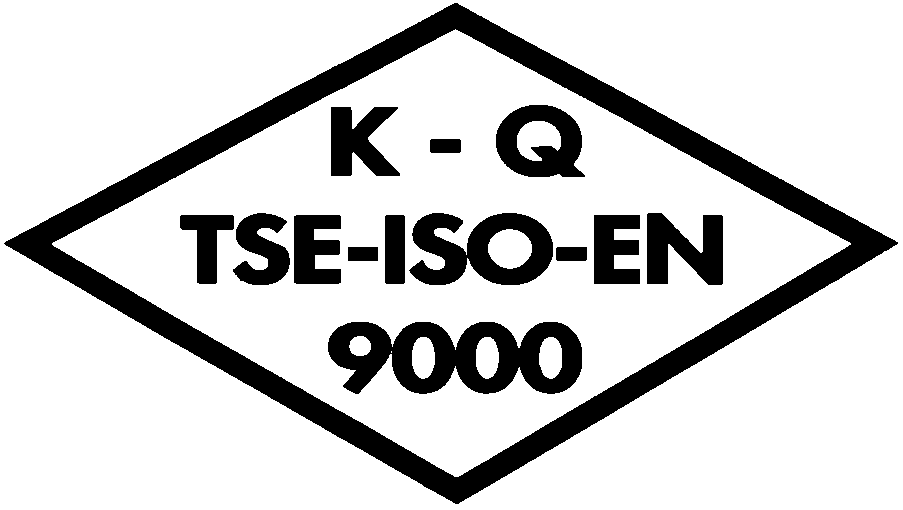
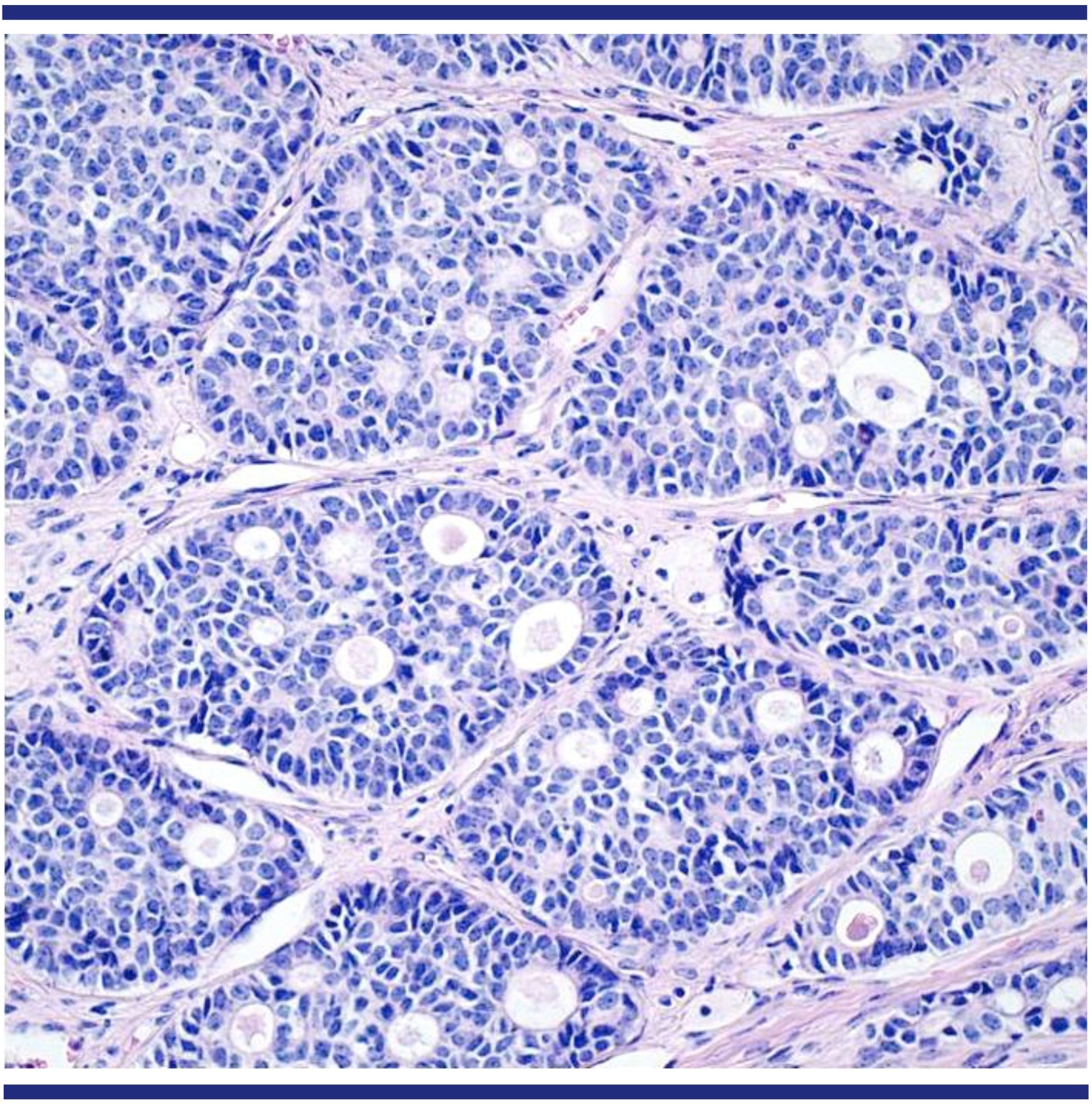
**T.C.**

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**



**PATOLOJİ LABORATUVARI REHBERİ**

**(KILAVUZU)**

Yayın No: 96

Dök. Kodu: PL.RH.02 Yayın Tar.: Ekim 2014 Rev. No: 01 Rev. Tar.: Ağustos 2019

**1. Patoloji laboratuvarı örnek türü**

**1.1.** Organ ve dokulardan alınan tru-cut, punch, insizyonel, eksizyonel, endoskopik doku örnekleri

**1.2.** Organ ve doku rezeksiyonu

**1.3.** Amputasyon materyali

**1.4.** Vücut sıvıları

**1.5.** Organ ince iğne aspirasyonu

**1.6.** Otopsi

**2. Örnek kabul ve red kriterleri**

**2.1. Örnek kabul kriterleri**

**2.1.1.** Gönderilen doku örneklerinin konulduğu kapların üzerinde hastanın adı-soyadı ve dokunun alınış yeri ve hasta dosya numarası yazılı olmalıdır.

**2.1.2.** Gönderilen örnekle birlikte patoloji veya sitoloji istek formu tam

olarak (hasta adı - soyadı, dosya numarası, klinik bilgi vb)doldurulması ve aynı zamanda gönderen hekimin kaşesinin ve imzasının bulunması gerekmektedir.

**2.1.3.** Doku örnekleri etiketlenmiş ya da barkod numarası verilmiş olarak gönderilmelidir.

**2.1.4.** Gönderilen doku örnekleri %10’luk tamponlu formaldehit solüsyonu

içinde ağzı kapalı kaplarda olmalıdır.

**2.1.5.** Küçük biyopsi örnekleri için en az 10 katı hacim büyüklüğünde formaldehit kullanılmalıdır. Büyük doku örnekleri en az 2 katı formaldehit solüsyonu içerisine konulmalıdır.

**2.1.6.** İntraoperatif konsültasyon ve immünfloresan çalışmalar için gönderilen doku örnekleri herhangi bir tespit solüsyonu içerisine konulmaksızın, bekletilmeden taze olarak laboratuvara gönderilmelidir.

**2.1.7.** Sitolojik örnekler uygun tüpler içerisinde etiketlenerek en kısa

sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır.

**2.1.8.** İnce iğne aspirasyon örnekleri lamlara ince bir tabaka halinde yayılıp

laboratuvara gönderilmelidir.

**2.1.9.** İntraoperatif konsültasyon için gönderilen materyaller ameliyathane

görevlisi tarafından laboratuvara teslim edilmelidir.

**2.1.10.** Pap test (smear testi) – Thin prep için gönderilen materyaller özel solüsyon içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.

**2.1.11.** Bulaşıcı hastalık tanısı olan hastalar mutlaka istek formlarında belirtilmelidir.

**2.1.12.** Konsültasyon için gönderilen hazır parafin blok ve/veya preparatlar konsültasyon formu ile birlikte önceki merkezdeki patoloji raporu ile birlikte teslim edilmelidir.

**2.2.1.** Gönderilen doku örneklerinde isim ve dosya numarası bulunmaması,

**2.2.2.** Gönderilen patoloji ve sitoloji istek formunun uygun (hasta adı - soyadı, dosya numarası, klinik bilgi vb) doldurulmaması ve aynı zamanda da gönderen hekimin kaşesinin ve imzasının bulunmaması,

**2.2.3.** Gönderilen kaplarda doku bulunmaması,

**2.2.4.** Gönderilen örneğin uygun olmayan solüsyon içerisinde gönderilmesi,

**2.2.5.** İntraoperatif konsültasyon için kemik ve kalsifiye sert dokuların gönderilmiş olması

**2.2.6.** İntraoperatif konsültasyon için çok küçük doku gönderilmiş olması

(kalıcı parafin kesitlerdeki tanıyı engelleyecek şekilde)

**2.2.7.** Sitolojik sıvı örneklerinin uygunsuz (sürahi, enjektör, idrar torbası gibi) ve

çalışanın iş sağlığını tehdit edecek şekilde gönderilmesi,

**3. Örnek transferi ile ilgili kurallar**

**3.1. Doku örnekleri**

**3.1.1.** Cerrahi spesimenler ve biyopsiler uygun büyüklükte ağzı kapalı

%10’luk tamponlu formaldehit solüsyonu içinde gönderilir.

**3.1.2.** Cerrahi rezeksiyon materyalleri bütünlüğü bozulmadan laboratuvara

ulaştırılır.

**3.1.3.** İntraoperatif konsültasyon için gönderilen örnekler ameliyathane görevlisi tarafından hiçbir solüsyona konmadan bizzat kendileri tarafından hemen laboratuvara ulaştırılır.

**3.1.4.** İmmünfloresan inceleme için gönderilen doku örnekleri serum fizyolojik içerisinde veya hiçbir solüsyon içerisine konmadan ve bekletilmeden laboratuvara gönderilir.

**3.2. Sitolojik sıvı örnekleri (Balgam, idrar, seröz sıvılar, kist sıvıları)**

**3.2.1.** Kapalı kaplarda hızlı bir şekilde laboratuvara gönderilmelidir.

**3.2.2.** İnce iğne aspirasyon sitolojileri ince bir tabaka halinde lamlara

yayılıp, havada kurutulmuş olarak gönderilmelidir.

**3.2.3.** Servikovajinal smearlar (pap test/ thin prep) solüsyonu içerisinde fikse edilerek gönderilmelidir.

**3.2.4.** Thin prep solüsyonu bulunmadığı durumlarda alkol ile fikse edilerek laboratuvara ulaştırılmadır.

**3.2.5.** Fikse edilmeyen doku ve sitolojik sıvı örnekleri en geç 1 saat

içerisinde laboratuvara gönderilmelidir.

**4. Örneklerin etiketlenmesi ile ilgili kurallar**

**4.1.** Örnek kapları gönderilen doku örneğinin büyüklüğüne uygun olmalıdır ve ağzı kapalı olmalıdır.

**4.2.** Örnek kapları üzerinde hasta adı, soyadı, dokunun alındığı yeri ve dosya numarasını bildiren etiket veya barkod bulunmalıdır. Aynı hastaya ait birden fazla örnek var ise dokuların alındığı bölgeler örnek kapları üzerinde belirtilmiş olmalıdır.

**4.3.** Gönderilen örnekler patoloji laboratuvarı örnek kabul birimi tarafından teslim alınır ve patoloji protokol numarası ile kodlanır.

