



Институт за онкологију и радиологију Србије


Пастерова 14, Београд, Србија
+381 11 2067 100
iors@ncrc.ac.rs www.ncrc.ac.rs


РЕПУБЛИКА СРБИЈА
ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ
Бр. 26-144
21 SEP 2015 20 102
БЕОГРАД, Пастерова 14

ПРОЦЕДУРА

HER-2 Dual-ISH бојење - имуностејнер

Ознака процедуре	П.ПАТ.27
Верзија	01
Датум усвајања	21.09.2015.
Аутори процедуре	Др Ирена Јованић Олга Здјелар, ВМЛТ
Носилац процедуре	Др сц мед. Зорка Миловановић, НС
Процедуру одобрио	Проф др Радан Џодић



 ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ	Назив процедуре: HER-2 Dual-ISH бојење – имуностејнер Служба за патологију и цитологију ИОРС-а		Ознака: П.ПАТ.27
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 2 од 6

1. ДЕФИНИЦИЈЕ И СКРАЋЕНИЦЕ

1.1. Дефиниције

„In situ“ хибридизација – техника детекције нуклеинских киселина, односно детекција специфичних циљних секвенци унутар једра, уз истовремено очување ткивне и ћелијске морфологије.

„Dual - in situ“ хибридизација – метода квантитативне детекције амплификације HER-2 гена са две боје, светлосним микроскопом.

Имуностејнер – апарат за аутоматизовано имунохистохемијско бојење и „in situ“ хибридизацију.

1.2. Скраћенице

Dual-ISH	„Dual - in situ“ хибридизација
ИОРС	Институт за онкологију и радиологију Србије
ЛТ	Лабораторијски техничар
ПХ	Патохистолошки
ХЕ	Хематоксилин - Еозин
ИХХ	Имунохистохемија
ДрП	Доктор патолог
УП	Упут за патологију

2. ПРЕДМЕТ


Овом процедуром је обухваћен поступак Dual-ISH бојења у имуностејнеру, као и одношење Dual-ISH обојених предметних стакала ДрП који је индиковао ово бојење.

3. ПОДРУЧЈЕ ПРИМЕНЕ

Упутство се спроводи у делу лабораторије за ИХХ Службе патологије и цитологије ИОРС-а.

4. ОДГОВОРНОСТИ

ЛТ је одговоран за спровођење процедуре.

 ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ	Назив процедуре: HER-2 Dual-ISH бојење – имуностејнер Служба за патологију и цитологију ИОРС-а		Ознака: П.ПАТ.27
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 3 од 6

5. ОПИС ПРОЦЕДУРЕ

5.1. HER-2 DUAL-ISH БОЈЕЊЕ – ИМУНОСТЕЈНЕР

HER-2 Dual-ISH бојење у апарату VENTANA BENCH MARK GX:

ЛТ припрема апарат:

А) Испразнити посуду за отпадни материјал:

1. Извадити бочицу и одврнути њен поклопац.
2. Испразнити бочицу.
3. Заменили бочицу, завртањем причврстити поклопац и притиснути бочицу назад у њено место.


Б) Поново напунити системску бочицу, у зависности од потребе:

4. За скидање системске бочице, притиснути патент браву да се ослободи, потом извадити бочицу напоље.

Ц) За постављање системске бочице:

5. Поново напунити бочицу са истим производом.
6. Ставити бочицу у отвор и притиснути унапред, све док се не осети или чује да је шкљоцнула.
7. Притиснути „икону“ за етикете предметних стакала која се налази на дну главног екрана.
8. У оквиру Вентана система за обележавање етикетом притиснути „икону“ за протоколе.
9. У оквиру листе за селектовање протокола (енг. Select protocols list) селектовати (притиснути) протокол Dual-ISH. Dual-ISH бојење се ради под истим ПХ бројем под којим се радило и HER-2 ИХХ бојење.
10. У пољу за копије унети број етикета који треба да се одштампа.
11. Притиснути „икону“ за додавање (енг. Add icon) да би се копијала одређена ставка на листу етикета за штампање.
12. Притиснути „икону“ за затварање/штампање (енг. Close/Print icon).
13. Селектовати прву етикету у листи за штампање етикета (енг. Labels to Print list). Унети податке у одговарајућа поља (у горње поље унети ПХ број и годину под којом се радило HER-2 бојење, а у доње поље унети ПХ број, годину и ознаку (ако је има) парафинског блока ткива из кога се радило HER-2 бојење). Потом притиснути „икону“ за штампање (енг. Print icon). Исту радњу поновити за сваку етикету.
14. Када су етикете одштампане, притиснути „икону“ за затварање (енг. Close icon).
15. Притиснути „икону“ за унос (енг. Feed icon) на штампачу да пређете на последњу етикету. Повући етикету на доле и уредно је отцепити са ролне.
16. По завршетку процедуре 5.7. припремљена позитивно наелектрисана предметна стакла са ткивним пресецима обележити етикетама – ручно залепити етикете на предметна стакла.


