

MIGLIORARE LA RACCOLTA DI CAMPIONI PER LA RICERCA TRASLAZIONALE NEL CONTESTO DI STUDI CLINICI INTERNAZIONALI



Utilizzate una Procedura Operativa Standard per documentare la metodologia che utilizzate. Siate sicuri di poter documentare chi ha fatto cosa, quando e come!

Cosa fare prima della raccolta dei campioni?

Cosa fare durante la raccolta dei campioni?

Cosa fare dopo la raccolta dei campioni?

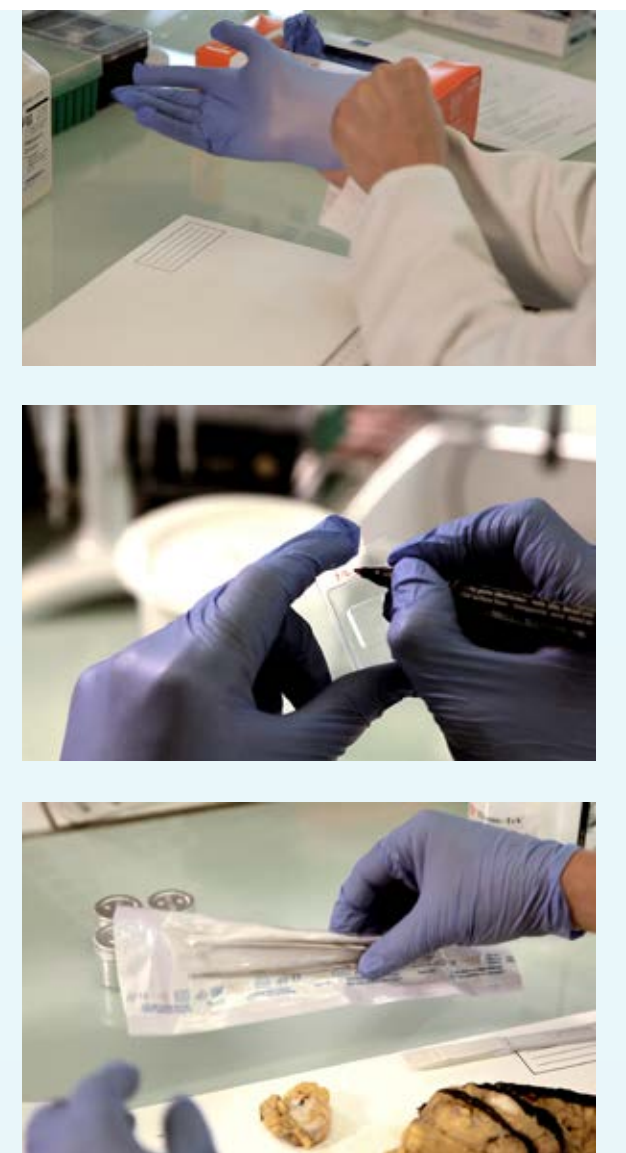


Comunicazioni importanti:

- Prima di procedere alla raccolta dei campioni, è importante informare tutto il personale coinvolto in tale processo. Ovvero i chirurghi, il personale infermieristico o il personale di radiologia, a seconda del tipo e dell'origine del campione che volete raccogliere.
- È importante che il personale coinvolto si assicuri che il paziente abbia dato il suo consenso alla raccolta di campioni per la ricerca.

Raccomandazioni importanti:

- Indossate sempre dei guanti.
- Utilizzate degli strumenti sterili, non contaminati da DNase e RNase.
- Non utilizzate lo stesso strumento per raccogliere tessuti normali e tessuti tumorali.
- Non campionate zone di necrosi macroscopicamente visibili.
- Se raccogliete tessuto normale, prendetelo il più lontano possibile dal tumore, evitando di raccogliere solo tessuto adiposo (a meno che ciò non sia intenzionale).
- Non dovete mai prelevare un campione di tessuto per la ricerca senza aver prima ottenuto il consenso informato e senza aver prima consultato il patologo.