**4.4.** Laboratuvarda işlemler bu numara üzerinden yürütülür, raporlanır ve arşivlenir.

**5. Ön hazırlık gerektiren testlere ait bilgi**

**5.1.** Gerekli durumlarda ön hazırlık için laboratuar ve klinik birimler arasında iletişim kurulur

**6. Örneklerin çalışma zamanı**

**6.1. Sitolojik materyaller**

**6.1.1.** *1. gün* materyalin kabulü, yayma preparatlarının hazırlanması ve boyanması

**6.1.2.** *2. gün* asistana teslim edilmesi

**6.1.3.** *3. gün* mikroskopik inceleme

**6.1.4.** *4. gün* gerekli olgularda ek işlemlerin yapılması

**6.1.5.** *5. gün* raporlama

**6.2. Biyopsi ve ameliyat ile elde edilen doku örneklerinin incelenmesi**

**6.2.1.** *1. gün* örnek kabulu ve fiksasyon , makroskopik inceleme,

**6.2.2.** *2. gün* doku takibi, bloklama, kesit alma ve hematoksilen eozin boyama

**6.2.3.** *3. gün* mikroskopik inceleme,

**6.2.4.** *4. gün* gerekli olgularda ileri tanı tetkik için ek histokimya, immünohistokimyasal ve moleküler testlerin yapılması,

**6.2.5.** *5. gün* raporlama

**7. Ortalama sonuç verme süreleri**

**7.1.1.** Sitolojik örnekler........................ 5 iş günü

**7.1.2.** Biyopsi örnekleri......................... 5 iş günü

**7.1.3.** Kemik iliği biyopsileri.................. 7-10 iş günü

**7.1.4.** Büyük kemik rezeksiyonları........ 15-20 iş günü

**7.1.5.** Fiksasyon süresi uzun olan büyük dokularda ilave fiksasyon süresine

ihtiyaç duyulabilmektedir.

**7.1.6.** Dekalsifikasyon gerektiren sert doku örneklerinde ek 3 gün kemik

iliği biyopsilerinde dekalsifikasyon için ek 1 gün işlem gereklidir.

yoğunluğuna göre ek süre gereksinimi duyulabilmektedir.

**7.1.8.** Hastalara, patoloji raporlarının hazır olduğu kısa mesaj yolu ile cep telefonlarına bildirilmektedir.

**8. Patoloji test listesi**

**8.1. Hematoksilen-eozin boyama ve histopatolojik inceleme**

**8.2. Histokimyasal testler**

**8.2.1.** Retikülin

**8.2.2.** Masson Trikrom

**8.2.3.** PAS

**8.2.4.** PAS-D

**8.2.5.** Pas-Alcian Blue

**8.2.6.** Conqo Red

**8.2.7.** Demir (Prusya mavisi)

**8.2.8.** Best Carmine

**8.2.9.** Rhodanine

**8.2.10.** Toluidine mavisi

**8.2.11.** Masson Fontana

**8.2.12.** Verhoeff

**8.2.13.** Gomori Metanamine Silver

**8.2.14.** Musikarmin

**8.2.15.** Warthin Stary

**8.2.16.** Orsein

**8.2.17.** Giemsa

**8.2.18.** Oil Red O

**8.2.19.** Von Gieson

**8.2.20.** Von Kossa

**8.2.21.** High Iron Diamine

**8.3. Sitolojik testler**

**8.3.1.** May Grunwald Giemsa

**8.3.2.** PAP (Papanicolaou)

**8.4. İmmünfloresan testler**

**8.4.1.** c 3

**8.4.2.** c1q

**8.4.3.** Fibrinojen

**8.4.4.** Ig A

**8.4.5.** Ig G

**8.4.6.** Ig M

**8.5. İmmün histokimyasal testler**

**8.5.1.** ACTH

**8.5.2.** Actin (SMA)

**8.5.3.** Actin (AMS)

**8.5.4.** AFP

**8.5.5.** ALK

**8.5.6.** AMARC

**8.5.7.** Amiloid AA

**8.5.8.** B 72.3

**8.5.9.** B-catenin

**8.5.10.** BCL-2

**8.5.11.** BCL-6

**8.5.12.** Calcitoin

**8.5.13.** Caldesmon

**8.5.14.** Calretinin

**8.5.15.** CD 1A

**8.5.16.** CD 2

**8.5.17.** CD 3

**8.5.18.** CD 3 epsilon

**8.5.19.** CD 4

**8.5.20.** CD 5

**8.5.21.** CD 8

**8.5.22.** CD 10

**8.5.23.** CD 13

**8.5.24.** CD 15

**8.5.25.** CD 20

**8.5.26.** CD 21

**8.5.27.** CD 23

**8.5.28.** CD 25

**8.5.29.** CD 30

**8.5.30.** CD 31

**8.5.31.** CD 33

**8.5.32.** CD 34

**8.5.33.** CD 38

**8.5.34.** CD 41

**8.5.35.** CD 43

**8.5.36.** CD 45 (LCA)

**8.5.37.** CD 45 RA

**8.5.38.** CD 45 RO

**8.5.39.** CD 56

**8.5.40.** CD 57

**8.5.41.** CD 61

**8.5.42.** CD 62-E

**8.5.43.** CD 68

**8.5.44.** CD 79 alfa

**8.5.45.** CD 99

**8.5.46.** CD117

**8.5.47.** CD138

**8.5.48.** CD163

**8.5.49.** CDX2

**8.5.50.** CEA(monoklonal)

**8.5.51.** CEA (poliklonal)

**8.5.52.** C-erb B2

**8.5.53.** Chromogranin

**8.5.54.** Cited-1

**8.5.55.** CMV

**8.5.56.** Collagen tip4

**8.5.57.** Cyclin D1

**8.5.58.** D2-40

**8.5.59.** Desmin

**8.5.60.** Dystrophin

**8.5.61.** EBV(LMP)

**8.5.62.** E-Cadherin

**8.5.63.** EMA

**8.5.64.** ER (östrojen)

**8.5.65.** Factor-8

**8.5.66.** Factor-13

**8.5.67.** FLI-1

**8.5.68.** FOXP3

**8.5.69.** FSH

**8.5.70.** Galectin

**8.5.71.** Gastrin

**8.5.72.** GCDFP-15

**8.5.73.** GFAP

**8.5.74.** GH

**8.5.75.** Glucagon

**8.5.76.** GLUT-1

**8.5.77.** Glycophorin

**8.5.78.** Glypican-3

**8.5.79.** Granzyme-B

**8.5.80.** HBs AG

**8.5.81.** HBc AG

**8.5.82.** HCG

**8.5.83.** Heppar-1

**8.5.84.** HMB-45

**8.5.85.** IGF-1

**8.5.86.** Ig A

**8.5.87.** Ig D

**8.5.88.** Ig G

**8.5.89.** Ig M

**8.5.90.** İnhibin

**8.5.91.** İnsulin

**8.5.92.** Kappa

**8.5.93.** Keratin

**8.5.94.** Keratin 5/6

**8.5.95.** Keratin 7

**8.5.96.** Keratin 8

**8.5.97.** Keratin 8/18

**8.5.98.** Keratin 14

**8.5.99.** Keratin 18

**8.5.100.** Keratin 19

**8.5.101.** Keratin 20

**8.5.102.** Keratin LM

**8.5.103.** Keratin HMW

**8.5.104.** Kİ-67

**8.5.105.** Lambda

**8.5.106.** Laminin

**8.5.107.** LH

**8.5.108.** Lizozom

**8.5.109.** Melan A

**8.5.110.** Mesothelin

**8.5.111.** MOC 31

**8.5.112.** MPO

**8.5.113.** MUM-1

**8.5.114.** MYO-D1

**8.5.115.** Myoglobin

**8.5.116.** Neurofilament

**8.5.117.** NSE

**8.5.118.** P 16

**8.5.119.** P 53

**8.5.120.** P 63

**8.5.121.** PAX-5

**8.5.122.** Perforin

**8.5.123.** PR (progesteron)

**8.5.124.** Prolactin

**8.5.125.** PSA

**8.5.126.** RCC

**8.5.127.** S-100

**8.5.128.** SBP

**8.5.129.** Seratonin

**8.5.130.** Smothelin

**8.5.131.** Somatostatin

**8.5.132.** Synaptophysin

**8.5.133.** TDT

**8.5.134.** Thyroglobulin

**8.5.135.** TRACT

**8.5.136.** TRAP

**8.5.137.** Thrombomodulin

**8.5.138.** TSH

**8.5.139.** TTF-1

**8.5.140.** Ubiquitin

**8.5.141.** Vimentin

**8.5.142.** VWF

**8.5.143.** WT1

**8.6. Kromojenik in situ hibridizasyon (CISH)**

**8.6.1.** EBER

**8.6.2.** Kappa

**8.6.3.** Lambda

**8.6.4.** CERB –B2

**8.7. Moleküler patolojik testler**

**8.7.1.** EGFR mutasyon analizi

**8.7.2.** KRAS mutasyon analizi

**8.7.3.** BRAF mutasyon analizi

**8.7.4.** HPV mutasyon analizi

**8.8. FİSH Testleri**

**8.8.1.** ALK

**8.8.2.** ROS

**8.8.3.** C-MYC

**8.8.4.** BCL – 2

**8.8.5.** BCL-6

**8.8.6.** EWSR

**8.8.7.** 1P19Q

**8.8.8.** HER-2

**9. Patoloji laboratuvarı işleyiş prosedürü**

**9.1. Doku örneklerinin kabulü**

**9.1.1.** Patoloji laboratuvarı Pazartesi – Cuma günleri arasında 08:00-17:00 saatleri arasında hizmet vermektedir.

**9.1.2.** Laboratuvara gönderilen doku örnek kapları üzerindeki bilgi barkod

ve istek formunun uygunluğu kontrol edilir.

**9.1.3.** Örnek kabul biriminde çalışan personel tarafından değerlendirilir.

**9.1.4.** Uygun doku örnekleri kabul edilir.

**9.1.5.** Doku örnekleri patoloji protokol defterine

**9.1.6.** Sitoloji örnekleri sitoloji protokol defterine kaydedilir ve patoloji protokol numarası verilir.

**9.1.7.** Patoloji protokol numaraları hem örnek kabının, hem de istek formunun üzerine yazılır.

**9.1.8.** Kabul edilen doku ve sitoloji örnekleri ilgili laboratuvardaki patoloji

teknisyenine teslim edilir.

**9.1.9.** Konsültasyon için gönderilen hazır blok ve/veya hazır preparatlar üzerindeki numara ve gönderilen laboratuvar bilgileri ile birlikte kaydedilir.

**9.1.10.** İlgili laboratuvar teknisyenine iletilir.

**9.2. Doku örneklerinin makroskopik incelemesi**

**9.2.1.** Makroskopik inceleme patoloji uzmanı ve/veya patoloji asistanı tarafından patoloji teknisyeni desteğiyle birlikte yapılır.

**9.2.2.** Patoloji uzmanı veya asistanı tarafından örnek kabındaki hasta ismi ve numarasının istek formundaki isim ve numarayla uygunluğu tekrar kontrol edilir.

**9.2.3.** Makroskopi kabininde büyük doku örneklerinin boyutları, rengi,

dokunun kıvamı ile ilgili tariflemeler yapılır. Gerekli durumlarda fotoğraflar çekilir.

**9.2.4.** *Türk Patoloji Dernekleri Federasyonu* ve *College Of American Patologists* Rehberleri gözönünde rehberleri göz önünde bulundurularak farklı organların farklı lezyonları bu referanslara uygun şekilde 0,3 cm kalınlıkta, 0,3x1x1 cm ölçülerinde örnekler doku takip kasetlerine alınır.

**9.2.5.** Doku takip kasetleri üzerinde patoloji protokol numarası ve hangi

bölgeden alındığını gösteren harf veya numaralar bulunur.

**9.2.6.** Kaset kapağı kapatılır, kalan dokular örnek kabı içerisine alınır.

**9.2.7.** Kasetlenen dokular otomatik doku takip cihazının kaset sepetine konur ve doku takip cihazına takılıncaya kadar formaldehit içerisine konur.

**9.3. Dokular otomatik doku takip cihazında gece boyunca takip edilir**

Formaldehit 2 saat Alkol %70 1 saat Alkol %80 1 saat Alkol %90 1 saat Alkol %96 1 saat Alkol absolü 1 saat Alkol absolü 1 saat Ksilen 1 saat Ksilen 1 saat Parafin 2 saat Parafin 2 saat

**9.3.1.** Doku takibi sonrası parafin blok haline getirilir.

**9.3.2.** Bloklanan dokulardan mikrotom cihazı ile 5 mikronluk kesitler alınır.

**9.3.3.** Su banyosunda açılan kesitler patoloji protokol numarası ile etiketlenmiş lamlar üzerine alınır.

**9.3.4.** Doku kesitleri üzerinde bulunan lamlar 10 dakika sureyle dikey

şekilde kurumaya bırakılır.

