<i>Yeniden Üretilirlik ve Tekrarlanabilirlik.....</i>	<i>19</i>
13.2	<i>Doğrusallık.....</i>	<i>20</i>
13.3	<i>Tayin Sınırı (LoQ)</i>	<i>20</i>
13.4	<i>Güvenilirlik.....</i>	<i>20</i>
13.5	<i>Etkileşim</i>	<i>20</i>
13.6	<i>Klinik Performans</i>	<i>21</i>
14	Prosedürün Sınırlamaları	22
15	Simgelerin Anlamı	23
16	Referanslar	23
17	İletişim Bilgileri	24
18	Alıcıya Notlar.....	24

1 Adı ve Kullanım Amacı

i.Mune NEO, toplanan ve filtre kağıdında kurutulmuş kan kapilleri tam kan numunelerinde lenfosit alt gruplarının yüzdelere belirlenmesi için kantitatif bir in vitro tanı testidir.

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 (PCR) kullanır:

Tablo 1: i.Mune NEO Amp kitleri kullanılarak ölçülebilen bağışıklık hücresi tipleri.

	i.Mune NEO Amp (IM-AMP-03-1)	i.Mune NEO Amp Lite (IM-AMP-03-2)	i.Mune NEO Amp CD3 (IM-AMP-03-3)
T lenfositler (CD3+)	✓	✓	✓
Hafıza Yardımcı T lenfositleri (CD3+CD4+CD45RO+)	✓	✓	✓
B lenfositler (CD19+)	✓	✓	
Doğal Öldürücü lenfositler (CD16+CD56dim)	✓	✓	
Yardımcı T lenfositler (CD3+CD4+)	✓		
Sitotoksik T lenfositler (CD3+CD8+)	✓		

2 Özet ve Açıklamalar

i.Mune NEO testi, yenidoğanlardan alınan kurutulmuş kan lekeleri (DBS) numunelerinde T-, B- ve Doğal Öldürücü (NK) lenfositlerin kantitatif olarak belirlenmesi için tasarlanmıştır. Test, Baron ve ark. (1) tarif ettiği epigenetik bağışıklık hücresi miktarı belirleme yöntemine dayanmaktadır. Baron ve ark., epigenetik immün hücre miktarı belirleme yönteminin yenidoğanların DBS numunelerinde uygulanabilirliğini göstermiştir. Blom ve ark. (2) CD3+ T-hücrelerinin epigenetik immün hücre kantifikasyonunun, yenidoğanlarda Ağır Kombine İmmün Yetmezlik (SCID) taramasında işlem yapılamayan ikincil bulguların ve yanlış pozitif yönlendirmelerin sayısını azaltmak için ikinci aşama testi olarak kullanılabileceğini göstermiştir. i.Mune NEO, bebeklerde lenfositlerin kantitatif olarak belirlenmesinin endike olduğu her ortamda kullanılabilir.

3 Prosedürün Esasları

i.Mune NEO, DNA'yı bisülfitle dönüştürmek ve saflaştırmak (i.Mune Prep) ve bisülfitle dönüştürülmüş hedef DNA'yı gerçek zamanlı bir PCR'da çoğaltmak (i.Mune NEO Amp veya i.Mune NEO Amp Lite veya i.Mune NEO Amp CD3) 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 NEO Check).

Filtre kağıdı üzerinde 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 Applied Biosystems QuantStudio 6 Real-Time PCR System cihazında 96 kuyucuklu bir plakada çok düzeyli 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 NEO, 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 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 kalan reaktifleri yeni açılmış kitlerle birleştirmeyin.
- Kitleri veya kit bileşenlerini belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın.

5 Sağlanan Malzemeler

i.Mune NEO, i.Mune Prep, i.Mune NEO Amp veya i.Mune NEO Amp Lite veya i.Mune NEO Amp CD3, i.Mune NEO Check ve Microsoft Excel® tabanlı bir veri analiz aracından (i.Mune NEO Analiz Aracı) oluşur.

İçerik

Tablo 2: i.Mune Prep (IM-PREP-01) içeriği. Kit 60 ölçüm için yeterli reaktif içerir. Bu, her biri dört (4) numune, bir (1) i.Mune Negative Control (*Negatif Kontrol*) ve iki (2) i.Mune Positive Control (*Pozitif Kontrol*) kapsayan altı (8) 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 3: i.Mune NEO Amp (IM-AMP-03-1) içeriği. Kit 32 numune için yeterli reaktif içerir. Bu, her biri dört (4) numune, bir (1) i.Mune Negative Control ve iki (2) i.Mune Positive Control, bir (1) i.Mune NEO Standard kapsayan sekiz (8) yürütüm için yeterlidir. Primermix'ler (*primer karışımları*) renk kodludur.

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
i.Mune NEO PCR Mix	1 flakon	0,814 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO GAPDH	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO CD3_memCD4	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO B_NK	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO CD4	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO CD8	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C

Tablo 4: i.Mune NEO Amp Lite'in (IM-AMP-03-2) içeriği. Kit 40 numune için yeterli reaktif içerir. Bu, her biri sekiz (8) numune, bir (1) i.Mune Negative Control ve iki (2) i.Mune Positive Control, bir (1) i.Mune NEO Standard kapsayan beş (5) adede kadar yürütüm için yeterlidir. Primermix'ler renk kodludur.

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
i.Mune NEO Lite PCR Mix	1 flakon	0,475 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO GAPDH	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO CD3_memCD4	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO B_NK	1 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C

Tablo 5: i.Mune NEO Amp CD3'ün (IM-AMP-03-3) içeriği. Kit 96 numune için yeterli reaktif içerir. Bu, her biri on altı (16) numune, bir (1) i.Mune Negative Control ve iki (2) i.Mune Positive Control, bir (1) i.Mune NEO Standard kapsayan altı (6) adede kadar yürütüm için yeterlidir. Primermix'ler renk kodludur.

