



Navodila za pripravo vzorcev tkiva za izolacijo DNA/RNA v epico iz tumorskega tkiva

Testiranje lahko izvedemo iz tumorskega tkiva vklopljenega v parafin (FFPE), zmrznjenega ali svežega tumorskega tkiva.

PRIPRAVA VZORCA FFPE:

Pri sprejemu in tehnični obdelavi tkiva upoštevajte standarde kakovosti v patologiji (tkivo mora biti fiksirano čim prej, optimalno fiksirano v 10% nevtralnem formalinu - volumen fiksativa mora biti 5-10x večji od volumna tkiva, tehnična obdelava in vklop tkiva morajo biti optimizirani). Za testiranje patolog izbere in določi primeren vzorec tumorja, v katerem naj bi bilo vsaj 70% tumorskega tkiva (lahko je to vzorec endoskopske biopsije ali vzorec odvzet iz resektata primarnega tumorja ali v primeru, ko to indicira lečeči zdravnik, izjemoma vzorec metastaze tumorja). Na kakovost izolirane DNA/RNA vplivajo čas fiksacije, vrsta in količina fiksativa, izpostavljenost preparata zraku ali vročini.

Pri pripravi rezin za izolacijo DNA/RNA:

- uporabite vsakič novo rezilo mikrotoma med vzorci
- očistite vodno kopel med vzorci
- med rezanjem si nadenite čiste rokavice
- ne postavljajte odrezanih rezin na vroča mesta

Navodila (glej tudi Sliko 1):

Patolog na osnovi že izdelanih HE preparatov izbere reprezentativni blok, iz katerega boste pripravili material za izolacijo DNA/RNA.

- Na HE preparatu patolog z markerjem obkroži področje tumorja, kjer je delež tumorskih celic največji (zaželjeno več kot 70%). **Odstotek tumorskih celic v označenem področju vpiše na zahtevek.**
- Isti predel na bloku razmeji/obkroži z iglo, tako da se pri rezanju izbrani del tumorja loči od ostalega dela bloka.
- **Sledi narezovanje rezin: 10 rezin debeline 5-10µm** (odvisno od površine tumorja in debeline rezin)
 - Zavržite prve 2-3 rezine (zaradi izpostavljenosti zraku površine bloka/količka). Nato iz prve rezine (obkroženi del tumorja) pripravite HE preparat. HE preparat označite s številko biopsije, oznako bloka in oznako HE-A.
 - Naslednjih 10 zaporednih rezin (obkroženi del tumorja) zberite v epico in jo označite s številko biopsije in oznako bloka.
 - Po narezu epico z rezinami tkiva takoj postavite v hladilnik (T = 4-10°C).

Opombe:

- V primeru, da je **površina tumorja enaka ali manjša od 2,5 mm²**, pripravite 1 HE preparat in 12 oziroma največje možno število neobarvanih rezin v epico.
- Patolog zagotavlja, da je na osnovi ocenjene globine rezov in podatka o debelini tumorja v bloku, na vseh neobarvanih rezinah prisotno tumorsko tkivo.
- Priprava tkivnih rezin na mikroskopskih stekelcih ni ustrezna za izolacijo RNA zaradi izpostavljenosti zraku, višjim temperaturam sušenja ter encimom, ki razgradijo RNA (RNAzam).
- **Za molekularno-genetsko določanje mikrosatelitske nestabilnosti (MSI)** potrebujemo za vsakega bolnika 10 rezin tumorskega in **ločeno še 10 rezin netumorskega tkiva**. V primeru, da netumorsko tkivo ni na voljo, zagotovite vzorec krvi (odvzem v epruveto z EDTA).

PRIPRAVA SVEŽEGA ALI ZMRZNJENEGA VZORCA

- Patolog naj izbere del tumorja, ki vsebuje vsaj 70% tumorskih celic.
- Pripravite 25-50 mg svežega ali zmrznjenega tumorskega tkiva v fiziološki raztopini v sterilni epruveti ali epici.

Opombe:

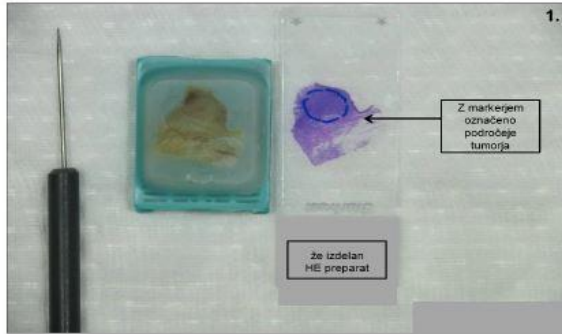
- Če svež vzorec ne morete dostaviti v roku 1 ure po odvzemu, pripravite zmrznjen vzorec ali FFPE.

TRANSPORT VZORCEV:

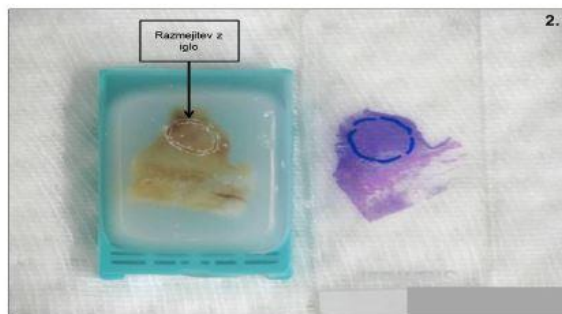
- Tkivo vklopljeno v parafin – FFPE: na ledu, če je transport vzorca daljši od 30 minut.
- zmrznjeno tkivo: pri T = -20°C.
- sveže tkivo: na ledu.

Slika 1: Slikovni prikaz priprave vzorcev v epico iz tumorskega tkiva (razmejitev z iglo).

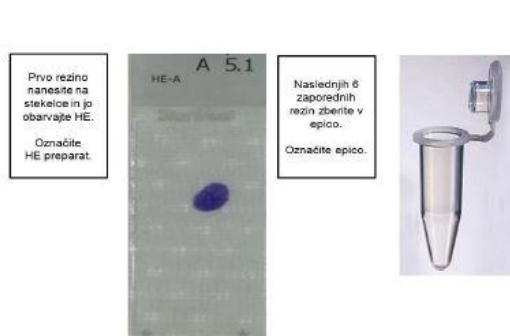
1. Patolog na osnovi že izdelanih HE preparatov izbere reprezentativni blok in z markerjem na HE preparatu obkroži področje tumorja z največjim deležem tumorskih celic:



2. Patolog isti predel na bloku razmeji z iglo, tako da se pri rezanju rezin izbrani del tumorja loči od ostalega dela bloka:



3. Priprava HE preparata in rezin debeline 5µm:



Pripravljen biopsijski material in izpolnjen »Zahtevek za pripravo vzorcev za genotipizacijo iz biopsijskega materiala« pošljite na naslov:

Onkološki inštitut Ljubljana
Oddelek za molekularno diagnostiko, stavba B
Zaloška 2
1000 Ljubljana