**9.3.5.** Daha sonra 60 derecelik sıcak tabla üzerinde 5 dakika deparafinize

edilir .

**9.3.6.** Hematoksilen-eozin boyası manuel veya otomatik boyama cihazında yapılır.

**9.4. Hematoksilen eozin boyası**

**Hematoksilen**

*5 gr Hematoksilen*

*100 gr Amonyum alüminyum sülfat 12 hydrat*

*40 ml glasiyel asetik asit*

*50 ml Absolü alkol (% 99)*

*2,5gr Mercüric oksit*

Hematoksilen absolü alkolde eritilir.

1000 ml ısıtılmış distile su içerisinde 100gr amonyum alüminyum sülfat eritilir.

Üzerine alkolde eritilen hematoksilen eklenir ve biraz kaynatılır. İçine en son merkürik oksit yavaş yavaş eklenir.

İyice karıştıktan sonra boya hızlı soğutulur.

Tam soğuyunca glaciel asetik asit eklenir.

**Eozin**

*4 gr Eosin*

*20 ml Glaciel asetik asit*

*1000 ml %70’lik alkol*

Eosin alkole eklenir iyice karıştırılır

Üzerine glaciel asit eklenir.

**Asit alkol**

1000ml %70’lik alkol ile 5ml HCl karıştırılarak hazırlanır.

**Amonyaklı su**

500ml distile su ile 2ml konsantre amonyak karıştırılarak hazırlanır.

**Manuel boyama yöntemi**

1. Kesitler lam üzerine alındıktan sonra 10 dk ksilende bekletilir.

2. %99’luk alkolde 3 dk bekletilir.

3. %96’lık alkolde 3 dk bekletilir.

4. %70’lik alkolde 3 dk bekletilir.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 5. | Çeşme suyunda iyice yıkanır. |  | | |
| 6. | Hematoksilende 5 dk bekletilir. |  |  |  |
| 7. | Çeşme suyunda iyice yıkanır. |  |  |  |
| 8. | Asit alkolde 10 sn bekletilir. |  |  |  |
| 9. | Çeşme suyunda iyice yıkanır. |  |  |  |
| 10. | Amonyaklı suda 10 sn bekletilir. |  |  |  |
| 11. | Çeşme suyunda iyice yıkanır. |  |  |  |
| 12. | Eosinde 2 dk bekletilir. |  |  |  |
| 13. | Çeşme suyunda iyice yıkanır. |  |  |  |
| 14. | %70’lik alkolde 3 dk bekletilir. |  |  |  |
| 15. | %96’lIk alkolde 3 dk bekletilir. |  |  |  |
| 16. | %99’luk alkolde 3 dk bekletilir. |  |  |  |
| 17. | 10 dk ksilende bekletilir. |  |  |  |
| 18. | Hazır hale gelen preparatlar  kapatılır. | lamelle | entellan | yardımıyla |

**Otomatik cihaz boyama yöntemi**

1. Ksilen 3 dk

2. Ksilen 3 dk

3. Ksilen 3 dk

4. %99’luk alkol 3 dk

5. %96’luk alkol 3 dk

6. %70’luk alkol 3 dk

7. Yıkama suyu 2 dk

8. Hematoksilen 7 dk

9. Yıkama suyu 2 dk

10. Asit alkol 10 sn

11. Yıkama suyu 1 dk

12. Amonyaklı su 15 sn

13. Yıkama suyu 1 dk

14. Eosin 2 dk

15. Yıkama suyu 2 dk

16. %70’lik alkol 3 dk

17. % 96’lık alkol 3 dk

18. %99’luk alkol 3 dk

19. Ksilen 3 dk

20. Ksilen 3 dk

21. Ksilen 3 dk

22. Hazır hale gelen preparatlar entellan yardımıyla kapatılır

**9.5. Histokimyasal boyama**

**9.5.1. Masson Trikrom boyası**

**Bouin solüsyonu**

*A- 2 gr pikrik asit*

*25 ml formaldehit*

*B- 75 ml distile su*

*5 ml glasiyel asetik asit*

A-B solusyonları ayrı ayrı hazırlanıp daha sonra eşit oranda birleştirilerek solusyon hazır hale gelir. Hazırlanan solüsyon süzülerek kullanıma hazır hale gelir.

Önce pikrik asit ve formaldehit çözeltisi hazırlanır, daha sonra distile su ve galsiyel asetik asit çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan iki solüsyon kendi arasında karıştırılıp süzülerek kullanılır.

**Weighret solüsyonu**

*A- 1gr hematoksilen*

*50 ml % 90 lık alkol*

*B- 50 ml distile su*

*2 ml ferrik klorid ( %62’lik)*

*0,5 ml HCI*

A-B solüsyonları ayrı ayrı karıştırılıp hazırlanan solüsyonlar eşit oranda karıştırılarak hazır hale getirilir.

**Asit alkol**

%70’lik 100 ml alkol içerisine 1 ml HCI karıştırılarak elde edilir.

**Biebrich scarlet**

*0,9 gr biebrich*

*0,1 gr asit fuksin*

*90 ml distile su*

*1 ml glasiyel asetik asit*

Hepsi karıştırılarak solüsyon hazır hale getirilir.

**Fosfotungustik asit**

*2 gr fosfotungustik asit*

*2 gr fosfomolibdik asit*

*100 ml distile su*

Hepsi karıştırılarak solüsyon hazır hale getirilir.

**Anilin Blue**

*2,5 gr anilin blue*

*2 ml glasiyel asetik asit*

*100 ml distile su*

Hepsi karıştırılarak solüsyon hazır hale getirilir.

**Glasiyel asetik asit**

*100 ml distile su*

*1 ml glasiyel asetik asit*

*Hepsi karıştırılarak solüsyon hazır hale getirilir.*

1. Hazırlanan kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolden geçirilerek çeşme suyunda yıkanır.

2. Bouin solüsyonunda etüvde 60 derecede 1 saat bekletilir

3. Akan suda 1 dk yıkanır.

4. 5 dk weighret solüsyonunda bekletilir.

5. 1 dk akan suda yıkanır.

6. Asit alkolde çalkalanır.

7. 1 dk akan suda yıkanır.

8. 2 dk Biebrich solüsyonunda bekletilir.

9. 1 dk akan suda yıkanır.

10. 15 dk fosfotungustik asitte bekletilir.

11. 20 dk Anilinde bekletilir.

12. 1 dk akan suda yıkanır.

13. 1 dk Glasiyel asitte bekletilir.

14. 1 dk akan suda yıkanır.

15. 1 dk % 80’lik alkolde bekletilir

16. 1 dk % 96’lık alkolde bekletilir.

17. 5 dk ksilende bekletilir.

18. Hazır hale gelen preparatlar entellan yardımıyla kapatılır.

**9.5.2. Peryodik asit-Schiff (PAS) boyası**

**Peryodik asit solüsyonu**

*100 ml distile su*

*0,5 gr peryodik asit*

Hepsi karıştırılarak solüsyon hazır hale getirilir.

**Schiff solüsyonu**

*1 gr fuksin ( nörtal veya basic )*

*2 gr sodyum (potasyum ) meta bisülfit*

*2 gr aktif kömür*

*2 ml HCI*

*200 ml distile su*

Distile su kaynatılır. İçerisinde önce fuksin çözülür. 50 derece ye kadar soğutulur. 2 gr sodyum metabisülfit eklenerek karıştırılır. İyice soğutulduktan sonra kömür eklenir. İyice karıştırılır ve HCI eklenir. Karanlıkta 2 gece bekletilir. Süzülerek kullanılır.

1. Hazırlanan kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolde bekletilerek

çeşme suyunda yıkanır.

2. 10 dakika peryodik asit solüsyonunda bekletilir

3. Çeşme suyunda yıkanır

4. 15 dakika Schiff solüsyonunda bekletilir

5. Akan suda pembeleşinceye kadar yıkanır

6. 2 veya 3 dakika hematoksilen de bekletilir

7. Suda yıkanır

8. 1 dakika amonyakta mavileşene kadar bekletilir

9. Boyanan preparatlar 5 dk alkol 10 dk ksilenden sırasıyla

geçerilerek entellan ile kapatılarak hazır hale getirilir.

**9.5.3. Diastazlı Peryodik asit-Schiff (PAS-D) boyası**

**Diastaz solüsyonu**

*100 ml distile su*

*1 gr diastaz*

Hepsi karıştırılarak solüsyon hazır hale getirilir

**Peryodik asit solüsyonu**

*100 ml distile su*

*0,5 gr peryodik asit*

Hepsi karıştırılarak solüsyon hazır hale getirilir

**Schiff solüsyonu**

*1 gr fuksin ( nörtal veya basic )*

*2 gr sodyum (potasyum ) meta bisülfit*

*2 gr aktif kömür*

*2 ml HCI*

*200 ml distile su*

Distile su kaynatılır. İçerisinde önce fuksin çözülür. 50 derece ye kadar soğutulur. 2 gr sodyum metabisülfit eklenerek karıştırılır. İyice soğutulduktan sonra kömür eklenir. İyice karıştırılır ve HCI eklenir. Karanlıkta 2 gece bekletilir. Süzülerek kullanılır.

1. Hazırlanan kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolde bekletilerek

çeşme suyunda yıkanır.

2. 60 derecede 1 saat etüvde diastaz solüsyonunda bekletilir.

3. Akan suda yıkanır.

4. 10 dakika peryodik asit solüsyonunda bekletilir

5. Suda yıkanır

6. 15 dakika Schiff solüsyonunda bekletilir

7. Akan suda pembeleşinceye kadar yıkanır

8. 2 - 3 dk hematoksilen de bekletilir

9. Suda yıkanır

10. 1 dk amonyakta mavileşene kadar bekletilir

11. Boyanan preparatlar 5 dk alkol 10 dk ksilende bekletilerek

entellan yardımıyla hazır hale getirilir.

**9.5.4. PAS Alcian blue boyası**

**Alcian blue solüsyonu**

*97 ml distile su*

*1 gr Alcian blue*

*3 ml asetik asit*

**Peryodik asit solüsyonu**

*100 ml distile su*

*0,5 gr peryodik asit*

**Schiff solüsyonu**

*1 gr fuksin ( nörtal veya basic )*

*2 gr sodyum (potasyum ) meta bisülfit*

*2 gr aktif kömür*

*2 ml HCI*

*200 ml distile su*

Distile su kaynatılır. İçerisinde önce fuksin çözülür. 50 derece ye kadar soğutulur. 2 gr sodyum metabisülfit eklenerek karıştırılır. İyice soğutulduktan sonra kömür eklenir. İyice karıştırılır ve HCI eklenir. Karanlıkta 2 gece bekletilir. Süzülerek kullanılır.

1. Hazırlanan kesitler 10dk ksilen 10 dk alkolde bekletilerek çeşme suyunda yıkanır.

2. 5 dakika alcian blue solüsyonunda bekletilir

3. Suda yıkanır

4. 5 dakika peryodik asit solüsyonunda bekletilir

5. Suda yıkanır

6. 15 dakika Schiff solüsyonunda bekletilir

7. Akan suda pembeleşinceye kadar yıkanır

8. 2 veya 3 dakika hematoksilen de bekletilir

9. Suda yıkanır

10. 1 dakika amonyokta mavileşene kadar bekletilir

11. Boyanan preparatlar 5 dk Alkol 10 dk ksilende bekletilerek

entellan ile kapatılır.

**9.5.5. Müsikarmin boyası**

*1 gr carmin*

*100 ml % 50 alkol*

*1 gr alüminyum hidroksit*

*0,5 gr anhidroz alüminyum klorid*

Carmin ve alkolde çözülür, daha sonra alüminyum hidroksit ve alüminyum klorid eklenir ve 2,5 dk kaynatılarak solüsyon hazırlanır

1. Hazırlanan kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolde bekletilerek

çeşme suyunda yıkanır.

2. Hematoksilende 5 dk bekletilir

3. Çeşme Suyunda yıkanır.

4. 1 dakika amonyokta bekletilir

5. çeşme suyunda yıkanır

6. Musikarmin boyasında 30 dk bekletilir.

7. Çeşme Suyunda yıkanır

8. Hazırlanan preparatlar 5 dk alkol 10 dk ksilende bekletilerek

entellan ile kapatılır.