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
i.Mune NEO CD3 PCR Mix	1 flakon	0,597 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO GAPDH	2 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO CD3_memCD4	2 flakon	0,396 ml	-30°C ila -15°C

Tablo 6: i.Mune NEO Check'in (IM-CHECK-03) içeriği. Kit 12 adede kadar yürütüm için yeterli reaktif içerir. Bileşenler renk kodludur.

Reaktif	Kaplar	Flakon Başına Hacim	Saklama Sıcaklığı
i.Mune NEO Negative Control	2 flakon	0,094 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO Positive Control	2 flakon	0,189 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO Standard	2 flakon	0,142 ml	-30°C ila -15°C
i.Mune NEO Quantifier (Miktar Belirleyici)	2 flakon	0,057 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: subtilisin 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 Bağlanma Tamponu: 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.



TEHLİKE



UYARI

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.



UYARI

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

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 NEO PCR Mix, i.Mune NEO Lite PCR Mix, i.Mune NEO CD3 PCR Mix, i.Mune NEO GAPDH, i.Mune NEO CD3_memCD4, i.Mune NEO B_NK, i.Mune NEO CD4, i.Mune NEO CD8
- i.Mune NEO Standard, i.Mune NEO Positive Control, i.Mune NEO Negative Control ve i.Mune NEO Quantifier

6 Saklama ve Stabilité

i.Mune Prep, i.Mune NEO Amp, i.Mune NEO Amp Lite, i.Mune NEO Amp CD3 ve i.Mune NEO 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



15°C ila 30°C'de saklayın.

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

Doğrudan ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

6.2 i.Mune NEO Amp/ i.Mune NEO Amp Lite/ i.Mune NEO Amp CD3



-30°C ila -15°C'de saklayın.

İlk kullanımdan sonra kiti 2°C ila 8°C'de saklayın. Dondurmayın!

Doğrudan ışığa maruz bırakmaktan kaçının.

6.3 i.Mune NEO Check



-30°C ila -15°C'de saklayın.

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

7 Gerekli Olan, Ancak Teslimat Kapsamına Girmeyen Malzemeler

i.Mune NEO 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. 76333-314 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. 444-5900 veya eşdeğer
2,0 ml'lik tüpler için Thermoshaker (<i>termoshaker, çalkalamalı ısıtıcı</i>)	Thermomixer® C, (<i>termomikser</i>) 2,0 ml kuru ısıtma bloklu, Eppendorf, katalog no. 5382000015 veya eşdeğer <u>Gerekli Doğruluk:</u> ± 100 rpm (devir/dakika); $\pm 2^{\circ}\text{C}$
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. 4987000010 veya eşdeğer
Çok kanallı pipet 10 μl	Eppendorf 8-Channel, 0,5-10 μl katalog no. 3122000019 veya eşdeğer
PCR plakaları için santrifüj	VWR, katalog no. 521-1648 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
Multiply®-µStrip Pro 8-strip,	Sarstedt, katalog no. 72.991.002 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
Whatman™ 903 Protein Saver Card Ahlstrom-Munksjö Bio Sample TFN PerkinElmer 226 Numune Toplama Cihazı	Cytiva Life Science, katalog no. 10531018 Ahlstrom-Munksjö, katalog no. 8.460.0001.B-N Uygulanamaz

*opsiyonel

Gerekli Özel Ekipman ve Sarf Malzemeleri

i.Mun NEO testini gerçekleştirmek için aşağıdaki özel ekipman ve sarf malzemeleri gerekli olup, başka ekipmanla değiştirilemez.

Özel Ekipman/Sarf Malzemeleri	Tedarikçi ve Parça Numaraları
QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.7.1 yazılımına sahip QuantStudio 6 Flex Real-Time-PCR-System cihazı (96 kuyucuklu blok)	ThermoFisher Scientific
MicroAmp™ Optical 96 Kuyucuklu Reaksiyon Plakası	ThermoFisher Scientific 4316813
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	ThermoFisher Scientific, 4311971

Kurulum Gerekliklikleri

QuantStudio 6 Flex Real-Time-PCR-System cihazının kurulumu, kalibrasyonu, performans doğrulaması ve bakımı üreticinin talimatlarına göre yapılmalıdır.

8 Numune Toplama ve İşleme

8.1 Kurutulmuş Kan Lekesi

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

- En az üç (3) adet 3,2 mm pança karşılık gelen alan gereklidir.
- Alan tamamen ıslatılmış olmalıdır (kan kağıdın arkasına nüfuz etmelidir).
- Filtre kağıdı doğrudan güneş ışığından korunarak oda sıcaklığında en az dört (4) saat veya gece boyunca 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.

Pançaların 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 QuantStudio'nun Kalibrasyon Prosedürü

Applied Biosystems QuantStudio 6 Flex cihazının Kullanım Kılavuzuna göre, ATTO647N floresan boyası için cihaza özel bir boya kalibrasyonu yapılması gereklidir.

- ATTO647N için optimum 400 nM konsantrasyonunu kullanarak Applied Biosystems Gerçek Zamanlı PCR cihazlarının Özel Boya Kalibrasyonunu yapmak için Kullanıcı Bültenini izleyin.
- Yeni özel boyayı masaüstü yazılımına eklerken, boya adı olarak "ATTO647N"yi kullanın. **Lütfen dikkat - bu ad büyük/küçük harfe duyarlıdır!**

10 Test Prosedürü

Bir i.Mune Prep Kit'i, aşağıdakileri işlemek için yeterli reaktif içerir:

- dört (4) numune ve kontroller ile sekiz (8) adede kadar bağımsız test yürütümü (toplam 32 numune) (i.Mune NEO Amp).
- sekiz (8) numune ve kontroller ile beş (5) adede kadar bağımsız test yürütümü (toplam 40 numune) (i.Mune NEO Amp Lite).
- on altı (16) numune ve kontroller ile üç (3) adede kadar bağımsız test yürütümü (toplam 48 numune) (i.Mune NEO Amp CD3).