- Скинути лепљиву полеђину са заштитног крилца.

 <p>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</p>	Назив процедуре: HER-2 Dual-ISH бојење – имуностејнер Служба за патологију и цитологију ИОРС-а		Ознака: П.ПАТ.27
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 4 од 6

- Пресавити крилце преко етикете.
- Поравнати површину крилца тако да боље пријања, потом одвојити етикету од њене полеђине.
- Нацентрирати етикету на пескирану страну предметног стакла и поравнати површину етикете тако да боље пријања. Етикета не треба да прелази преко ивица плочице.ЛТ убацује реагенсе:
- 17. Склонити корито за реагенсе.
- 18. Отворити клизна врата.
- 19. Притиснути на доле један угао горњих врата да би се ослободила патент бравица, потом предња врата повући у напред да би се она отворила.
- 20. Подићи горња врата.
- 21. Ручно заротирати вртешку за предметна стакла до одговарајуће позиције.
- 22. Свако појединачно предметно стакло ставити на носач за предметно стакло са грејачем, заједно са етикетом окренутом на горе и на споља, водећи рачуна да предметно стакло буде смештено између дирека.
- 23. Затворити горња клизна врата.
- 24. Ставити диспензере за реагенс у корито за реагенсе.
- 25. Скинути све затвараче са диспензера и ставити на носач за затвараче.
- 26. Гурнути диспензер у отвор све док не шкљоцне у своје место.
- 27. Поставити корито за реагенсе на вртешку за реагенсе. Лагано заротирати да би се проверило да је безбедно постављено.
- 28. Затворити предња клизна врата, проверити да ли језичак на вратима налаже преко основе корита за реагенсе.
- ЛТ стартује серију извођења:
- 29. На компјутеру притиснути „икону“ за серију извођења (енг. Run icon) која се налази на главном екрану.
- 30. У контролној листи опције пре радног циклуса (енг. Pre-Run checklist), притиснути последња два квадрата и укуцати број убачених предметних стакала.
- 31. Притиснути „икону“ за стартовање серије извођења (енг. Start run icon).
- 32. Светло за рад је жуте боје – значи почетак радног процеса:

Процедуре: Dual ISH CKT (Protocol Summary)

- 1 Deparaffinization [Selected] - депарафинизација (одабрати).
- 2 Extended Depar [Selected] – продужена депарафинизација (одабрати).
- 3 Cell Conditioning [Selected] - кондиционирање ћелија (одабрати).
- 4 Cell Conditioning CC2 [Selected] - кондиционер CC2 (одабрати).
- 5 Mild CC2 [Selected] - благи третман CC2 (одабрати).
- 6 Incubate for [8 Minutes] (Cycle 1) – инкубирати 8 минута (Циклус 1).
- 7 Standard CC2 [Selected] – стандардан третман CC2 (одабрати).
- 8 Incubate for [12 Minutes] (Cycle 2) - инкубирати 12 минута (Циклус 2).
- 9 Extended CC2 [Selected] – продужени третман CC2 (одабрати).
- 10 Incubate for [8 Minutes] (Cycle 3) - инкубирати 8 минута (Циклус 3).
- 11 ISH-Protease 3 [Selected] - ISH-Protease 3 (одабрати).

 ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ	Назив процедуре: HER-2 Dual-ISH бојење – имуностејнер Служба за патологију и цитологију ИОРС-а		Ознака: П.ПАТ.27
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 5 од 6

12 Apply One Drop of ISH-PROTEASE 3, Apply Coverslip, and Incubate for [16 Minutes] - апликовати једну кап ISH-PROTEASE 3, апликовати течни покровни слој - инкубирати 16 минута.

13 Apply Two Drops of [HER2DNP CHR17DIG] (C-Probe), and Incubate for 4 Minutes - апликовати две капи [HER2DNP CHR17DIG] (C-проба) – инкубирати 4 минута.