**9.5.6. Warthin Stary boyası**

**Asetat Buffer 1**

*1,64 gr asetat*

*2,5 ml glaciel asetik asit*

*200 ml distile su*

*Hepsi karıştırılarak hazır hale getirilir.*

**Silver solüsyonu 2**

*0,5 gr silver nitrat*

*50 ml asetat buffer*

*Hepsi karıştırılarak hazır hale getirilir.*

**Developer 1**

*150 ml distile suda 7,5 gr jelatin ıslatılarak çözülür 60 derecede*

*saklanır*

**Developer 2**

*10 ml asetat bufferde 0,3 gr hidrokinin çözülür*

**Developer 3**

*30 ml distile suda 0,6 gr silver nitrat çözülür*

**Çalışma solüsyonu**

Developer 1 solüsyonundan 15 ml

Developer 2 solüsyonundan 1 ml

Developer 3 solüsyonundan 3 ml alınıp karıştırılır.

1. Hazırlanan Kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolde bekletilerek

çeşme suyunda yıkanır.

2. Asetat bufferda 5 dk bekletilir

3. 1 saat 60 derecede silver solüsyonda bekletilir

4. Sıcak suda yıkanır

5. Çalışma solüsyonunda 60 derecede 3 dk bekletilir

6. Sıcak suda yıkanır

7. Asetat bufferde yıkanır

8. Hazırlanan preparatlar 5 dk Alkol 10 dk ksilende bekletilerek

entellan ile kapatılır

**9.5.7. Gümüş (Retikülin ) Boyası**

**Potasyum permanganat solüsyonu**

*100 ml distile su*

*1 gr potasyum permanganat karıştırılarak hazırlanır*.

**Oksalik asit solüsyonu**

*100 ml distile su*

*2 gr oksalik asit*

**Ferric amonyum sülfat**

*100 ml distile su*

*2,5 gr ferric amonyum sülfat*

**Silver nitrat stok solüsyonu**

*100 distile su*

*10 gr silver nitrat*

**Sodyum hidroksit stok solüsyonu**

*100 ml distile su*

*3 gr sodyum hidroksit*

**Gümüş solüsyonunun hazırlanışı**

% 10’luk silver nitrattan 5 ml alınır. Üzerine damla damla amonyak eklenir. Rengi bulanık görünüm olana kadar devam edilir. Bulanıklaşınca amonyak eklemesi bırakılır. Üzerine % 3’lük sodyum hidroksitten 5 ml eklenir. Homojen bir karışım elde edilir. Eğer çökelti olursa üzerine birkaç damla daha amonyak eklenir. Hazırlanan solüsyon 50 ml ye distile su ile tamamlanır ve süzülür.

**Formalin solüsyonu**

*90 ml distile su*

*10 ml formalin*

**Gold klorid**

*45 distile su*

*5 ml % ‘ luk gold klorid solüsyonu*

**Sodyum tiyosülfat**

*100 ml distile su*

*5 gr sodyum tiosülfat* karıştırılarak solüsyon elde edilir.

1. Kesitler 10 dk ksilen ve 10 dk alkolden geçirilerek suya getirilir.

2. 3- 5 dakika potasyum permanganatta bekletilir

3. Çeşme suyunda yıkanır

4. Renk soluncaya kadar oksalik asitte beklet

5. Çeşme suyunda yıkanır

6. 15 dakika ferric amonyum sülfat ta bekletilir

7. Çeşme suyunda yıkanır

8. 20 dakika gümüş solüsyonu bekletilir

9. Çeşme suyunda yıkanır

10. Kararıncaya kadar formalin’de tutulur ( 15 dakika )

11. Çeşme suyunda yıkanır

12. Gold klorid ile çalkalanır

13. Çeşme suyunda yıkanır

14. 2-3 dakika sodyum tiosülfatta bekletilir

15. Çeşme suyunda yıkanır

16. 5 dk alkol ve 10 dk ksilen den sırasıyla geçerek entellan ve lamel ile kapatılır

**9.5.8. Kongo Red boyası**

*% 50‘lik 100 ml alkol* ile *0,5 gr congo red* karıştırılarak solüsyon hazırlanır

1. Kesitler 10 dk ksilen ve 10 dk alkolden geçirilerek suya getirilir

2. 15 dakika congo redde bekletilir

3. Çeşme suyunda yıkanır

4. 2 - 3 dakika hematoksilende bekletilir

5. Çeşme suyunda yıkanır

6. Amonyağa batırılıp çeşme suyunda yıkanır

7. 5 dk alkol ve 10 dk ksilen den sırasıyla geçerek entellan ve lamel ile kapatılır

**9.5.9. Prusya mavisi (demir) boyası**

**Çalışma solüsyonu**

*2 gr potasyum hexacyano ferrate 2*

*40 ml distile su* ile karıştırılır üzerine

*4 ml hidroklorik asit* eklenerek çalışma solüsyonu hazırlanır

**Nötral red**

*1 gr nötral red*

*100 ml distile su* ile karıştırılarak hazırlanır

1. Kesitler 10 dk ksilen ve 10 dk alkolden geçirilerek suya getirilir.

2. 20 dakika çalışma solüsyonunda bekletilir

3. Çeşme suyunda yıkanır

4. 2 - 3 dakika nötral red de bekletilir

5. Çeşme suyunda yıkanır

6. 5 dk alkol ve 10 dk ksilen den sırasıyla geçerek entellan ve lamel ile kapatılır

*7. Not : Boya her seferinde taze olarak hazırlanır*

**9.5.10. Verhoeff (elastik) boyası**

**Solüsyon A**

*5 gr hematoksilen* ve *100 ml absolü ( % 99’luk ) alkol* karıştırılır

**Solüsyon B**

*10 gr ferrik klorid, 100 ml distile su* da çözülür

**Solüsyon C**

*1 gr iodine, 2 gr potasyum iodid* ve *100 ml distile su* ile karıştırılır

**Çalışma solüsyonu**

Solüsyonun A’dan 20 ml, solüsyonun B’den 8 ml, solüsyonun C’den

8 ml alınıp, karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanır

1. Kesitler 10dk ksilen ve 10dk alkolden geçirilerek suya getirilip

yıkanır.

2. 30 dakika çalışma solüsyonunda bekletilir

3. Çeşme suyunda yıkanır

4. Lam üzerine ferrik klorid solüsyonu damlatılır ve doku rengi biraz açılınca çeşme suyunda yıkanır

5. 1 dakika eozinde bekletilir

6. Çeşme suyunda yıkanır

7. 5 dk alkol ve 10dk ksilen den sırasıyla geçerek entellan ve

lamelle kapatılır

**9.5.11. Toluidin Blue boyası**

**Toluidin blue solüsyonu**

*1 gr toluidin blue, 50 ml isopropanol* (% 50) içinde çözülür ve üzerine *50 ml distile su* eklenir

1. Kesitler 10dk ksilen ve 10dk alkolden geçirilerek suya getirilip

yıkanır.

2. 37 derecede etüvde, toluidin blue solüsyonunda 30 dakika bekletilir

3. Alkolde 1 dakika bekletilir

4. Ksilende 10 dk bekletilip entellan ve lamelle kapatılır

**9.5.12. Orcein boyası**

**Solüsyon A**

*0,2 gr sentetik orsein*

*100 ml % 70 ‘ lik alkol*

*6 ml HCl hepsi karıştırılarak hazırlanır*

**Solüsyon B**

*100 ml buffer veya distile su içine 1 damla giemsa karıştırılarak hazırlanır*

**Solüsyon C**

*% 1’lik alkolik eosin*

1. Kesitler 10 dk ksilen ve 10 dk alkolden geçirilerek suya getirilip

yıkanır.

2. 45 dk solüsyon A’da bekletilir

3. 1 gece solüsyon B’de bekletilir

4. Lam üzerine 1 damla C solüsyonu damlatılır. Kontrol dokusu pembe renk alıncaya kadar bekletilir

5. 10 dk alkol ve 10 dk ksilen den sırasıyla geçerek entellan ve

lamelle kapatılır

**9.5.13. Masson Fontana boyası** *Silver Nitrat % 10‘luk Sodyum Tiosülfat % 5‘lik Nötral Red % 1‘lik*

20 ml % 10 ‘ luk silver nitrat alınır. Üzerine rengi tamamen beyaz olana kadar damla damla amonyak katılır. Üzerine 20 ml distile su eklenir .

1. Kesitler 10 dk ksilen ve 10 dk alkolden geçirilerek suya getirilir.

2. Silver nitrat solüsyonunda oda sıcaklığında 1 gece bekletilir

3. Distile suda yıkanır

4. 2 dakika sodyum tiosülfatta bekletilir

5. Suda yıkanır

6. 3 dakika Nötral Red‘de bekletilir

7. Suda yıkanır

8. 5 dk Alkol ve 10 dk ksilen den sırasıyla geçerek entellan ve

lamel ile kapatılır

**9.5.14. High iron diamine boyası**

*0,12 gr N,N Dimethyl-meta-phenylenediamine-dihydrochloride*

*0,02 gr N,N Dimethyl-para-phenylenediamine-dihydrochloride*

*50 ml distile su*

*1.4 ml Ferrik klorid ( % 60 lık BDH solüsyonu )*

Her iki diamine tuzu distile suda çözülür, ferrik klorid solüsyonu eklenerek karıştırılır

1. Kesitler 10 dk ksilol 10 dk alkolden geçirilerek suya getirilir.

2. Diamine solüsyonunda 18 veya 24 saat bekletilir

3. Akan suda yıkanır

4. Zıt boya için istenirse % 1 lik alcian blue % 3 lük asetik asit içerisinde çözülerek hazırlanan solüsyonunda 5 dakika bekletilir. Zıt boya % 0.5 lik aköz nötral red ile 2 veya 3 dakika boyada tutulur ve yıkanır

6. Absolü alkolde 5 dk tutulur

7. 10 dk ksilende temizlenir ve lamelle kapat ılır

**9.5.15. Rhodanin boyası**

*0,0125 gr Rhodanin*

*6 ml Absolu Alkol*

*94 ml Distile Su*

1. Kesitler 10 dk ksilen 10dk alkol ve akan suda yıkandıktan sonra boyaya hazır hale gelir.

2. Hazırlanan solüsyon 2,5 saat etüvde bekletilir.

3. Daha sonra hazırlanan preparat 30 dk daha bekletilerek boyama yapılır.

4. 3 saat sonunda preparat etüvden alınır.

5. Akan suda yıkanır

6. Meyer hematoksilende 10 saniye tutulur

7. Akan suda yıkanır

8. % 0.5 ‘ lik sodyum borat solüsyonunda 10 saniye tutulur

9. Akan suda yıkanır

10. 5 dk Alkol sonra 10 dk ksilende bekletilip entellan ile kapatılır

**9.5.16. Gomori‘nin methanamin silver boyası**

**Solüsyon A**

*1 gram peryodik asit*

*100 ml Distile su*

**Solüsyon B**

*5 gram tetra borat*

*100 ml Distile su*

**Solüsyon C**

*5 gram silver nitrat*

*100 ml Distile su*

**Solüsyon D**

*3 gram metanamin*

*100 ml Distile su*

**Solüsyon E**

*2 gram Borax*

*100 ml Distile su*

**Solüsyon F**

*5 gram Cheremic asit*

*100 ml Dsitile su*

**Solüsyon C**

*1 gram sodyum bisülfat*

*100 ml distile su*

**Solüsyon H**

*3 gram sodyum thiosülfat*

*100 ml Dsitile su*

**Solüsyon I**

*50 gram light gren*

*0,05 asetik asit*

*100 ml Distile su*

**Methanamine silver nitrat stok solüsyonu**

*5 ml % 5 lik silver nitrat*

*100 ml % 3 lük metanamin karıştırılır*

**Çalışma solüsyonu**

*5 ml borax solüsyonu*

*25 ml distile su*

*25 ml metanamin silver nitrat stok solüsyonu*

1. Hazırlanan kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolde bekletilerek

suya getirilir

2. 1 saat chromic asitte tutulur

3. Akan suda yıkanır

4. Sodyum bisülfat solüsyonunda yıkanır

5. Distile suda çalkalanır

6. 1 saat karanlıkta 60 c de çalışma solüsyonunda tutulur

7. Akan suda yıkanır

8. 4 defa % 0,1 lik gold chloride batırılıp çıkarılır

9. 5 dakika % 3 lük sodyum thiosülfatta tutulur

10. Akan suda yıkanır

11. 20 saniye light greende bekletilir

12. Akan suda yıkanır

13. 5 dk alkol ve 10 dk ksilende bekletilip entellan kapatılır

**9.5.17. Giemsa boyası Stok Solüsyonu** *Giemsa 4 gr Gliserol 250 ml Metanol 250 ml*

60 derecede Giemsa gliserol jel karıştırılır, Metanol ilave edilir, tekrar karıştırılır, 7 gün saklanır ve süzülür

*Giemsa Stok 4 ml*

*Distile su 96 ml karıştırılır*

1. 10 dk ksilen , 10 dk alkolden geçirilip suya getirilir.