Not: Bu talimatın birkaç adımında, kapaktan damlaları çıkarmak ve/veya kalan sıvıyı toplamak için tüplerin kısa süreli santrifüjlenmesi ('Tüpleri kısaca santrifüjleyin' 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.

10.1 Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

i.Mune Wash Buffer 1'nin Hazırlanması

- Steril bir dereceli silindir veya serolojik pipet kullanarak i.Mune Wash Buffer 1'e 14,0 ml 2-Propanol (izopropanol, $\geq 99,8$, 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, $\geq 99,5$) 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 ve 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.
- Çözöldükten sonra 60 dakika içerisinde lizis işlemine başlayın.

10.2 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 çözölene kadar hafifçe çalkalayın.

Numuneler

- İlgili sayıda numunenin test edilmesini sağlamak için yeterli miktarda Lysis Master Mix (*Lizis Ana Karışımı*) (+%10 ama en az +2 ekstra 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:
 - PC-1
 - 10,0 µl i.Mune Positive Control
 - 69,0 µl i.Mune Lysis Buffer
 - 11,0 µl i.Mune Proteinase S
 - PC-2
 - 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 (çalkalamalı ısıtıcı) içinde 56°C'de 15 ± 1 dakika boyunca çalkalayarak (900 rpm) inkübe edin.
- Tüpleri kısaca santrifüjleyin.

10.3 Bisülfite ile Dönüştürme

- Lize edilmiş numune/kontrol içeren her bir 2,0 ml'lik tüpe şu reaktifleri ekleyin (10.2):
 - 180,0 µl i.Mune Bisulfite Solution
 - 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 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.

10.4 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 580,0 µl i.Mune Binding Buffer ekleyin.
- Her bir tüpe 380,0 µl 2-Propanol (İzopropanol ≥99,8, p.a - kit kapsamına dâhil değildir) ekleyin.
- 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.

10.5 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 kalan sıvıyı ikinci kez 10 - 100 µl pipetle alın.

10.6 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.

10.7 Kurutma

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

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

10.8 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 termoshaker'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.

10.9 Bisülfitle 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 4 haftaya kadar saklayın.

10.10 PCR Hazırlığı

Not: Başlamadan önce i.Mune NEO Veri Analizi Aracının en güncel sürümünü kullandığınızdan emin olun ("Veri Analiz Aracı"; IM-APP-03).

10.10.1 Pipetleme şemasının hazırlanması

- Veri Analizi Aracını açın.
- Amplification Kit'i (*Amplifikasyon Kiti*) seçin ve Experiment Mode (*Deney Modu*) seçeneğini seçin.
- Numuneler ilk kez işlendiğinde 'New Experiment' (*Yeni Deney*) seçeneğini seçin.
- "Repeat Experiment" (*Deneyi Tekrarla*) şu durumlarda seçilebilir:
 - Bir primer karışımı (CD3_memCD4; B_NK; CD4 veya CD8) geçersizdir:
 - Bisülfitle dönüştürülmüş aynı DNA tekrarlama için kullanılabilir
 - GAPDH ile birlikte sadece bir primer karışımı tekrarlanabilir
 - Sadece ilgili Amp Kitinin bir parçası olan primer karışımları tekrarlanabilir
 - Birden fazla primer karışımı veya GAPDH geçersizdir:
 - Yeni DNA preparasyonu gereklidir
 - Tüm deney seti tekrarlanabilir
- "Generate sample table" (*Numune tablosu oluştur*) ögesini seçin.
- Yeni açılan "Samples" (*Numuneler*) sekmesinde 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 bir 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.

Not: Pipetleme şemasında veya numune listesinde geriye dönük olarak değişiklik yapılması durumunda (örn. numune adı düzeltmesi), pipetleme şeması yeniden oluşturulmalı ve Numune Giriş dosyası tekrar QuantStudio 6 Flex'e aktarılmalıdır.

10.10.2 Standartların Hazırlanması

- i.Mune NEO Standard'ı 15°C ila 30°C'de eritin.
- Çözüldükten sonraki 60 dakika içerisinde işleme devam edin.

10.10.3 PCR Reaksiyon Karışımlarının hazırlanması

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

- i.Mune NEO veya i.Mune NEO Lite veya i.Mune NEO CD3 PCR Mix ve i.Mune primermix'leri eritin.
- 5 - 10 saniye vorteksleyin, tüpleri kısaca santrifüjleyin.
- i.Mune NEO Analiz Aracı tarafından oluşturulan pipetleme şemasındaki tabloya göre PCR reaksiyon karışımlarını hazırlayın.
 - i.Mune NEO AMP için 5 reaksiyon karışımı
 - i.Mune NEO AMP Lite için 3 reaksiyon karışımı
 - i.Mune NEO CD3 için 2 reaksiyon karışımı
- PCR reaksiyon karışımlarını 5 - 10 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Damlaları kapaktan çıkarmak için PCR reaksiyon karışımlarını kısaca santrifüjleyin.

10.10.4 PCR Plakalarının Hazırlanması

- Not:** PCR reaksiyon karışımlarını pipetlemek için ayarlanabilir bir aralıkta çoklu alikot dağıtımı 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 i.Mune NEO Analiz Aracı tarafından oluşturulan pipetleme şemasına göre hazırlayın.
 - Bisülfitle dönüştürülmüş DNA'yı 5-10 saniye vorteksleyerek kısaca karıştırın ve tüpleri kısaca santrifüjleyin.
 - 3,0 µl:
 - i.Mune NEO Standard (STD)
 - işlenmiş i.Mune NEO Positive Control'ler (PK) ve i.Mune NEO Negative Control (NK)
 - işlenmiş numune (bisülfitle dönüştürülmüş DNA) 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.