Una volta raccolto il campione:

- Inviare immediatamente il tessuto al laboratorio. È fondamentale che il tempo di ischemia fredda sia il più breve possibile, preferibilmente <30 min dal momento della resezione.
- L'intervallo temporale fra la raccolta ed il congelamento del campione dovrebbe essere registrato in tempo reale.
- Il campione deve essere chiaramente etichettato usando i dati identificativi del paziente e utilizzando inchiostro resistente all'umidità e al freddo.
- È fondamentale assicurarsi che il campione non venga compresso o frammentato dopo il campionamento. Il campione deve essere manipolato gentilmente o non manipolato per nulla.

Utilizzate il principio delle lesioni speculari per sezionare i campioni!

- Questo significa dunque che una sezione viene tagliata ed utilizzata per la valutazione morfologica, e le sezioni ad essa adiacenti da entrambi i lati vengono rispettivamente o congelate, o fissate in formalina e incluse in paraffina.
- Ottenere lesioni speculari è importante per evitare eterogeneità fra un campione congelato e il corrispondente campione fissato dello stesso tumore.



Ci sono 3 opzioni per congelare i vostri campioni:

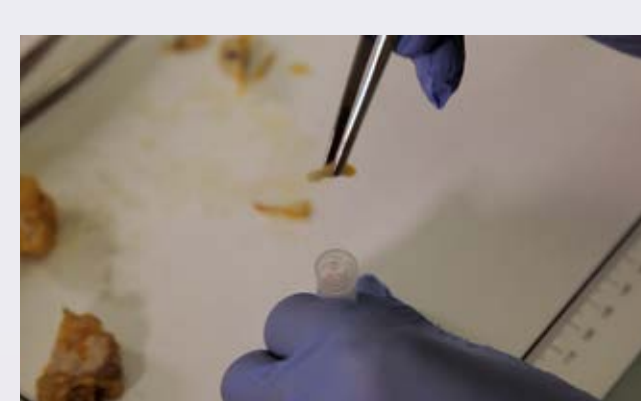
USARE AZOTO LIQUIDO:



- Il tessuto viene congelato rapidamente in azoto liquido, a una temperatura compresa fra -160°C e -190°C, prima di essere trasferito nel congelatore a -80°C.

- Lo svantaggio principale di questo metodo sono gli artefatti da bruciatura a freddo.
- + Il vantaggio principale di questo metodo sono la sua facilità e la sua relativa rapidità.

USARE RNA-LATER:



- Il campione viene prima immerso in RNA-later.
- Il campione può in seguito essere conservato a temperatura ambiente o anche a 4-5°C in frigorifero per diversi giorni, prima di essere trasferito nel congelatore a -20°C per diverse settimane e poi nel congelatore a -80°C.
- Il graduale passaggio del campione a temperature più basse è l'opzione da preferire. Ridurre il campione in piccoli frammenti è importante per assicurarsi che l'RNA-later possa penetrare.

- Lo svantaggio principale di questo metodo sono le numerose difficoltà nel valutare la morfologia del campione, soprattutto l'infiltrazione linfocitaria.
- + I principali vantaggi sono l'eccellente preservazione dell'RNA, il poter fare a meno del ghiaccio secco e dell'azoto liquido e la generale facilità d'uso.

USARE OCT:



- Il campione viene ricoperto con OCT come misura crioprotettiva, prima di essere trasferito nel congelatore a -80°C.
- È importante che tutto il campione sia ben ricoperto da OCT, affinché non sia più a contatto con l'aria.
- Il campione di tessuto deve essere ben piatto, e non bisogna aggiungere troppo OCT.
- Il campione viene infine trasferito nel congelatore a -80°C.

- + Il vantaggio principale di questo metodo è che protegge il campione dagli artefatti da bruciatura a freddo, preserva molto bene la morfologia e inoltre protegge da potenziali fenomeni di congelamento-scongelo quando il campione viene trasferito da un sito di conservazione all'altro.
- Un grosso svantaggio però è il rischio di inibizione delle reazioni di PCR.