2. Distile suda yıkanır

3. Giemsada bir gece bekletilir

4. Distile suda yıkanır

5. % 5‘lik asetik asitte kesit pembe olana kadar bekletilir

6. Suda yıkanır, kurutulur

7. Alkol ve 10 dk ksilenden geçirilir ve entellan kapat ılır.

**9.5.18. Von Giesson boyası**

Solüsyon hazırlanışı

*50 ml Doymuş pikrik asit solüsyonu*

*9 ml % 1 ‘ lik asit fuksin*

*50 ml Distile su karıştırılır*

1. Parafin kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolden geçirilerek suya

getirilir.

2. Hematoksilende 5dk boyanır

3. Suda yıkanır

4. Von Giesson karışımında 1-3 dk bekletilir.

5. Distile suda yıkanır

6. Absolü alkolden hızla geçirilip 10 dk ksilende bekletilip entallan kapatılır.

**9.5.19. Celestine blue boyası**

*2,5 gram Celestine Blue*

*2,5 gram Ferrik Amonyum Sülfat*

*70 ml Gliserin*

*500 ml Distile su ile karıştırılarak solüsyon hazırlanır.*

1. Kesitler 10 dk alkol 10 dk ksilende bekletilerek suya getirilir

2. 5 dakika Celestine Blue da bekletilir

3. Akan suda yıkanır

4. Meyer hematoksilende 5 dakika bekletilir

5. Akan suda yıkanır

6. 3 dakika Von Giesson boyasında bekletilir

7. Yıkamadan kurutulur

8. 5 dk Alkol ve 10 dk ksilende bekletilip entellan kapatılır.

**9.5.20. Best Carmin boyası**

**Best Carmin stok solüsyonu**

*2gr carmin*

*1gr potasyum karbonat*

*5gr potasyum cholorid*

*60 ml distile su ile karıştırılıp kaynatılır.*

Soğuduktan sonra 20 ml amonyak eklenir. Hazırlanan solüsyon süzülür ve +4 derecede saklanır*.*

**Best Carmen çalışma solüsyonu**

*15 ml best carmin stok solüsyonu*

*12,5 ml konsantre amonyak*

*12,5 ml metanol karıştırılarak elde edilir.*

**Best Carmin ayırıcı**

*40 ml metanol*

*80 ml absolü alkol*

*100 ml distile su karıştırılarak elde edilir.*

1. Parafin kesitler 10 dk ksilen 10 dk alkolden geçirilerek suya getirilir

2. 5 dakika hemotoksilen de bekletilir

3. Amonyaklı suya batırılıp çıkarılır

4. 30 dakika best carmende solüsyonunda bekletilir

5. Best carmen ayıracına batırılıp çıkarılır

6. 5 dk alkol ve 10 dk ksilende bekletilip entellan kapatılır.

**9.6. Otomatik Histokimyasal boyama**

**9.6.1.** Laboratuvarda Ventana Bench Mark Spesial Boyama Cihazı kullanılmaktadır.

**9.6.2.** Cihaz bağlı bulunduğu bilgisayar ile açma-kapama butonuna basılarak açılır.

**9.6.3.** Bilgisayarın mas üzerindeki Ventana programı açılır.

**9.6.4.** Laboratuarda kullanılan bütün histokimya boyaları ventana programında uygun şekilde kullanıcı tarafından optimize edilip boyama protokolleri oluşturulduktan sonra sisteme kayıt edilir.

**9.6.5.** Her bir hasta için seçilmiş boyamalar programdaki barkod yazdır bölümünde

etiketler yazdırılır. BU etiketlerin üzerinde biyopsi numarası, boyanın adı, yapıldığı tarih

ve doktor adı kayıtlı olmalıdır. Daha sonra kesilmiş lamlar etiketlenir.

**9.6.6.** Ekrana gelen kontrol uyarılarına göre cihazda takılı bulunan WASH, LCS, DEPAR

VE OPTİONS bidonları kullanma talimatlarına göre doldurulur. Atık bidonunun seviyesi

kontrol edilir. Bidonlar cihaza tanıtılır.

**9.6.7.** Hastalara ait lamlar cihazın tepsisine barkod okuyucunun okuyabileceği şekilde yerleştirilir. İlk kullanımda histokimya boyama kitleri cihaza tanıtılmalıdır.

**9.6.8.** Cihaz üzerine yapılacak boyalara ait kitler takılır. Programdaki başlat butonu tıklanır. Cihazda kaç adet lam çalışılacağı seçilir ve boyama işlemi başlatılır. Her bir boyama protokolüne göre boyama süreleri değişkenlik gösterir ve maksimum 2 saatte boyama işlemi tamamlanır.

**9.6.9.** Sonrasında lamlar cihazdan alınıp sepete dizilir. 5 dakika alkol ve 10 dakika ksilende bekletilerek kapama işlemleri yapılır.

**9.6.10.** Haftada bir defa boyama işlemleri sonrası clean-kiti takılarak programda yıkama işlemi seçilir ve uygulanır.

**9.7. Manuel immünhistokimyasal boyama**

**9.7.1.**İmmunhistokimya (IHC) tanı amaçlı olarak laboratuarda kullanılan bir tekniktir. IHC’nın temeli, doku kesitlerindeki antijenlerin spesifik primer antikorlar kullanılarak açığa çıkartılmasına dayanır.

**9.7.2.**Formalinde tespit edilmiş ve parafin blok haline getirilmiş dokulardan 4 mikron kalınlığında düzgün kesitler pozitif şarjlı lam üzerine alınır.

**9.7.3.**Lamlar 60 C’lik etüvde 1 saat bekletilerek parafinler eritilir.

**9.7.4.**Dokuların hidrasyonu

• Lamlar ksilolde 15 dakika

• % 100’lük etanolde 5 dakika,

• % 96’lık alkolde 5 dakika,

• % 70’lik alkolde 5 dakika bekletilir,

• Distile suda 10 dakika yıkanır.

**9.7.5.**Tripsin uygulaması

• Gerekli olan primer antikorlar için lamlara Tripsin solüsyonu

damlatılarak, 10 dakika bekletilir,

• Distile suda 5 dakika yıkanır

**9.7.6.**Antijen retrieval uygulaması

• Antijen retrieval solüsyonu (Citrat veya Edta buffer) şişe üzerinde belirtilen dilüsyona göre sulandırılarak hazırlanır,

• Solusyon içerisindeki lamlar 10 dakika % 50’lik güç seviyesinde

mikrodalgada ısıtılır, ardından soğumaya bırakılır,

• 5 dakika distile suda yıkanır.

**9.7.7.**Hidrojen Peroksit uygulaması

• Lamlara % 3’lük H2O2 damlatılıp ve 10dakika bekletilir,

• 5 dakika distile suda yıkanır,

• Daha sonra lamlar 5 dakika Fosfat Buffer’da (PBS) yıkanır.

**9.7.8.**Blok solusyonu uygulaması

• Lamlara dokunun üzerini kapatacak şekilde blok solusyonu damlatılır ve 10 dakika bekletilir,

• Ardından lamlar yıkanmadan primer antikor damlatılır.

**9.7.9.**Primer antikor uygulaması

• Primer antikor kullanma klavuzunda belirtilen dilüsyon ve süreler göz önüne alınarak kullanıcı tarafından optimize edilen primer antikor uygun miktarda dilüe edilir,

• Lamlara primer antikor mikro pipet yardımıyla damlatılıp,

inkübasyon süresince bekletilir,

• Daha sonra 10 dakika PBS’de yıkanır.

**9.7.10.** Biotin uygulaması

• Sekonder antikorlar içerisinde bulunan Biotin solüsyonu damlatılır ve 10 dakika bekletilir,

• 10 dakika PBS’de lamlar yıkanır.

**9.7.11.** Streptavidin uygulaması

• Sekonder antikorlar içerisinde bulunan Streptavidin

solüsyonundan damlatıp, 10 dakika beklenir,

• 10 dakika PBS’de lamlar yıkanır.

**9.7.12.** Kromojen uygulaması

• Kromojen, kullanma klavuzunda belirtildiği şekilde hazırlanır ve

30 dakika içerisinde kullanılması gereklidir,

• Hazırlanan kromojen lamlara damlatılır ve 10 dakika bekletilir,

• Ardından lamlar 10 dakika distile suda yıkanır.

**9.7.13.** Meyer Hematoksilen uygulaması

• Lamlara Meyer hematoksilen damlatılır ve 2 dakika bekletilir,

• 5 dakika distile suda yıkanır.

**9.7.14.** Dokuların Dehidrasyonu

• Lamlar %70’lik alkolde 50 dakika bekletilir,

• %96’lık alkolde 5 dakika bekletilir,

• %100’lük alkolde 5 dakika bekletilir,

• Daha sonra lamlar entellan ile kapatılır ve ışık mikroskobunda değerlendirilir.

**9.8. Otomatik immünhistokimyasal boyama**

**9.8.1.** Ventana stainer ile uyumlu kitler ve programlar kullanarak

Immünohistokimyasal boyamalar yapılır

**9.8.2.** Ventana Benchmark XT immunhistokimya boyama cihazı ile yapılmaktadır

**9.8.3.** Cihaza bağlı bulunan bilgisayar açılır,

**9.8.4.** Cihazların sol alt bölmesinde bulunan açma/kapama düğmesi 1

konumuna getirilir,

**9.8.5.** Bilgisayarda masa üzerinde bulunan Nexes programı açılır, bu programda aynı anda iki veya daha fazla cihaz çalıştırılabilir.

**9.8.6.** Laboratuvarda kullanılan bütün antikorlar Nexes programına uygun şekilde kullanıcı tarafından optimize edilip, protokoller oluşturduktan sonra kayıt edilir,

**9.8.7.** Her bir hasta için seçilmiş olan antikorlar için programdaki barkod yazdır bölümünde etiketler yazdırılır. Bu etiketlerin üzerinde biyopsi numarası, antikor adı, boyanın yapıldığı tarih ve doktor adı kayıtlı olmalıdır. Daha sonra lamlar etiketlenir.

**9.8.8.** Daha sonra lizinli lamlara alınan hastalara ait doku örnekleri cihazın tepsisine yerleştirildikten sonra cihazın üst dış bölmesinede bu lamlara uygulanacak antikorlar ve kit (Universal DAB Detection Kit, Hematoksilen, Bluıng reagent, Proteaz , Amplifıer AB) birlikte konur.

**9.8.9.** Cihazın alt kısmında bulunan afm’lere EZ Prep, SSC, Reaction

Buffer (Dilue edilir)ve LCS, CC1, CC2, Option (Kullanıma hazır) ürünleri kaydet düğmesinde kaydedildikten sonra solusyonlar bidonlara doldurulur.

**9.8.10.** Programdaki sağda bulunan işlemi başlat butonu tıklanır, cihazda kaç adet lam çalışılacağı şeçilir ve boyama işlemi başlatılır. Yaklaşık olarak 4,5-5 saatte boyama işlemi sonuçlanır.

**9.8.11.** Ardından lamlar sepete alınır ve sabunlu suda yıkanıp, artan alkol serilerinden geçirilir ve entellan ile kapatılarak mikroskopta değerlendirmeye alınır.

**9.8.12.** Cihaza haftada bir boyama işlemleri tamamlandıktan sonra programdaki temizle butonuna basılarak yıkama işlemi uygulanır.