11 QuantStudio 6 flex Real-Time PCR System ile Analiz

11.1 Plakanın Yüklenmesi

- Not:** İlk kullanımdan önce, tanımlanan döngü ve analiz ayarlarıyla bir şablon dosyası (*.edt) "96_well_Epimune_Template" oluşturulması gereklidir:

Tablo 7: QuantStudio 6Flex için Standart PCR Programı

Yürütüm Protokolü Düzeni: 96_well_Epimune_Template				
Cihaz	QuantStudio 6 Flex System			
Blok	96-Kuyucuklu (0,2)			
Deney Tipi	Standart Eğri			
Tespit	TaqMan Reaktifleri			
Özellikler	Standart			
Reaksiyon hacmi	10 µl			
Program Parametreleri	Denatürasyon	Çevrim		Soğutma
Analiz Modu	Yok	Veri Toplama Açık		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]*	2,34	2,34	1,99	1,6

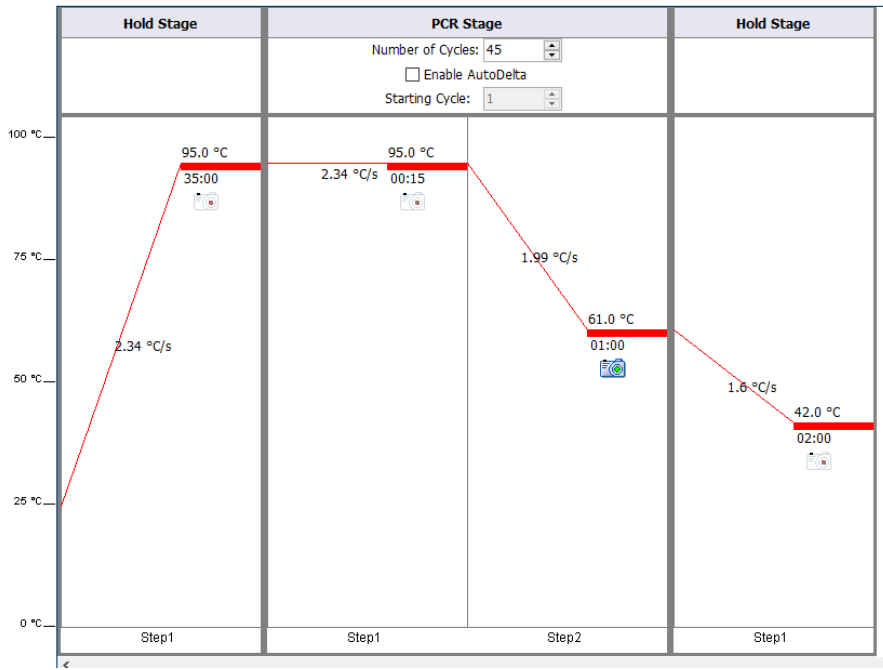
- Deney Menüsünde "Setup"ı (*Kurulum*) seçin ve "Define"da (*Tanımla*) FAM, ROX ve ATTO647N raportörleriyle üç hedef oluşturun.
- "Assign" (*Ata*) seçeneğini seçin ve üç hedefi de tüm kuyulara atayın.
- Şablon dosyasını (*.edt) kaydedin.
- QuantStudio cihazını devreye alın.

- QuantStudio Real-Time PCR software v1.7.1 yazılımını başlatın.
- Genel bakış ekranından “Template”i (*Şablon*) seçin.
- “96_well_Epimune_Template” adlı Şablon Dosyasını seçin.
- Setup altındaki Experiment Menüsünde "Experiment Properties" (*Deney Özellikleri*) seçeneğini seçin ve pipetleme şemasını hazırlarken kullandığınız deney adını girin.
- i.Mune NEO Analiz Aracı tarafından otomatik olarak oluşturulan Numune Giriş dosyasını (*.txt) içeri aktarın
- Experiment Menüsünde “Run Method” (*Yürütüm Yöntemi*) seçeneğini seçin.
- Run Protocol’ün (*Yürütüm Protokolü*) (bkz. Tablo 7) kullanıldığını kontrol edin ve kuyu başına reaksiyon hacmini 10 µl olarak ayarlayın.
- Tepsiyi açın.

Not: 96-kuyucuklu (0,2 ml) plakalar için doğru tepsinin yerinde olduğunu kontrol edin.

- PCR plakasını çerçeveye yerleştirin (A1 konumu sol üst köşeye bitişir), plakanın çerçeveye tam olarak oturduğundan emin olun. Tepsiyi kapatın.
- Experiment Menüsünde “Run” (*Yürüt*) seçeneğini tıklayarak yürütümü başlatın.
- Yürütümü kaydetmeniz istenecektir.

Not: i.Mune NEO Analiz Aracındaki deney adının aynısını kullanın (adım 10.10.1).



Şekil 1: QuantStudio 6Flex için Standart PCR Programı

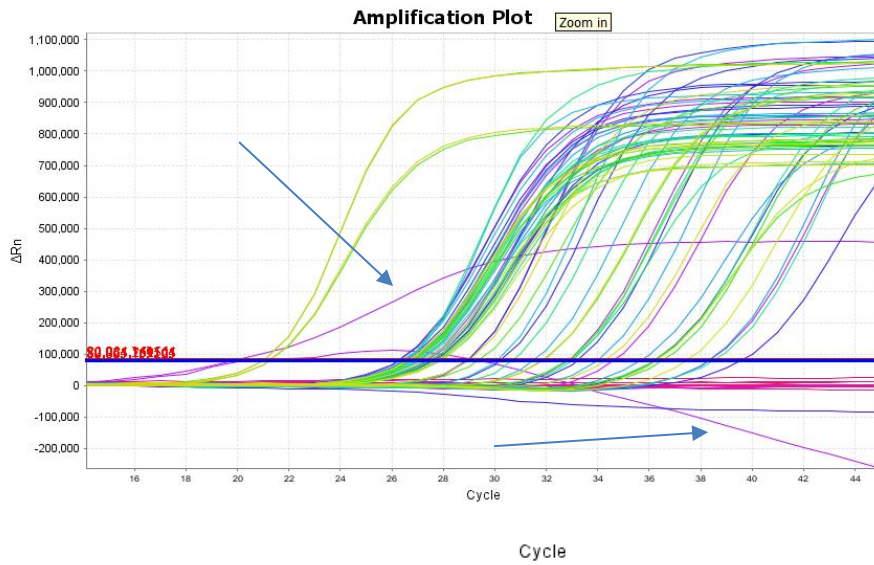
11.2 Analiz Ayarlarını Yürütün (QuantStudio Real-Time PCR Yazılımı)