Fissare il tessuto in formalina:

- Indossate sempre i guanti.
- Limitate il più possibile il tempo di ischemia fredda, dunque fissate le biopsie o i campioni nel fissativo il più rapidamente possibile!
- Quando si usa il fissativo, si utilizza molto spesso la formalina tamponata. Utilizzate formalina tamponata per fissare bene i campioni.
- Se utilizzate fissativi diversi dalla formalina tamponata, validate questi fissativi prima di cominciare ad utilizzarli routinariamente. Infine, non dimenticate: il tempo di fissazione deve preferibilmente essere limitato a 6-48 ore; ma anche una fissazione insufficiente può danneggiare gli epitopi tanto quanto una fissazione eccessiva!

Una volta conservati i campioni:

- Effettuate almeno 2 volte/anno un controllo di qualità su DNA, RNA e proteine su almeno l'1% dei vostri campioni selezionati random, sia per i campioni utilizzati a scopi di ricerca, sia per quelli utilizzati a scopo di diagnosi.
- Considerate anche la possibilità di usare ghiaccio secco quando i campioni vengono trasferiti da un sito di conservazione ad un altro per evitare i cicli di congelamento-scongelo su uno stesso campione.
- Non dimenticate di assicurarvi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati validati, se possibile.
- Consigliamo vivamente di monitorare costantemente la temperatura di tutti i frigoriferi e congelatori cruciali, con l'implementazione di un sistema di notifica istantanea in caso di allarme.

Per ulteriori informazioni vi preghiamo di visitare il sito www.BIGagainstbreastcancer.org per consultare il nostro Video e il nostro Poster su come procedere a un'adeguata raccolta di campioni.

Declinazione di responsabilità*

Questo materiale didattico intende illustrare le "Buone Pratiche di Laboratorio" per la raccolta di campioni nel contesto di studi clinici in oncologia. A questo scopo, ci si è focalizzati sui metodi più frequentemente utilizzati, con la consapevolezza che alcuni laboratori possono anche utilizzare metodologie diverse o conservanti/fissativi diversi. Nessun giudizio viene espresso riguardo a tali altre metodologie ed a tali altri conservanti/fissativi. Il Breast International Group (BIG) declina ogni responsabilità per il modo in cui verranno applicati i contenuti qui esposti.

Ringraziamenti

Questo materiale didattico è stato realizzato grazie alle sovvenzioni della University of Michigan e della Breast Cancer Research Foundation (USA). Inoltre, desideriamo ringraziare le seguenti persone (in ordine alfabetico) e istituzioni per la loro preziosa collaborazione: Jean-Benoît Burrión, Institut Jules Bordet (Belgium) / Ligia Craciun, Tumorbank, Institut Jules Bordet / Lorena de la Peña, Grupo Español de Estudio, Tratamiento y Otras Estrategias Experimentales en Tumores Sólidos (Spain), BIG / Dominique de Valeriola, Institut Jules Bordet / Phuong Dinh, BIG / Juergen Dittmer, Research Laboratory, Clinic for Gynecology, University of Halle-Wittenberg (Germany) / Debora Fumagalli, Breast Cancer Translational Research Laboratory, Institut Jules Bordet, BIG / José Jimenez, Molecular Oncology Laboratory, Hospital Vall d'Hebron (Spain) / Denis Larsimont, Institut Jules Bordet / Marion Maetens, Breast Cancer Translational Research Laboratory, Institut Jules Bordet, BIG / Martine Piccart, BIG, Institut Jules Bordet / Jeanne Richard, Quality Assurance Unit, Department of Pathology, Institut Jules Bordet / Roberto Salgado, Breast Cancer Translational Research Laboratory, Institut Jules Bordet, BIG / Alex Selim-Spinette, Tumorbank, Institut Jules Bordet / Carolyn Straehele, BIG / Alastair Thompson, National Cancer Research Institute Clinical Studies Group (UK), Dundee Cancer Centre (UK), BIG / Giuseppe Viale, University of Milan (Italy), European Institute of Oncology (Italy), BIG / Gunter von Minckwitz, German Breast Group (Germany), University Hospital Frankfurt & LUISSENKRANKENHAUS DÜSSELDORF (Germany), BIG / Cecilia Waldvogel, BIG / E tutti i membri del Consiglio di Amministrazione del BIG.