**9.9. Sitolojik değerlendirme**

**9.9.1. Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) örneklerinin çalışılması**

**9.9.1.1.** BOS numunesi çalışılırken gönderilen numune cytospin 4 cihaza uyumlu kitler kullanılarak 800 pm6 da 4 dakika santifüj edilerek 2 adet lama yayma yapılır.

**9.9.1.2.** Bu lamlar kurutulduktan sonra 1 adet may-grünwald-giemsa

boyası elde boyanır.

**9.9.1.3.** Diğer lam ise PAP boyanır.

**9.9.2. İdrar örneklerinin çalışılması**

**9.9.2.1.** İdrar numunesi çalışılırken numuneyle birlikte gönderilen hasta kağıdına numunenin makroskopik olarak görüntüsü ve miktarı yazılır.

**9.9.2.2.** Daha sonra santrifüj cihazında 2500 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.

**9.9.2.3.** Üstteki süpernatan kısmı atılarak tabandaki çöken pellet

kısmından 3-5 cc kadarı kullanılır.

**9.9.2.4.** Eğer idrarda santrifüj sonrasında pellek kısmı kanlı ise 3 cc kadar Red Collection Fluid ilave edilerek yarım saat bekletilerek kan hücrelerinin parçalanması sağlanır. Ondan sonra işleme tabi tutulur.

**9.9.2.5.** Cyto Spin 4 cihaza uyumlu kitler kullanılarak 1000 rpm de 15 dakika santrifüj edilerek lama yayılır.

**9.9.2.6.** Lam kurutulduktan sonra PAP boyanır.

**9.9.3. Plevra, periton,batin içi mayi, eklem sıvısı örneklerinin çalışılması**

**9.9.3.1.** Plevra, periton, batin içi mayi, eklem sıvısı gibi vücut sıvaları numuneyle birlikte gönderilen hasta kağıtlarına numunenin makroskopik olarak görüntüsü ve miktarı kaydedilir.

**9.9.3.2.** Daha sonra bu sıvılar santrifüj cihazında 2500 rpm de 5 dakika

santrifüj edilir.

**9.9.3.3.** Santrifüj edildikten sonra üstteki süpernetan kısmı atılarak tabanda kalan pellet kısmından 2 adet lama Giemsa boyanmak için elde yayma yapılır.

**9.9.3.4.** Bunlar kurutulduktan may-grünwald-giemsa boyanır.

**9.9.3.5.** Geriye kalan pellet kısmını eğer kanlı ise 3 cc kadar Red

Collection Fluid konularak yarım saat tespit için beklenir.

**9.9.3.6.** Kanlı değilse Yellow Collection Fluid Solüsyonundan 3 cc kadar ilave edilerek yarım saat tespit için beklenir.

**9.9.3.7.** 30 dk sonunda Cyto spin 4 cihaza uyumlu kitler kullanılarak

1000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek lama yayma yapılır.

**9.9.3.8.** Lam kuruyunca PAP boyanır

**9.9.4. Bronkoalveolar lavaj örneklerinin çalışılması**

**9.9.4.1.** Bronkoalveolar lavaj numunesi çalışılırken numuneyle birlikte gönderilen hasta kağıdına numunenin makroskopik olarak görüntüsü ve miktarı kaydedilir.

**9.9.4.2.** Çöken pellet kısmından 2 adet lama elde yayma yapılarak

lameller kurutulduktan sonra may-grünwald-giemsa boyanır.

**9.9.4.3.** Kalan pellet kısmından nonjinekolojik Thin prepsolüsyonuna 2-

3 damla konularak yarım saat bekletilir.

**9.9.4.4.** 30 dk sonunda thin prep cihazında 3. programda lama yayma

yapılarak PAP boyanır

**9.9.5. Jinekolojik smear örneklerinin çalışılması**

**9.9.5.1.** Smear örnekleri jinekolojik thin prep solüsyonunda gönderirler bu numuneler thin prep cihazında 4. programda lama yayılarak PAP boyanır

**9.9.6. İnce iğne aspirasyonlarının çalışılması**

**9.9.6.1.** Aspirasyonlar, lama yayılmış olarak gönderilen aspirasyon materyalleri hasta kağıdında kaç lam geldiği kaydedildikten sonra elde may-grünwald-giemsa boyanır.

**9.9.7. Hücre bloğu hazırlanması**

**9.9.7.1.** Gönderilen vücut sıvıları santrifüj edildikten sonra bazı örneklerde hücreler bir araya gelerek doku görünümde bir yapı oluştururlar, bu da kasetlenerek doku takibine alınır.

**9.9.7.2.** Takipten sonra bloklanarak dondurulduktan sonra mikrotom ile 5 mikron kalınlığında kesit alınarak lama alınır ve hemotoksilen eozin boyanır.

**9.9.7.3.** Diğer PAP ve may-grünwald-giemsa lamlarının yanına ilave

edilir.

**9.9.8. May-grünwald-giemsa boyama protokolü**

**9.9.8.1.** May-grünwald boyası direk olarak kullanılır.

**9.9.8.2.** Giemsa boyası ise ½ oranında distile su ile dilue edilerek hazırlanır.

**9.9.8.3.** Lamlar 5 dk may-grünwald boyasında tutulur.

**9.9.8.4.** 5 dk sonunda musluk suyuyla yıkanır

**9.9.8.5.** Giemsa boyasında 20 dk bekletilir.

**9.9.8.6.** Musluk suyuyla yıkanır ve kurutulur

**9.9.9. Papanicolau (PAP) boyama protokolü**

**9.9.9.1.** %70 lik etil alkol-20 saniye

**9.9.9.2.** %50 lik etil alkol-1 dk

**9.9.9.3.** Distile su- 1 dk

**9.9.9.4.** Thin prep nükleer stain-1 dk

**9.9.9.5.** Distile su-10 saniye

**9.9.9.6.** Thin prep rinse solüsyonu -1 dk

**9.9.9.7.** Distile su-30 saniye

**9.9.9.8.** Thin prep bluing solüsyonu -30 saniye

**9.9.9.9.** Distile su-30 saniye

**9.9.9.10.** %50 lik etil alkol-30 saniye

**9.9.9.11.** %95 lik etil alkol-30 saniye

**9.9.9.12.** Thin prep orange 6 solüsyonu -2 dk

**9.9.9.13.** %95 lik etil alkol-15 saniye

**9.9.9.14.** %95 lik etil alkol-15 saniye

**9.9.9.15.** Thin prep EA solüsyonu-4 dk

**9.9.9.16.** %95 lik etil alkol-1 dk

**9.9.9.17.** %95 lik etil alkol-1 dk

**9.9.9.18.** %100 lük etil alkol-30 saniye

**9.9.9.19.** %100 lük etil alkol-30 saniye

**9.9.9.20.** %100 lük etil alkol-30 saniye

**9.9.9.21.** Ksilen-1dk

**9.9.9.22.** Ksilen-3dk

**9.10. İmünfloresan boyama**

**9.10.1.** Dokular(deri ve böbrek) serum fizyolojik içerisinde laboratuvara

gönderilir.

**9.10.2.** Böbrek biyopsileri ışık mikroskobunda incelenerek glomerul içerip içermedikleri tespit edilir.

**9.10.3.** Glomerül içeren kısımdan en az 2mm olacak şekilde bir kısım ayrılıp demir kasetlere alınarak frozen sction medium içerisine gömülür ve üzerine biyopsi numarası etiketlenerek frozen cihazı içerisinde donmaya bırakılır.

şekilde yan yatırılarak frozen section medium içerisine gömülür ve üzerine biyopsi numarası etiketlenerek frozen cihazı içerisinde donmaya bırakılır.

**9.10.5.** Kesit işlemi için böbrek dokularına dokuz (C3C, IgG ,IgA, IgM, C4C, C1q, Kappa, Lambda antikorları için), deri dokularına dört (C3C, IgG, IgA, IgM antikorları için) lizinli lam hazırlanır. Lamların rodajlı kısmına biyopsi numarası ve hangi antikorla muamele edileceği yazılır.

**9.10.6.** Hazırlanan lamlara donan dokulardan frozen cihazında beş mikron kalınlığında iki sıra kesit yapılır.

**9.10.7.** Kesitten artan böbrek dokuları alüminyum folyo ile sarılıp üzerine biyopsi no yazılarak; gerekli görülürse tekrar kullanılmak üzere -20 derecede en az bir yıl saklanır.

**9.10.8.** Kesitten artan deri dokuları su ile yıkanıp frozen section medium

‘dan arındırılır ve histokimyasal işlemler için formol takibe alınır.

**9.10.9.** Kesit işleminden sonra boyama için kullanılacak antikorlar fosfat buffer ile dilue edilerek hazırlanır.

**9.10.10.** Boyam işleminden önce lamlardaki dokular , lamın arka yüzeyinden işaret kalemi ile işaretlenir (böbrek için hazırlanan lamlardan biri hematoksilen eozin ile boyanır).

**9.10.11.** İşaretlenen lamlar nemli chamber içine yerleştirilir. Chamber içine yaklaşık 100 ml çeşme suyu dökülür.

**9.10.12.** Chamber içerisine yerleştirilen lamlara sadece dokunun bulunduğu yere dokunun üzerini kapatacak şekilde mikropipet kullanılarak uygun antikor damlatılır; bir saat karanlık ortamda bekletilir.Boyama işleminde kullanılan antikorlar buzdolabında +4 derecede saklanır.

**9.10.13.** Bır saat sonra bütün lamlar fosfat buffer içeren kapta hafifçe

çalkalanarak yıkanır.

**9.10.14.** Yıkanan lamlar , üzerine sıvı bazlı bir kapatıcı damlatılarak lamel ile

kapatılır.

**9.10.15.** Boyanmış lamlar ışık geçirmeyen kapaklı karton mapelerle immun floresan mikroskobunda incelenmek üzere buzdolabında +4 derecede saklanır.

**9.11. Moleküler patoloji testleri**

**9.11.1. Dokudan nükleik asit izolasyonu**

**9.11.1.1.** Bir bistüri ile fazla parafini bloktan sıyır.

**9.11.1.2.** 4 adet 5 µm kalınlığında parafin kesitlerinin temiz bıçak kullanılarak cama kesitler hanlinde alınır.

**9.11.1.3.** Cama alınan kesitler 60 Cº de 45 dk etüve bırakılır

**9.11.1.4.** Cama alınan kesitler 15 dk ksilende tutulur.

**9.11.1.5.** Cama alınan kesitler 5 dk %100 etil alkolde tutulur.

**9.11.1.6.** Cama alınan kesitler 5 dk % 96 etil alkolde tutulur.

**9.11.1.7.** Cama alınan kesitler 5 dk %70 etil alkolde tutulur.

**9.11.1.8.** Cama alınan kesitler 5 dk distile suda tutulur.

**9.11.1.9.** Cama alınan kesitler kurumaya burakılır.

**9.11.1.10.**Üzerine 180 μl Buffer ATL eklenir. 20 μl proteinaz K

eklenerek voteksle karıştırılır.

**9.11.1.11.**56 Cº’de 1 saat (veya örnek tamamen eriyene kadar)

inkübe edilir

**9.11.1.12.**90 Cº’de 1 saat inkübe edilir.

**9.11.1.13.**ATL buffer ile 90 Cº’de inkübasyon formaldehidin nükleik asit üzerine etkisini geri döndürebilir ancak sürenin uzaması veya ısının artması DNA ın daha çok fragmante olmasına neden olur.

**9.11.1.14.**Eğer sadece bir ısı bloğu kullanılırsa 56 Cº inkübasyondan

sonra örneği, blok 90 Cº’ye ulaşana kadar oda ısısında

bekletilir.

**9.11.1.15.**Tüpler quick spin (3000 rpm) yapılır (kapaktaki damlaların ayrılması için)

**9.11.1.16.**RNA-free genomic DNA lazımda 2 μl RNase A (100 mg/ml) ekle ve oda ısısında 2 dk bekletilir. RNase A eklemeden önce örneği oda ısısına kadar soğutulur.

**9.11.1.17.**Tüplerin üzerine 200 μl Buffer AL eklenir ve 15 sn. pulse- vorteks ile karıştırılır. Tüpler quick spin yapılır. Tüplere 200 μl % 96-100 etanol eklenir ve 15 sn. pulse-vorteks ile karıştırılır. Tüpler quick spin yapılır.