- Experiment Menüsünde “Analysis” (Analiz) seçeneğini seçin ve “Analyze” (Analiz Et) düğmesine basın (sağ üst köşedeki yeşil düğme).
- Sonuçları görsel olarak kontrol edin.
- Kabul edilemez eğri performansına sahip numuneleri ve kontrolleri dışlayın (bkz. Şekil 2 ve 3).
- Numuneleri dışlamak için “Well Table” (Kuyucuk Tablosu) sekmesine gidin ve etkilenen numunenin kutusunu işaretleyin.
- Kuyucukların dışlanması gerekiyorsa, sağ üst köşedeki yeşil “Analyze” düğmesini tıklayarak verilerin yeniden analiz edilmesi gerekir.
- Verileri dışarı aktarmadan önce “Save” (Kaydet) düğmesine basın.
- Experiment Menüsünde “Export” (Dışarı Aktar) seçeneğini seçin.
- Dışarı Aktarma Dosya Konumunu seçin.

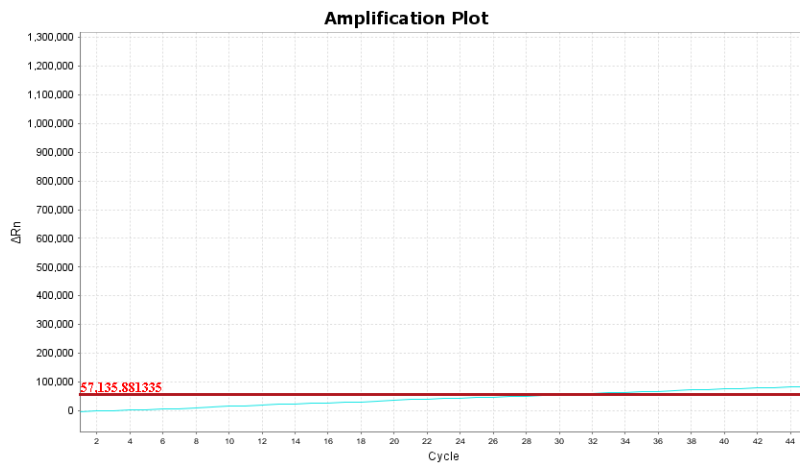
Not: i.Mune NEO Analiz Aracı ile aynı klasörün kullanılması önerilir.

- Dosya tipi olarak “.xls”i seçin.

Pencerenin altındaki “Start Export” (Dışarı Aktarmayı Başlat) düğmesine tıklayın.



Şekil 2: Kabul edilemez eğri performansına sahip numune (oklar).



Şekil 3: Kabul edilemez eğri performansına sahip numune.

11.3 Veri Analizi (i.Mune NEO Analiz Aracı)

- i.Mune NEO Analiz Aracını açın
- "Main" (Ana) sekmesini seçin ve "Import & analyse QS result" (QS sonucunu içeri aktar ve analiz et) seçeneğine tıklayın
- Dışarı aktarılan sonuç dosyasını seçin
- Analize başlamadan önce doğru Amplification Kit'i onaylayın.
- Otomatik olarak bir sonuç raporu oluşturulacaktır.

12 Kalite Kontrolü

Kalite kontrol prosedürleri, reaktif performansını izlemek ve test sonuçlarının geçerliliğini sağlamak için mevcuttur. Kontrol sonuçları tanımlanan kontrol aralıklarının dışındaysa numunelerden elde edilen sonuçlar rapor edilmez.

Buna ek olarak, laboratuvarlar kendi kalite güvence programının ve akreditasyon kuruluşunun gerekliliklerine uygun olarak kendi laboratuvarları, ilgili düzenleyici kurumlar veya akreditasyon kuruluşları tarafından oluşturulan genel kılavuzlara ve prosedürlere başvurmalıdır.

12.1 Yürütüm Geçerliliği - Harici Kontroller: i.Mune NEO Check Kit (IM-CHECK-03)

i.Mune NEO test kiti kullanılarak numuneler test edilirken her yürütüme iki (2) i.Mune NEO Positive Control (PK) ve bir (1) i.Mune NEO Negative Control (NK) dâhil edilmelidir. Bu kontroller, test sonuçlarının geçerliliğini sağlamak için test iş akışının başarılı bir şekilde yürütülmesini izler. i.Mune NEO Standard (STD) qPCR'nin doğru kurulumunu ve performansını denetler.

Bir kontrol için kriterler karşılanmazsa deney geçersiz kabul edilir ve **"invalid"** (geçersiz) olarak belirtilir. Bu, i.Mune NEO Analiz Aracında otomatik olarak kontrol edilir.

Eksik amplifikasyon eğrisi veya düşük floresans yoğunluğu nedeniyle QuantStudio yazılımı tarafından bireysel bir deney için bir kontrole ilişkin Ct değeri hesaplanmazsa, kontrol **"invalid (no signal)"** (geçersiz (sinyal yok)) olarak belirtilecektir.

i.Mune Positive Control'ler ve/veya i.Mune Negative Control ve/veya i.Mune NEO Standard geçersizse, kontrollerle birlikte işlenen numunelerin verileri yorumlanamaz ve **"invalid"** olarak işaretlenir. GAPDH'nin geçersiz olması durumunda, tüm numune ölçümleri **"invalid"** olarak raporlanacaktır. Bu durumda, lütfen Düzeltici Faaliyetler bölümüne bakın (bkz. bölüm 12.3).

12.2 Numune Kabulü ve Dâhili Kontrol

Her bir PCR kuyucuğunda hedefle birlikte bir dâhili kontrol çoğaltılır. Bu kuyu 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 Ct 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 QuantStudio yazılımı tarafından bireysel bir deney için Ct değeri hesaplanmazsa, numune **"failed (no signal)"** (başarısız (sinyal yok)) olarak belirtilecektir.

