



## Институт за онкологију и радиологију Србије


Пастерова 14, Београд, Србија  
+381 11 2067 100  
[iors@ncrc.ac.rs](mailto:iors@ncrc.ac.rs) [www.ncrc.ac.rs](http://www.ncrc.ac.rs)

РЕПУБЛИКА СРБИЈА  
ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ  
Бр. 26-145  
21 SEP 2015 20  
БЕОГРАД, Пастерова

# ПРОЦЕДУРА ИМУНОХИСОХЕМИЈСКО БОЈЕЊЕ - МАНУЕЛНО

Ознака процедуре	<b>П.ПАТ.28</b>
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



 <b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b>	Назив процедуре: <b>Имунохистохемијско бојење - мануелно</b>		Ознака: <b>П.ПАТ.28</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 2 од 6

## 1. ДЕФИНИЦИЈЕ И СКРАЋЕНИЦЕ

### 1.1. Дефиниције

Имунохистохемијско бојење - процес локализације антигена у ћелијама ткивних пресека фиксираних у формалину и укалупљених у парафину.

Антиген - макромолекул протеина локализован на различитим местима у ћелији.

Демаскирање антигена - поступак којим антигени „маскирани“ формалином постају „видљиви“ за антитела.

Примарно антитело – антитело које реагује са антигенима ткива фиксираних у формалину и укалупљених у парафину.

ТБС – растварач антитела на бази ТБС-а (енг. Tris buffered saline (25X)).

Полимер детекциони систем - систем којим се детектује место везивања примарног антитела за одговарајући антиген.

ДАБ (diaminobenzidin) хромоген са субстратом - систем за визуелизацију реакције антиген - антитело.

### 1.2. Скраћенице


ИХХ	Имунохистохемија
Ат	Антитело
Аг	Антиген
ХЕ	Хематоксилин - Еозин
ИОРС	Институт за онкологију и радиологију Србије
ЛТ	Лабораторијски техничар
ПХ	Патохистолошки
ДрП	Доктор патолог
μℓ	Микролитар
мл	Милилитар
УП	Упут за патологију
ДАБ	Диаминобензидин

## 2. ПРЕДМЕТ

Овом процедуром је обухваћен поступак ИХХ бојења, као и одношење ИХХ обојених предметних стакала ДрП који је индиковао бојење.

## 3. ПОДРУЧЈЕ ПРИМЕНЕ

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

 <p><b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b></p>	Назив процедуре: <b>Имунохисохемијско бојење - мануелно</b>		Ознака: <b>П.ПАТ.28</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 3 од 6

#### 4. ОДГОВОРНОСТИ

ДрП је одговоран за индиковање Ат, а ЛТ је одговоран за техничко спровођење процедуре.

#### 5. ОПИС ПРОЦЕДУРЕ

##### 5.20. ПРОЦЕДУРА ИХХ БОЈЕЊА - МАНУЕЛНО

5.20.1. По завршеној поцедури 5.19 приступа се процедури мануелног ИХХ бојења.

5.20.2. ЛТ ткивне пресеке на обележеним позитивно наелектрисаним предметним стаклима која се налазе у вертикалном пластичном носачу, депарафинише у ксилолу – 15 минута.

5.20.3. ЛТ ткивне пресеке на обележеним позитивно наелектрисаним предметним стаклима, која се налазе у вертикалном пластичном носачу, хидрира у 100% алкохолу – 10 минута.

5.20.4. ЛТ ткивне пресеке на обележеним позитивно наелектрисаним предметним стаклима која се налазе у вертикалном пластичном носачу, хидрира у 96% алкохолу - 10 минута.

5.20.5. ЛТ ткивне пресеке на обележеним позитивно наелектрисаним предметним стаклима, која се налазе у вертикалном пластичном носачу испра у дестилованој води – кратко.

5.20.6. ЛТ демаскира Аг топлотним претретманом у одговарајућем пуферу (препурака произвођача) у микроталасној пећници:

- у микроталасној пећници загрејати пуфер до кључања
- пластични сталак са рехидрираним предметним стаклима спустити у посуду са кључалим пуфером која се налази у микроталасној пећници
- време демаскирања – 20 минута рачунајући од момента почетка кључања пуфера.

5.20.7. По завршетку демаскирања Аг, ЛТ пластични хоризонтални сталак са предметним стаклима заједно са пуфером вади из микроталасне пећнице и оставља да се хлади 20 минута.


5.20.8. ЛТ предметна стакла која се налазе у пластичном хоризонталном сталку вади из охлађеног пуфера и испра их дестилованом водом – 2 до 3 пута.

5.20.9. ЛТ примењује блокаду ендогене пероксидазе у 3% водоник-пероксиду, која траје 5 минута.

5.20.10. ЛТ предметна стакла испира дестилованом водом - 2 до 3 пута.

5.20.11. ЛТ предметна стакла налива ТБС-ом, која стоје 3 минута.

5.20.12. ЛТ предметна стакла вади једно по једно.

 <p><b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b></p>	Назив процедуре: <b>Имунохисохемијско бојење - мануелно</b>		Ознака: <b>П.ПАТ.28</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 4 од 6

5.20.13. ЛТ брише вишак ТБС-а око ткивног пресека папирном ватом или убрусом. Строго води рачуна да ткивни пресек остане влажан.

5.20.14. ЛТ предметна стакла ређа у влажну комору са полимерним тракама за фиксирање, где максимално стаје 20 предметних стакала.

5.20.15. ЛТ на ткивни пресек, аутоматском пипетом, наноси 100  $\mu\text{l}$  примарног Ат – време инкубације траје 35 минута.