14 Incubate for [20 Minutes] (Denaturation) - инкубирати 20 минута (Денатурација)

15 Incubate for [6 Hours] (Hybridization) – инкубирати 6 сати (Хибридизација).

16 Warmup Slide to [72 Deg C], and Incubate for 8 Minutes (Stringency Wash Temperature) – загрејати плочице на 72 °C и инкубирати 8 минута (Температура контролног испирања).

17 Apply One Drop of SIL ISH DNP HRP, Apply Coverslip, and Incubate for [16 Minutes] - апликовати једну кап SIL ISH DNP HRP, апликовати течни покровни слој – инкубирати 16 минута.

18 Apply One Drop of SIL ISH DNP CHRC, and Incubate for [4 Minutes] - апликовати једну кап SIL ISH DNP CHRC - инкубирати 4 минута.

19 Apply One Drop of RED ISH DIG AP, Apply Coverslip, and Incubate for [24 Minutes] - апликовати једну кап RED ISH DIG AP, апликовати течни покровни слој - инкубирати 24 минута.

20 Apply One Drop of RED ISH DIG FR, and Incubate for [8 Minutes] - апликовати једну кап RED ISH DIG FR - инкубирати 8 минута.

21 Counterstain [Selected] – контрастно бојење (одабрати).

22 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] (Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [24 Minutes] - апликовати једну кап [HEMATOXYLIN II] (контрастна боја), апликовати течни покровни слој - инкубирати 24 минута.

23 Post Counterstain [Selected] – пост-контрастно бојење (одабрати).

24 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] (Post Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes] - апликовати једну кап [BLUING REAGENT] (пост-контрастна боја), апликовати течни покровни слој - инкубирати 4 минута.

33. Уколико је потребна ручна апликација, систем ће направити паузу и на то упозорити ЈТ.


34. Склонити корито за реагенсе и отворити клизна врата.

35. Разлити реагенс на свако предметно стакло. Пипету држати под углом од 45 степени. Убацити наставак тако да улази у површину течности која се налази на предметном стаклу. Пажљиво разливати да би се избегло проливање реагенса преко ивица предметних стакала. Водити рачуна о томе да се течност не повуче назад у пипету.

36. Затворити горња клизна врата, заменити корито за реагенсе на вртешци и затворити предња клизна врата, водећи рачуна да језичак врата належе преко основе корита за реагенсе.

37. Притиснути Вентана „икону“ на контролној табли инструмента да би се наставила серија извођења.

38. По завршетку серије извођења, систем упозорава ЈТ и пали се светло на „икони“ за искључивање (енг. Sign off icon), која се налази на дну главног екрана.

 ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ	Назив процедуре: HER-2 Dual-ISH бојење – имуностејнер Служба за патологију и цитологију ИОРС-а		Ознака: П.ПАТ.27
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 6 од 6

39. ЛТ вади завршена обојена предметна стакла и ређа их у пластични хоризонтални носач.

40. Притиснути „икону“ за искључивање (енг. Sign off icon).

41. Завршена обојена предметна стакла у пластичном хоризонталном носачу ЛТ испира у раствору детерџента који се налази у пластичној чинији.

42. Затим их испира у текућој, па у дестилованој води.

43. Dual-ISH обојена предметна стакла ређа на филтер папир и ставља у инкубатор на 37⁰С – 30 минута.

44. ЛТ Dual-ISH обојена предметна стакла кратко провлачи кроз ксилол, ставља по једну кап синтетског медијума и покрива покровним стаклом.

45. Dual-ISH обојена предметна стакла ређа на мапе и заједно са одговарајућим ХЕ и /или HER-2 ИХХ обојеним предметним стаклима, као и са УП на коме је ДрП HER-2 одговорио као (2+) и/или УП са новим ПХ бројем, односе ДрП на дијагностику.

МЕТОДЕ, МЕДИЦИНСКИ ПОТРОШНИ МАТЕРИЈАЛ, ХЕМИКАЛИЈЕ, АПАРАТИ

Метода: HER-2 Dual-ISH бојење – имуностејнер.

Медицински потрошни материјал: Рукавице, покровно стакло и папирна вата.

Хемикалије: Ксилол, синтетски медијум за покривање предметних стакала и хемикалије за имуностејнер.

Апарати: Имуностејнер VENTANA BENCH MARK GX.

Референце:

1. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications. Third edition. Saunders.
2. www.nordiqc.org
3. Фабричко упутство за имуностејнер VENTANA BENCH MARK GX.