Her iki durumda, lütfen Düzeltici Faaliyetler bölümüne bakın (bkz. bölüm 12.3). Bu değerlendirme, i.Mune NEO Analiz Aracı tarafından otomatik olarak yapılır.

Bireysel testin Ct 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, numunede yeterli lökosit tespit edilmesine rağmen hedef hücre tipi miktar belirleme sınırının altındadır. Bu durum büyük olasılıkla test edilen numunenin biyolojik durumundan kaynaklandığından, tekrarlanan analizler önerilmemektedir (ayrıca bkz. Bölüm 12 "Prosedürün Sınırlamaları").

12.3 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. Sadece bir primer karışımı etkilenmişse, bisülfitle dönüştürülmüş aynı DNA kullanılarak deney tekrarlanabilir (CD3_memCD4; B_NK; CD4 veya CD8). İlgili deney ve GAPDH artı kalmış eluat ile yeniden analiz edilebilir. Birden fazla primer karışımı veya GAPDH geçersiz ise, i.Mune NEO Positive Control ve i.Mune NEO Negative Control ve numuneler dâhil olmak üzere, tüm yürütüm tekrarlanmalıdır.

Not: i.Mune NEO Negative Control’de FAM veya ATTO647N’de 35-45 Ct arasında bir pozitif sinyal olması durumunda (küçük bir kontaminasyonu gösterir), QuantStudio yazılımı tarafından otomatik olarak tanımlanan eşik etkilenir ve geçersiz bir STD sonucuna (Ct) yol açabilir. Doğru Ct tespiti için sinyalin SADECE etkilenen filtre için manuel olarak analizden çıkarılması gerekir. ROX sinyali ihmal EDİLMEMELİDİR.

"Assign" seçeneğine gidin, ilgili kuyucuğu seçin ve FAM veya ATTO647N hedefini kaldırın. Buradan, bölüm 11.2, Analysis Settings’den (Analiz Ayarları) devam edin.

İkinci kez de geçersiz sonuçlar elde edilirse, yardım için lütfen Müşteri Desteği ile iletişime geçin.

Kabul kriterlerini (dâhili kontrol ve deneye özgü Ct aralığı bazında) 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.

13 Performans Özellikleri

13.1 Yeniden Üretilirlik ve Tekrarlanabilirlik

CLSI’nin "EP05-A3 Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Kesinliğinin Değerlendirilmesi" belgesine göre, i.Mune NEO ürününün tekrarlanabilirliğinin yanı sıra merkez dâhilinde 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 NEO ürününün tekrar üretilebilirliğini belirlemek için çok merkezli bir çalışma gerçekleştirildi. Varyasyon kaynağı olarak, günler, merkezler, operatörler ve cihaz seçilen tasarımla analiz edildi (2 merkez x 5 gün x günde 2 yürütüm x 4 kopya x 3 numune konsantrasyonu).

Farklı numune konsantrasyonları için, K₂EDTA kan alma tüplerinde toplanan sıvı venöz tam kan kullanılarak kurutulmuş kan lekeli numuneleri hazırlandı. Seyreltilmemiş numunenin (%100) yanı sıra, serumla seyreltilerek elde edilen %80 ve %60 konsantrasyonlu numuneler kullanıldı.

Tablo 8: Üç (3) farklı ölçülen büyüklük düzeyi için tek merkezli çalışmadan elde edilen sonuçlar [%DK]

Repeatability				Within-Laboratory			
	Sample Input 100%	Sample Input 80%	Sample Input 60%		Sample Input 100%	Sample Input 80%	Sample Input 60%
%CV for CD3% of Leukocytes	12.75	17.29	11.36	%CV for CD3% of Leukocytes	13.59	18.21	12.56
%CV for memCD4% of Leukocytes	10.05	7.96	12.07	%CV for memCD4% of Leukocytes	10.32	10.22	12.46
%CV for BLC% of Leukocytes	16.36	8.31	10.46	%CV for BLC% of Leukocytes	16.72	10.26	11.54
%CV for NKC% of Leukocytes	13.3	8.28	7.64	%CV for NKC% of Leukocytes	13.63	10.76	8.86
%CV for CD4% of Leukocytes	6.8	5.64	7.71	%CV for CD4% of Leukocytes	9.65	7.16	10.87
%CV for CD8% of Leukocytes	12.07	8.87	13.73	%CV for CD8% of Leukocytes	12.77	11.09	14.11

Tablo 9: Üç (3) farklı ölçülen büyüklük düzeyi (DBS) için tek merkezli çalışmadan elde edilen sonuçlar [%DK]

Reproducibility				Within-Laboratory			
	Sample Input 100%	Sample Input 80%	Sample Input 60%		Sample Input 100%	Sample Input 80%	Sample Input 60%
%CV for CD3% of Leukocytes	11.40	15.97	14.12	%CV for CD3% of Leukocytes	11.40	15.90	11.27
%CV for memCD4% of Leukocytes	10.60	11.79	14.63	%CV for memCD4% of Leukocytes	10.58	10.44	13.14
%CV for BLC% of Leukocytes	22.73	13.78	14.54	%CV for BLC% of Leukocytes	18.03	13.78	14.54
%CV for NKC% of Leukocytes	20.23	9.68	12.04	%CV for NKC% of Leukocytes	14.20	9.28	11.83
%CV for CD4% of Leukocytes	10.27	8.90	11.12	%CV for CD4% of Leukocytes	9.80	8.90	11.12
%CV for CD8% of Leukocytes	11.03	11.47	16.00	%CV for CD8% of Leukocytes	10.87	11.47	13.03

13.2 Doğrusallık

i.Mune NEO tarafından farklı hücre tipleri için üretilen sonuçların doğrusallığını göstermek için, CLSI'nin "EP06 Kantitatif Ölçüm Prosedürlerinin Doğrusallığının Değerlendirilmesi: İstatistiksel Bir Yaklaşım" belgesine göre bir çalışma yapıldı. Farklı numune konsantrasyonları için, K₂EDTA kan alma tüplerinde toplanan sıvı venöz tam kan kullanılarak kurutulmuş kan lekeli numuneleri hazırlandı. Seyreltilmemiş numunenin (%100) yanı sıra, serumla seyreltilerek elde edilen, en düşüğü %37,5 olmak üzere, dokuz (9) farklı konsantrasyonlu numune kullanıldı.

i.Mune NEO testinin, %37,5 ila %100 numune girişi seyreltme aralığında ölçülen tüm hücre tipleri için doğrusal sonuçlar sağladığı gösterildi.