5.20.16. ЛТ шприц- боцом у којој се налази ТБС испира предметна стакла, а након тога, влажну комору са полимерним тракама за фиксирање где се налазе предметна стакла у целини „отреса“ од вишка ТБС-а, а затим се још 3 - 4 пута врши испирање ТБС-ом.

5.20.17. ЛТ налива ТБС на предметна стакла. ТБС на предметним стаклима стоји 3 минута.

5.20.18. ЛТ капањем из оригиналне бочице наноси једну до две капи првог реагенса из полимерног система за детекцију (енг. Primary Antibody Enhancer) имуно реакције Аг-Ат и оставља да реакција траје 14 минута.

5.20.19. ЛТ шприц- боцом у којој се налази ТБС испира предметна стакла, а након тога, влажну комору са полимерним тракама за фиксирање где се налазе предметна стакла у целини „отреса“ од вишка ТБС-а, а затим се још 3 - 4 пута врши испирање ТБС-ом.

5.20.20. ЛТ налива ТБС на предметна стакла. ТБС на предметним стаклима стоји 3 минута.

5.20.21. ЛТ капањем из оригиналне бочице наноси једну до две капи другог реагенса из полимерног система за детекцију (енг. Large Volume HRP Polymer) имуно реакције Аг-Ат и оставља да реакција траје 17 минута.

5.20.22. ЛТ шприц- боцом у којој се налази ТБС испира предметна стакла, а након тога, влажну комору са полимерним тракама за фиксирање где се налазе предметна стакла у целини „отреса“ од вишка ТБС-а, а затим се још 3 - 4 пута врши испирање ТБС-ом.

5.20.23. ЛТ налива ТБС на предметна стакла. ТБС на предметним стаклима стоји 3 минута.


5.20.24. ЛТ припрема систем за визуелизацију реакције Аг-Ат (хромоген диаминобензидин (ДАБ) са специфичним супстратом) по следећој рецептури:

- У пластичну градуисану епрувету одмерити 1мл супстрата.

- Додати 1 кап хромогена.

- Добро промућкати и сипати у пластичну бочицу са капаљком.

5.20.25. ЛТ капањем наноси једну до две капи система за визуелизацију реакције Аг-Ат (хромоген диаминобензидин (ДАБ) са специфичним супстратом) и оставља да реакција траје 5 минута.

 <p><b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b></p>	Назив процедуре: <b>Имунохисохемијско бојење - мануелно</b>		Ознака: <b>П.ПАТ.28</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 5 од 6

5.20.26. ЛТ шприц- боцом у којој се налази текућа вода испира предметна стакла, а након тога, влажну комору са полимерним тракама за фиксирање где се налазе предметна стакла у целини „отреса“ од вишка воде.

5.20.27. ЛТ одлаже предметна стакла у вертикалну кивету у којој се налази текућа вода и врши испрање 2 до 3 пута под текућом водом.

5.20.28. ЛТ одлива воду из вертикалне кивете.

5.20.29. ЛТ у вертикалну кивету са предметним стаклима налива хематоксилин и бојење траје 5 минута.

5.20.30. ЛТ обојене ткивне пресеке испира у текућој млакој води 5 минута.

5.20.31. ЛТ налива у вертикалну кивету са предметним стаклима 1% литијум-карбонат који стоји 20 секунди.

5.20.32. ЛТ испира предметна стакла у текућој млакој води 1 минут.

5.20.33. ЛТ налива предметна стакла 96% алкохолом.

5.20.34. ЛТ налива предметна стакла новим 96% алкохолом, који стоји 5 минута.

5.20.35. ЛТ налива предметна стакла 100% алкохолом.

5.20.36. ЛТ налива предметна стакла новим 100% алкохолом, који стоји 5 минута.

5.20.37. ЛТ налива предметна стакла ксилолом.

5.20.38. ЛТ налива нови ксилол који стоји 5 минута.

5.20.39. ЛТ ИХХ обојена предметна стакла вади редом из вертикалних кивета и ређа на филтер папир.

5.20.40. ЛТ на ИХХ обојена предметна стакла ставља једну кап синтетског медијума и покрива покровним стаклом. Вишак медијума упија папирном ватом.

5.20.41. ЛТ ИХХ обојена предметна стакла ређа на мапе и заједно са одговарајућим ХЕ обојеним предметним стаклом, и/или парафинским блоком ткива и папиром/УП који је донео ДрП, доставља надлежном ДрП.


5.20.42. ДрП поступа по процедури микроскопирања 5.17.1.

## **МЕТОДЕ, МЕДИЦИНСКИ ПОТРОШНИ МАТЕРИЈАЛ, ХЕМИКАЛИЈЕ, АПАРАТИ**

**Метода:** ИХХ бојење – мануелно.

**Медицински потрошни материјал:** Руквице, покровно стакло и папирна вата.

**Хемикалије:** 96% алкохол, 100% алкохол, ксилол, оригиналне бочице са примарним и секундарним Ат, растварач за Ат, концентровано Ат, ДАБ, дестилована вода, ТБС, водоник-пероксид и синтетски медијум за покривање предметних стакала.

 <b>ИНСТИТУТ ЗА ОНКОЛОГИЈУ И РАДИОЛОГИЈУ СРБИЈЕ</b>	Назив процедуре: <b>Имунохисохемијско бојење - мануелно</b>		Ознака: <b>П.ПАТ.28</b>
	Датум: 21.09.2015.	Верзија: 01	Страна: 6 од 6

**Референце:**

1. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications. Third edition. Saunders.
2. [www.nordiqc.org](http://www.nordiqc.org)