



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ LABORATUVARI
İMMÜNSİTOKİMYASAL BOYA TALİMATI

Doküman No:OE-PAT-PR-002, TL-021
İlk Yayın Tarihi :03.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 1 / 2

1. Amaç

Bu talimat, immünsitokimyasal boyama işlemlerinin nasıl yapılacağını tanımlamak amacıyla hazırlanmıştır.

2. Kapsam

Bu talimat, immünsitokimyasal boyama işlemlerini kapsar.

3. Sorumlular

Sitoteknolog, Laborant

4. Uygulamalar

Sitolojik inceleme sonucunda kesin tanı koyabilmek amacıyla yapılacak olan immünsitokimyasal boya, eğer hastaya ait materyalden hücre bloğu hazırlanmışsa hücre bloğundan hazırlanan kesitlere aşağıdaki talimata göre uygulanır.

4.1. Çalışılacak her antikör için çalışma prosedüründe önerilen pozitif kontrol bloğu bulunur.

4.2. Çalışılacak hastaya ait blok ve pozitif kontrol bloğundan yaklaşık 5 mikron kalınlığında kesilen kesitler, immünhistokimyasal boya için çalışılacak kesitlerin uzun süren işlemler esnasında düşmesini önlemek amacıyla hazırlanmış olan adhesivli lamlar üzerine alınır.

4.3. Her iki kesit de aynı lam üzerine alınır. Pozitif kontrol kesiti lamın bizotajlı alt kısmına gelecek şekilde, hastaya ait blok kesiti ise lamın üst kısmına gelecek şekilde sudan lama alınır.

4.4. Kesitlerin lam üzerine tam olarak yapışmalarını sağlamak amacıyla lamlar bir gece boyunca 56°C sıcaklıktaki etüvde bekletilir.

4.5. Boyama işlemine başlamadan önce deparafinizasyon işlemi için lamlar sırasıyla ksilol'de 30 dakika, 99°'lik etil alkolde 15 dakika, 96°'lik etil alkolde 15 dakika bekletilerek .deparafinizasyon işlemi tamamlanır. Lamlar distile suya alınır.

4.6. Çalışma prosedüründe belirtilen antikörlere 'antijen retrieval' işlemi uygulanır. Bu işlem antijenin dokuda maskelenmiş olarak bulunduğu bilinen antijenler üzerindeki maskeyi kaldırmak için uygulanır. Bu işlem amacıyla hazırlanan sitrat buffer solüsyonuna alınan kesitler mikrodalga fırına özel kabı ile konularak 4 kez 5'er dk süreyle kaynatılır. İşlem tamamlandıktan sonra mikrodalgadan çıkarılan kesitler 20 dk oda ısısında bekletildikten sonra şale içindeki distile suya alınır. Kesitlerin çevresi, damlatılacak olan boyama solüsyonlarının etrafa taşmasını önlemek amacıyla pappen kalemi ile çizilerek 5 dakika Fosfat Buffer Solüsyonu'nda (PBS) bekletilir.

HAZIRLAYAN:	GÖZDEN GEÇİREN:	ONAYLAYAN:
SÜREÇ SORUMLUSU	KALİTE TEMSİLCİSİ	BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ LABORATUVARI
İMMÜNSİTOKİMYASAL BOYA TALİMATI

Doküman No:OE-PAT-PR-002, TL-021
İlk Yayın Tarihi :03.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 2 / 2

4.7. Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksitle (H₂O₂) 20 dk inkübe edilir. Bu sürenin sonunda lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dk PBS'te bekletilir.

4.8. Non-spesifik zemin boyasını önlemek için kesitler 15 dk blokaj solüsyonu ile inkübe edilir. Süre sonunda lamlar distile su ile yıkanmaz, silkelenerek bir sonraki aşamaya geçilir.

4.9. Primer antikolar damlatılır. Her antikorun çalışma prosedüründe belirtilen bir inkübasyon süresi vardır. Belirlenen süre sonunda lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dk PBS'te bekletilir.

4.10. Primer antikora bağlanacak olan sekonder antikor solüsyonu damlatılır ve 25 dk inkübe edilir. Süre sonunda lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dk PBS'te bekletilir.

4.11. Sekonder antikora bağlanacak olan streptoavidin-peroksidaz solüsyonu damlatılır ve 25 dk inkübe edilir. Süre sonunda lamlar distile su ile yıkanır ve 5 dk PBS'te bekletilir.

4.12. Kesitler AEC (Amino Ethyl Carbasol) kromojen solüsyonu ile 20 dk inkübe edilir ve mikroskop altında görünür hale getirilir.

4.13. Lamlar distile su ile yıkanır.

4.14. Lamlar 3 dk Mayer Hematoksilen'inde bekletildikten sonra musluk suyu ile yıkanır.

4.15. 15 saniye amonyaklı suda bekletilerek morartılır, distile suya alınır.

4.16. Tüm preparatlar su bazlı kapatma malzemesiyle kapatılır.

4.17. 5 dakika kurutma kağıdı üzerinde kurutulur.

Eğer incelenen materyalin hücre bloğu yoksa sitolojik inceleme amacıyla hazırlanmış PAP (Papanicolaou) boyasıyla boyanmış lamlardan hücreden zengin olanı, asit-alkol karışımında bir süre bekletilerek rengi açıldıktan sonra kullanılır. Yukarıdaki boyama talimatı, bazı işlemler yapılmadan, aynı şekilde uygulanır. Yayma lam 1gece öncesinden etüvde bekletilmez. Deparafinizasyon talimatı, ksilol aşaması atlanarak direk 99 derecelik alkole konulmak suretiyle yapılır. Eğer antikorun 'antijen retrieval' aşaması varsa işlemler esnasında materyalin dökülmesini önlemek amacıyla bu aşama atlanır.

5. İlgili Dokümanlar

Her antikorun içinden çıkan bilgi formları.

HAZIRLAYAN:	GÖZDEN GEÇİREN:	ONAYLAYAN:
SÜREÇ SORUMLUSU	KALİTE TEMSİLCİSİ	BAŞHEKİM