13.3 Tayin Sınırı (LoQ)

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

LoQ'yu belirlemek için, bir K₂EDTA kan alma tüpünde toplanan bir tam kan numunesinden kurutulmuş kan lekeleri (DBS) hazırlandı. Kurutulmuş kan lekelerini hazırlamak için sekiz (8) farklı K₂EDTA kan dilüsyonu kullanıldı. Beklenen LoQ 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 dört bağımsız kopya olarak ölçüldü (yürütüm başına toplam 32 numune). Her bir deney için, i.Mune NEO Analiz Aracında depolanan sonlu bir alt kantitasyon limiti belirlendi.

13.4 Güvenilirlik

152 yenidoğandan filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş kapiller tam kan numuneleri toplandı ve yürütüm başına 8 numunelik setler halinde analiz edildi. Test edilen numunelerin %97'sinde (152 numunedan 148'i) kantitatif sonuç elde edildi.

13.5 Etkileşim

Bir K₂EDTA kan alma tüpünde toplanan tam kanla hazırlanan ve kan numunelerinde sıklıkla bulunan maddeler eklenen DBS 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 Serumundan Albümin) (150 mg/ml).

13.6 Klinik Performans

13.6.1 i.Mune NEO'nun i.Mune TBNK ile korelasyonu

Bunun için, kendi beyanıyla sağlıklı donörlerden filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş 48 kapiller tam kan örneği kullanıldı. Hafıza yardımcı T lenfositleri hariç olmak üzere, i.Mune TBNK (DBS) ile analiz edilen 48 test numunesinin epigenetik verileri, her bir test için Spearman korelasyon katsayısı (Spearman r) kullanılarak i.Mune NEO ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Hesaplanan Spearman r Tablo 10'da görülebilir.

Tablo 10: Spreaman'ın sıra korelasyon katsayısına (r) genel bakış ve i.Mune TBNK sonuçlarıyla karşılaştırmada, her bir i.Mune NEO deneyi için p değeri.

	Spearman Korelasyon Katsayısı [r]	p değeri
Lökositlerin CD3+ T Lenfosit %'si	0,8869	<0,0001
Lökositlerin B Lenfosit %'si	0,8733	<0,0001
Lökositlerin NK Lenfosit %'si	0,9186	<0,0001
Lökositlerin CD4+ T Lenfosit %'si	0,8666	<0,0001
Lökositlerin CD8+ T Lenfosit %'si	0,9062	<0,0001

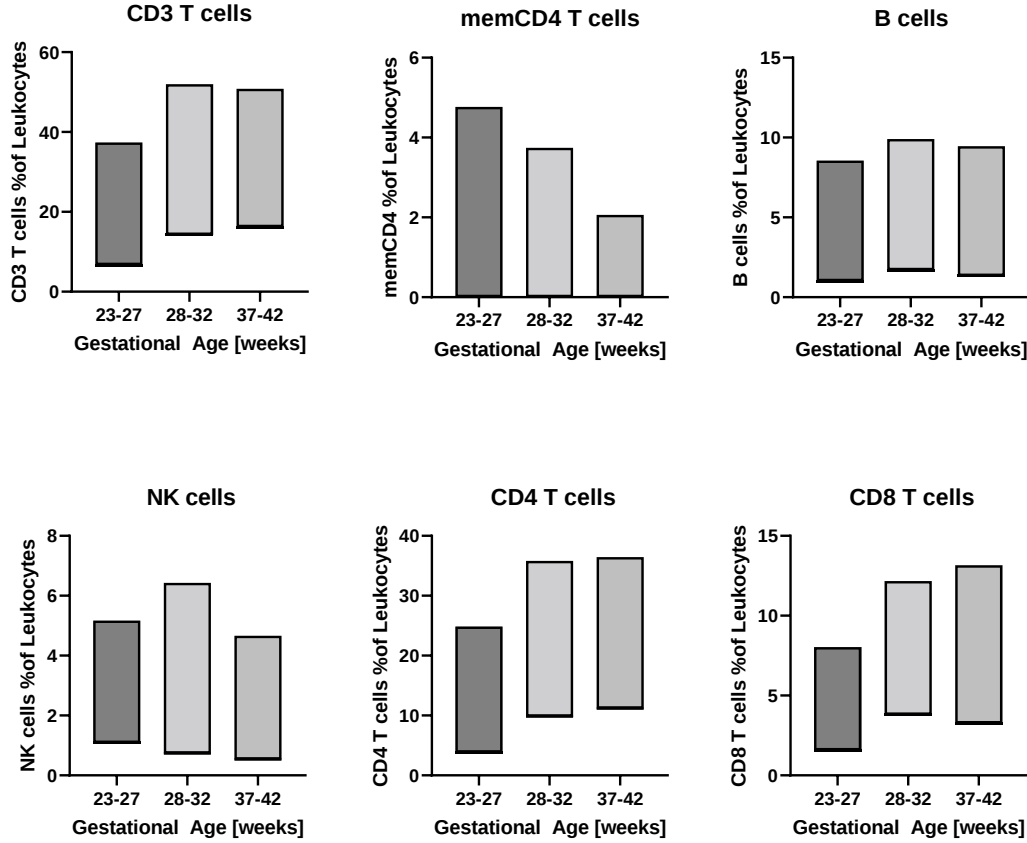
13.6.2 Referans Aralıkları

Sağlıklı (taramada göze çarpmayan) yenidoğanlardan alınan DBS sonuçlarına dayanarak gebelik yaşlarına (GY) göre üç farklı referans aralığı belirlendi. Full-term yenidoğanlar (GY 37-42 hafta) için referans aralığını belirlemek üzere 98 DBS numunesi kullanıldı. GY 23-27 hafta ve GY 28-32 hafta olan pre-term yenidoğanların referans aralığı için sırasıyla 25 DBS numunesinden elde edilen sonuçlar kullanıldı.