**9.11.1.18.**1,5 ml tüp quick spin (3000 rpm) yapılır

**9.11.1.19.**dikkatli bir şekilde QIAamp MinElute 2 ml collection tüplere yerleştirilmiş spin kolonlara aktarılır, kapağı kapatılır ve

8000 rpm’de 1 dak. santrifuj edilir. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılır. Flow-through içeren collection tüpler atılır

**9.11.1.20.**Santrifüj sonrası tüp içeriğinin tamamı membranı geçmezse, kolon tamamen boşalana kadar yüksek hızda yeniden santrifüj edilir

**9.11.1.21.**QIAamp MinElute kolonunu dikkatle aç, 500 μl AW1 buffer eklenir (kenar ıslanmadan) kapağı kapatılarak ve 8000 rpm’de 1 dak. santrifuj edilir. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılır. Flow-through içeren collection tüpler atılır

**9.11.1.22.**QIAamp MinElute kolonunu dikkatle aç, 500 μl AW2 buffer eklenir (kenar ıslanmadan) kapağı kapatılarak ve 8000 rpm’de 1 dak. santrifuj edilir. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılır. Flow-through içeren collection tüpler atılır

önlenmelidir. Bazı santrifüj rotorları yavaşlarken titreşir ve bu temasa neden olabilir. Rotordan QIAamp MinElute kolon ile collection tüpü alırken dikkatli olunmalıdır.

**9.11.1.24.**Membranın kuruması için tam hızda (14000 rpm) 3 dk santrifüj yapılır.

**9.11.1.25.**QIAamp MinElute kolonunu temiz 1.5 ml’lik bie tüp içine koyulur, Flow-through içeren collection tüpler atılır. QIAamp MinElute kolonunun kapağı dikkatli bir şekilde açılır, membranın ortasına 20-100 μl ATE buffer uygulanır.

**9.11.1.26.**21. Kapağı kapat, oda ısısında 1 dk beklet. Tam hızda

(14000 rpm) 1 dk santrifüj edilir.

**9.11.2. Servikal smearden nükleik asit izolasyonu**

**9.11.2.1.** Smear dokusu vorteksle karıştırılır.

**9.11.2.2.** Smear dokusu 1.5 ml mikrosantrifuj tüpleri (ependorf tüp)

içine aktarılır.

**9.11.2.3.** Oda ısısında ve tam hızda (13000 rpm) 5 dk satrifüj edilir

**9.11.2.4.** Süpernatant kısım atılır. Üzerine 180 μl Buffer ATL eklenir.

20 μl proteinaz K eklenerek voteksle karıştırılır.

**9.11.2.5.** 56 Cº’de 1 saat (veya örnek tamamen eriyene kadar)

inkübe edilir (Aradabir çalkalama yapılırsa verimlilik artar)

**9.11.2.6.** 90 Cº’de 1 saat inkübe edilir.

**9.11.2.7.** ATL buffer ile 90 Cº’de inkübasyon formaldehidin nükleik asit üzerine etkisini geri döndürebilir ancak sürenin uzaması veya ısının artması DNA ın daha çok fragmante olmasına neden olur.

**9.11.2.8.** Eğer sadece bir ısı bloğu kullanılırsa 56 Cº inkübasyondan

sonra örneği, blok 90 Cº’ye ulaşana kadar oda ısısında

bekletilir.

**9.11.2.9.** Tüpler quick spin (3000 rpm) yapılır (kapaktaki damlaların ayrılması için)

**9.11.2.10.**RNA-free genomic DNA lazımda 2 μl RNase A (100 mg/ml) ekle ve oda ısısında 2 dk bekle. RNase A eklemeden önce örneği oda ısısına kadar soğut.

**9.11.2.11.**Tüplerin üzerine 200 μl Buffer AL eklenir ve 15 sn. pulse- vorteks ile karıştırılır. Tüpler quick spin yapılır. Tüplere 200 μl % 96-100 etanol eklenir ve 15 sn. pulse-vorteks ile karıştırılır. Tüpler quick spin yapılır.

**9.11.2.12.**Örnek, AL buffer ve etanolün hızla ve iyice karıştırılması

önemlidir. Homojen bir karışım elde edilmelidir. Buffer ve

etanol önceden karıştırılıp beraberce bir seferde eklenip

zaman kazanılabilir.

**9.11.2.13.**Buffer AL ve etanol karışımında beyaz bir çökelti oluşabilir.

Bu çökelti QIAamp işlemine etki etmez.

**9.11.2.14.**1,5 ml tüp quick spin (3000 rpm) yapılır (kapaktaki damlaların ayrılması için)

**9.11.2.15.**10. Tüplerin içeriği, kenarı ıslatmadan, dikkatli bir şekilde QIAamp MinElute 2 ml collection tüplere yerleştirilmiş spin kolonlara aktarılır, kapağı kapatılır ve 8000 rpm’de 1 dak. santrifuj edilir. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılır. Flow-through içeren collection tüpler atılır

**9.11.2.16.**Santrifüj sonrası tüp içeriğinin tamamı membranı geçmezse, kolon tamamen boşalana kadar yüksek hızda yeniden santrifüj edilir.

**9.11.2.17.**QIAamp MinElute kolonunu dikkatle aç, 500 μl AW1 buffer eklenir (kenar ıslanmadan) kapağı kapatılarak ve 8000 rpm’de 1 dak. santrifuj edilir. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılır. Flow-through içeren collection tüpler atılır

**9.11.2.18.**QIAamp MinElute kolonunu dikkatle aç, 500 μl AW2 buffer eklenir (kenar ıslanmadan) kapağı kapatılarak ve 8000 rpm’de 1 dak. santrifuj edilir. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılır. Flow-through içeren collection tüpler atılır

**9.11.2.19.**QIAamp MinElute kolon ile Flow-through teması önlenmelidir. Bazı santrifüj rotorları yavaşlarken titreşir ve bu temasa nedenolabilir. Rotordan QIAamp MinElute kolon ile collection tüpü alırken dikkatli olunmalıdır.

**9.11.2.20.**Membranın kuruması için tam hızda (14000 rpm) 3 dk

santrifüj yapılır.

**9.11.2.21.**QIAamp MinElute kolonunu temiz 1.5 ml’lik bie tüp içine koyulur, Flow-through içeren collection tüpler atılır. QIAamp MinElute kolonunun kapağı dikkatli bir şekilde açılır, membranın ortasına 20-100 μl ATE buffer uygulanır.

**9.11.2.22.**15. Kapağı kapat, oda ısısında 1 dk beklet. Tam hızda

(14000 rpm) 1 dk santrifüj edilir.

**9.11.3. EGFR, KRAS, BRAF mutasyon analizi**

**9.11.3.1.** DNA İzolasyonu yapılmış dokulardan PCR konur.

**9.11.3.2.** GML PCR Mix den 7.5 μl ,GML Taq Polimeraz dan 0.2 μl, EGFR Primer Mix (ekzon 18,19,20 ve 21) den 1 μl , G/C Enhancer 2 μl , Distile Su 3 μl ve 1.5 μl DNA karıştırılır.

**9.11.3.3.** Toplam 15 μl olacak şekilde PCR tüpüne pipetlenir.

**9.11.3.4.** Ürünler PCR cihazına yüklenir.

**9.11.3.5.** Aktivasyon için 95ºC de 10dk bekletilir

**9.11.3.6.** Amfilikasyon için 95ºC 40 sn, 60ºC 1 dk, 72ºC 50 sn bekletilir ve 35 kez tekrarlanır

**9.11.3.7.** Final genişleme için 72 ºC 7 dk bekletilir.

**9.11.3.8.** 4-20 ºC de muhafaza edilir.

**9.11.3.9.** PCR ürünlerinin jelde yürütülüp kalitesine bakılır.

**9.11.3.10.**Kalitesi yeterli olan PCR ürünleri temizleme basamağına alınır.

**9.11.3.11.**2 μl ExoSAP-IT ile 5 μl PCR ürünü karıştırılır.

**9.11.3.12.**Ürünler PCR cihazına yüklenir.

**9.11.3.13.**Enzim inkubasyonu için 37 ºC de 30 dk bekletilir.

**9.11.3.14.**Enzim inaktivasyonu için 80 ºC de 15 dk bekletilir.

**9.11.3.15.**4-20 ºC de muhafaza edilir.

**9.11.3.16.**Cihazdan çıkan ExoSAP-IT ürünleri sekans işlemine alınır.

**9.11.3.17.**Dye Terminator Mix den 2 μl , Sequencing Bufer den 2 μl, Sequencing F Primer den 2 μl veya Sequencing R Primer den 2 μl , distile sudan 2 μl ve ExoSAP-IT ürününden 2 μl karıştırlır.

**9.11.3.18.**Toplam 25 μl olacak şekilde PCR tüpüne pipetlenir.

**9.11.3.19.**Ürünler PCR cihazına yüklenir.

**9.11.3.20.**Aktivasyon için 96ºC de 1dk bekletilir

**9.11.3.21.**Amfilikasyon için 96ºC 10 sn , 50ºC 5 sn, 60ºC 4 dk bekletilir ve 25 kez tekrarlanır bekletilir

**9.11.3.22.**4-20 ºC) de muhafaza edilir.

**9.11.3.23.**Sekans ürünleri Purifikasyon basamağına alınır.

**9.11.3.24.**600 Sephadex (1gr. Sephadex + 14 ml distile su) 2 ml kolona alınır

**9.11.3.25.**5200 rpm de 3 dk santifiruj edilir

**9.11.3.26.**çöken sıvı kısım atılır, üzerine sekans ürünleri konup 5200

rpm de 3 dk santifiruj edilir

**9.11.3.27.**Çıkan ürünler ABI 310 cihazına yüklenir ve yürütülür.

**9.12.** **FISH (ALK, ROS, C-MYC, BCL-6, BCL-2 vb.) ANALİZİ:**

**9.12.1.** Lamlara 2-4 mikron kalınlığında kesilmiş olan dokular 60˚c etüvde 1 gece bekletilir. preparatları aldıktan sonra etüvün ısısı 37˚c ayarlanır. 50’lik falkonlardan 2 tane distile su konulur.

**9.12.2.** Bir günün sonunda ksilol serilerinden üç kez 10dk bekletilir.

**9.12.3.** %100 etanolen serilerinden iki kez 5 dk bekletilir.(bu aşamada bekletilebilir.)

**9.12.4.** Prepatlar kurumaya bırakılır.

**9.12.5.** Su banyosu 80˚c ‘ ye ayarlanır ve 80˚c ‘ye gelince ön yıkama solüsyonu plastik şale içinde yaklaşık 10 dk bekletilir. prepatların kuruduğundan emin olduktan sonra birbirinin yüzüne değmeyecek şekilde yerleştirilir ve 30 dk bekletilir.

**9.12.6.** Su banyosundan sonra preparatlar distile su ile yıkanır ve kurumaya bırakılır. bu sırada önceden etüve koyduğumuz 15 cc su+150mikrolitre hcı enzim içine konulur.(0,06gr enzim için 5 cc distile su , 150 mikrolitre hcı 10cc distile su eklenir.)

**9.12.7.** Preparatlar kuruduktan sonra etüvdeki çözeltinin 37 ˚c ‘de olduğundan emin olduktan sonra preparatlar yerleştirilir ve 30 dk etüvde kalır.

**9.12.8.** Etüvden sonra distile suda iyice yıkanır.

**9.12.9.**Preparatlar yatay şaleye dizilir ve üzerine 2\*ssc pastör pipeti ile damlatılır 3 dk beklenir ve toplamda 3 defa bu işlem yapılır.

**9.12.10.** Daha sonra alkol (%70,%85,%100) serilerinden 3dk bekletilir sonra kurutulur.

**9.12.11.** Kuruduktan sonra karanlıkta problama ( alk, ros, myc,ewsr, 1p36/1q25 19q13/19p13, ss18, her2, bcl2, bcl6, mycep8 )işlemine geçilir. sonra lamelle kapatılır ve rubber ile yapıştırılıp.

**9.12.12.** 73˚c 5 dk /37 ˚c 16 saat , termobrite 2. programa ayarlanır.

**9.12.13.** Ertesi sabah 2 tane şale hazırlanır. (45 distile su,5 cc 20\*ssc ,150 mikrolitre np40)

bir tanesi dışarda diğeri 73˚c olan su banyosuna konulur.