Referans aralıkları, her bir parametre için alt ve üst sınır kullanılarak 2,5 ila 97,5 persentil uygulanarak tanımlandı. Hafıza yardımcı T lenfositleri için yalnızca bir üst sınır tanımlandı. Sağlıklı yenidoğanlarda immünolojik hafızanın olmaması nedeniyle, hafıza T yardımcı hücreleri çoğu durumda tayin sınırının altında olacaktır.

Tablo 11: Sağlıklı (taramada göze çarpmayan) yenidoğanlar için tanımlanmış referans aralıkları [Lökosit %'si]

	CD3 T hücreleri [%]	Hafıza CD4 T hücreleri [%]	B hücreleri [%]	NK hücreleri [%]	CD4 T hücreleri [%]	CD8 T hücreleri [%]
	Gebelik yaşı: 23 ila 27 hafta					
Alt Sınır	6,65	0,00	1,00	1,08	3,82	1,57
Üst Sınır	37,37	4,77	8,55	5,17	24,86	8,03
	Gebelik yaşı: 28 ila 32 hafta					
Alt Sınır	14,24	0,00	1,69	0,73	9,81	3,80
Üst Sınır	51,97	3,74	9,91	6,43	35,81	12,17
	Gebelik yaşı: 37 ila 42 hafta					
Alt Sınır	16,17	0,00	1,33	0,53	11,15	3,26
Üst Sınır	50,81	2,06	9,46	4,66	36,45	13,16



Şekil 4: Yenidoğanların referans aralıklarının [Lökosit %'si] farklı gebelik yaşları için karşılaştırılması.

14 Prosedürün Sınırlamaları

- i.Mune NEO sadece i.Mune Prep, i.Mune NEO Amp, i.Mune NEO Amp Lite, i.Mune NEO Amp CD3 ve i.Mune NEO Check kombinasyonu için geliştirilmiştir. Bu kitler ve bileşenler diğer üreticilerin ürünleriyle değiştirilemez veya ikame edilemez.
- i.Mune NEO, yenidoğanlardan alınan ve filtre kağıdı üzerinde kurutulan kapiller kan ile doğrulanmıştır. Bu testi diğer klinik numune türleriyle kullanmayın.
- i.Mune NEO referans aralıkları, Almanya'daki bir yenidoğan tarama merkezinden alınan yenidoğanlardan oluşan bir kohort ile oluşturulmuştur. Diğer popülasyonlar veya gebelik yaşları için referans aralıkları verilen aralıklardan farklı olabilir.
- i.Mune NEO, 96 kuyucuklu blok ve belirtilen yazılım sürümü ile birlikte Applied Biosystems QuantStudio 6 flex Real-Time PCR System cihazı ile kullanım için doğrulanmıştır.
- Bu testin kullanımı, PCR testlerini gerçekleştirme konusunda deneyimli ve eğitilmiş personel ile sınırlıdır. İyi teknik zaruridir ve bu talimatlarda verilen talimatlara uyulmaması hatalı sonuçlar doğurabilir.
- Sağlıklı yenidoğanlarda immünolojik hafızanın olmaması nedeniyle, hafıza yardımcı T hücreleri büyük olasılıkla "düşük hedef hücre içeriği" olarak rapor edilecektir.
- Bir bireydeki öngörülemez polimorfizmler yanlış sonuçlara yol açabilir. Deney oluşturulurken bilinen polimorfizmler dikkate alınmıştır.

15 Simgelerin Anlamı



Kullanma Talimatlarına Başvurun



İn Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz



Katalog Numarası



Parti kodu



Son kullanma tarihi



Üretici



Sıcaklık sınırı



Pozitif Kontrol



Negatif Kontrol



Test Sayısı

16 Referanslar

- 1 Baron U, Werner J, Schildknecht K, Schulze JJ, Mulu A, Liebert UG, Sack U, Speckmann C, Gossen M, Wong RJ, Stevenson DK, Babel N, Schürmann D, Baldinger T, Bacchetta R, Grützkau A, Borte S, Olek S. Epigenetic immune cell counting in human blood samples for immunodiagnostics. Sci Transl Med. 2018 Aug 1;10(452):eaan3508. doi: 10.1126/scitranslmed.aan3508. PMID: 30068569.
- 2 Blom M, Pico-Knijnenburg I, Imholz S, Vissers L, Schulze J, Werner J, Bredius R, van der Burg M. Second Tier Testing to Reduce the Number of Non-actionable Secondary Findings and False-Positive Referrals in Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency. J Clin Immunol. 2021 Nov;41(8):1762-1773. doi: 10.1007/s10875-021-01107-2. Epub 2021 Aug 9. PMID: 34370170; PMCID: PMC8604867.

17 İletişim Bilgileri

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

Müşteri Desteği support@epimune-dx.com
+49 (0)30 23 59 32 83

Epimune GmbH
Rudower Chaussee 29
12489 Berlin, Almanya

18 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.

QuantStudio 6 flex Real-Time PCR System, ThermoFisher Scientific yan kuruluşu Applied Biosystems'in tescilli ticari markasıdır; DynaMag™, Life Technologies Corporation'ın ticari markasıdır; ROX™ ve FAM™, Applied Biosystems'in tescilli ticari markalarıdır; ATTO 647N, ATTO-TEC GmbH'nin tescilli ticari markasıdır; 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