**9.12.14.** Thermobriteden çıkan lamlar 2 dk su banyosunda bekletilir. sonra dışarda bekleyen çözeltiden iyice karıştırılır.

**9.12.15.** Kuruduktan sonra doku yerleri belli olması için cam yazarla çizilir ve dapi damlatılıp -20 ‘de saklanır.

**9.12.16.** Mikroskopta bakıldıktan sonra + 4 de saklanır.

**notlar**

1. Enzim ,prob,dapi önce santrifüj sonra vorteks yapılır.
2. Probtan önce ve sonra cam yazarla yer belirlenir.
3. Sürekli sıcaklık kontrolü yapılır.
4. Thermobrite konulacak beyaz kartonlar ıslak olması lazım.
5. Hazır olmayan problar için( 3,5 buffer , 1 distile su, 0,5 probe )
6. 200 mikrolitre yazan hazır probtandan 5 mikron damlatılır.

**9.13. Preparatların mikroskopik olarak incelenmesi**

**9.13.1.** Doku örneklerinden hazırlanan preparatlar ışık mikroskobi altında incelenir.

**9.13.2.** Patoloji Asistanları dokuları ön inceleme işlemleri için birvgün

önceden teslim alırlar.

**9.13.3.** Bir sonraki gün patoloji uzmanı ile birlikte dokular tekrar ışık mikroskobu altında incelenir.

**9.13.4.** İncelenen preparatlar patolok tarafından hematoksilen–eozin kesitlerde tanısal olarak nitelendirilirse kesin tanıya gidilir ve patoloji raporu oluşturulur.

**9.13.5.** Hematoksilen eozin kesitler ilave histokimyasal ve

immünhistokimyasal çalışmalar yapılmasını gerektiyor ise

yapılacak ek çalışmalar neticesinde veya yeni kesitler neticesinde doku tekrar incelenerek patolojik tanılar verilir.

**9.14. Kalite kontrol çalışmaları**

**9.14.1.** Laboratuvar işlemlerinin kalite güvenirliliği sağlanır.

**9.14.2.** Histokimyasal, immünohistokimyasal ve hematoksilen-eozin

boyama işlemleri kontrol dokuları ile birlikte yapılır.

**9.14.3.** Tıbbi cihazların uygun çalışmaların aylık periyotlarla gözden

geçirilir.

**9.14.4.** Raporlama sürelerinin gözden geçirilir.

**9.14.5.** Laboratuvar işlem sürelerinin gözden geçirilir

**9.14.6.** Laboratuvar girdi ve çıktılarının kontrol edilir.

**9.14.7.** Dokularda oluşabilecek hasarların kaydedilip tekrar gözden geçirilir

**9.15. Patoloji raporlarının hazırlanması**

**9.15.1.** Patoloji uzmanı tarafından hazırlanan patoloji raporları bilgisayar ortamında otomasyon sistemine yazılır.

**9.15.2.** Yazılan raporlar patoloji asistanı ve patoloji uzmanı tarafından kontrol edilir ve onaylanır.

**9.15.3.** Elektronik olarak yedeklenen raporlar aynı zamanda 2 nüsha kağıt baskısı alınarak 1 tanesi rapor arşivine, diğeri hastaya verilmek üzere imzalanır.

**9.16. Panik tanı kriterleri ve bildirimi**

**9.16.1.** Patoloji bölümü *panik tanıları* klinik olarak ön görülmeyen ancak hastanın tedavi izlenimi ciddi ve akut şekilde etkileyecek durumları kapsayan ve acil olarak klinik hekimine iletilmesi gereken tanıları kapsamaktadır.

**9.16.2.** Lökositoklastik Vaskülit

**9.16.3.** Villus veya Trofoblast içermeyen küretaj örnekleri

**9.16.4.** Transplant rejeksiyonu

**9.16.5.** Frozen tanı ve kalıcı kesitlerdeki tanı uyuşmazlıkları

**9.16.6.** İnce iğne aspirasyon tanısı ile doku tanısı arasındaki uyumsuzluk

**9.16.7.** Klinik olarak benign ön tanıyla gönderilmiş ve biyopsilerin malign

tanısı almış olgular.

**9.16.8.** Beyin omurilik sıvısı, kemik iliği ve kalp kapağı dokusunda bakteri

veya fungal mikroorganizma görülmesi

**9.16.9.** İmmünsupresif olgularda viral, fungal ve bakteri enfeksiyonların saptanması

**9.16.10.** Panik tanılar tanı veren patoloji uzmanı veya asistanı tarafından klinikteki hekime telefonla bildirilir.

**9.16.11.** Bildirimi yapan kişi, bildirim yapılan kişi, bildirim tarih ve saati, panik tanı ile birlikte kaydedilir.

**9.17. Sonuçların hastaya ve hekime ulaştırılması**

**9.17.1.** İlgili raporlar ayaktan hastalar için hasta ve hasta yakınları tarafından patoloji örnek kabul biriminden alınır.

**9.17.2.** Yatan hastaların raporları ise ilgili servislerin görevlileri tarafından teslim alınır.

**9.18. Blok, preparat ve rapor arşivi**

**9.18.1.** Arşivleme işlemi patoloji laboratuvarı arşivleme süreci talimatına uygun olarak yapılır.

**9.18.2.** Bloklar en az 20 yıl süreyle, lamlar en az 10 yıl süreyle + 18-25

derece oda sıcaklığında saklanır.

**9.18.3.** Patoloji raporlarının yazımı ve elektronik kayıtları süresiz olarak saklanır.

**9.18.4.** Hastalara ait doku örnekleri laboratuvara geliş tarihinden itibaren

en az 1 ay süreyle formaldehit içinde saklanır.

**9.18.5.** Hasta veya hasta hekimi tarafından istenilen hastaya ait blok ve lamlar patoloji laboratuvarı arşivleme süreci talimatına uygun olarak teslim edilmektedir.

**10. İntraoperatif konsültasyon (Frozen kesit) prosedürü**

**10.1.** Frozen işlemi intraoperatif patoloji konsültasyonudur.

**10.2.** Frozen işlemi için kabül edilen örnekler, makroskopik olarak incelenir.

**10.3.** Dokunun gerekli yerlerinden örneklemeler yapılır.

**10.4. Örneğin red kriterleri**

**10.4.1.** İntraoperatif konsültasyon için kemik ve kalsifiye sert dokuların

gönderilmiş olması

**10.4.2.** İntraoperatif konsültasyon için çok küçük doku gönderilmiş olması

(kalıcı parafin kesitlerdeki tanıyı engelleyecek şekilde)

**10.5. Örneğin kabul kriterleri**

**10.5.1.** İntraoperatif konsültasyon ve immünfloresan çalışmalar için gönderilen doku örnekleri herhangi bir tespit solüsyonu içerisine konulmaksızın taze olarak laboratuvara gönderilmelidir.

**10.5.2.** İntraoperatif konsültasyon için gönderilen materyaller ameliyathane görevlisi tarafından laboratuvara teslim edilmelidir.

**10.6. Dondurma işlemi**

**10.6.1.** Alınan doku örnekleri -12/ -20 derece arasında kriyotom cihazında

dondurulur ve

**10.7. Kesme ve boyama işlemi**

**10.7.1.** dondurulan parçalar 5 mikron kalınlığında kesitler alınır.

**10.7.2.** Doku kesitleri hematoksilen- eozin ile boyanır.

**10.7.3.** Lamlar 2 ayrı alkol içerisinde hızca tespit edilir ve suda yıkanır.

**10.7.4.** 1 dakika hematoksilende bekletilir ve suda yıkanır.

**10.7.5.** %1’lik Amonyaklı suda birkaç saniye bekletilerek mavileştirme sağlanır ve suda yıkanır.

**10.7.6.** Eozinde 15 saniye bekletilir ve suda yıkanır.

**10.7.7.** Alkollerden geçirilir, ksilen ile şeffaflaştırma işlemi sağlanır, entellan damlatılarak lamel ile kapatılır.

**10.7.8.** Hazırlanan preparatlar mikroskopik olarak incelenir ve frozen tanı verilir.

**10.8. Sonuç verme ve süresi**

**10.8.1.** Sonuçlar ameliyathane görevlileri tarafından tekrar ameliyathaneye götürülür.

**10.8.2.** Frozen işlemi ortalama 15 dakikada tamamlanmalıdır.

**10.8.3.** Frozen sonucu kaydedilir.

**10.8.4.** Frozen lamları veya preparatları kalıcı kesitlerle birlikte arşivlenir.

**11. Bölüm içi ve bölüm dışı konsültasyon uygulaması**

**11.1.** Hasta bilgileri, blok ve preparat bilgiler, konsültasyon nedenini ve ön

tanıları içeren konsültasyon formu doldurularak istem yapılır.

**11.2.** Dış konsültasyonda preparatlar preparat kutusu, parafin bloklar kilitli torbalar ile transfer edilir.

**11.3.** Nihai rapor yazılmamışsa, konsültasyon sonucu hastanın patoloji rapor tanısı olarak yazılır

**11.4.** Hastaya patoloji raporu verilmiş ise ek rapor olarak ilk rapora ilave konsültasyon sonucu belirtilir ve hasta ve hekime telefon ile bildirilir.

**12. Tıbbi cihaz yönetimi**

**12.1.** Her bir tıbbi cihaz için bir dosya ve ilgili formlar bulunmaktadır.

**12.2.** Patoloji Laboratuvarının tıbbı cihaz listesi aşağıda belirtilmiştir

**12.3.** Bu cihazların kullanım kılavuzları, cihaz sertifikaları, cihaz bakım formları, firma iletişim bilgileri ve kullanıcı eğitim sertifikaları ilgili cihaz dosyası içerisinde bulunmaktadır.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cihaz adı** | **Cihaz markası** | **Cihaz modeli** |
| Doku Takip Cihazı | Thermo Scientific | Excelsior ES |
| Doku Takip Cihazı | Leica | ASP 300 |
| Boyama Cihazı | Shandon | Varistain Gemini |
| Lam Yazıcı | Tissue Tek | Auto Write |
| Mikrotom Rotary | Thermo Shandon | Finesse |
| Mikrotom Rotary | Thermo | Finesse |
| Hassas Terazi | Ohaus |  |
| Doku Gömme Cihazı | Shandon | Histocentre 2 |
| Parafin Dispenser | Bio-optica |  |
| Etüv | Nüve | EN-500 |
| Lam Isıtıcısı | Barstead | Lab. Line |
| Benmary | Barstead |  |
| Kimyasal Karıştıcı | Pyro | Magnestir |
| Kriyotom cihazı | Thermo Shandon |  |
| Kaset Yazar | Tissue Tek | Autowrite |
| Steril Kabin | Bıosafety Cabinet |  |
| Santrifüj | Nüve | NF 800 |
| Santrifüj | Hettich | EBA III |
| Sıvı bazlı sitoloji cihazı | Thin Prep | 2000 |
| Thermo Shandon  Cytospin 4 | | |
| İmmünohistokimya  Boya Cihazı | Ventana | Benchmark XT |
| Mikrodalga Fırın | sinbo |  |
| Jel elektroforezi | Bio-Rad | Poverpac basij |
| Ultra viyole cihazı | I Uuminyx |  |
| Mixing block mixer | | |
| Vortex mixer | Mig |  |
| PCR cihazı | Geneamp |  |
| Santrifuj |  | NF048 |
| Santrifuj |  | Mikro200 |
| Genetik analizör | ABI Prism | 310 |

**13. Laboratuvar temizliği**

**13.1.** Laboratuvarın farklı bölgelerinde farklı temizlik ve temizlik kontrolü kuralları uygulanır. Enjektörler, bistüri uçları ve mikrotom bıçakları gibi özel kutulara atılır.

**13.2.** Makroskobi kabinleri hergün düzenli olarak temizlenir.

**13.3.** Kesit alınan laboratuvar bölgesi ve gömme işlemi yapılan alan günlük olarak temizlenir.

**14. Atıklar**

**14.1.** Atık tiplerine göre ayrıştırılır.

**14.2.** Tıbbı atıklar, tıbbi atık poşetlerinde biriktirilir ve hastane atık sorumluları tarafından toplanır.

**14.3.** Solüsyonlar ve kimyasal maddeler türlerine göre ayrı kaplarda biriktirilip, hasta idaresi tarafından tehlikeli atık yönetmeliğine uygun olarak toplanır ve uygun şekilde imha edilir.