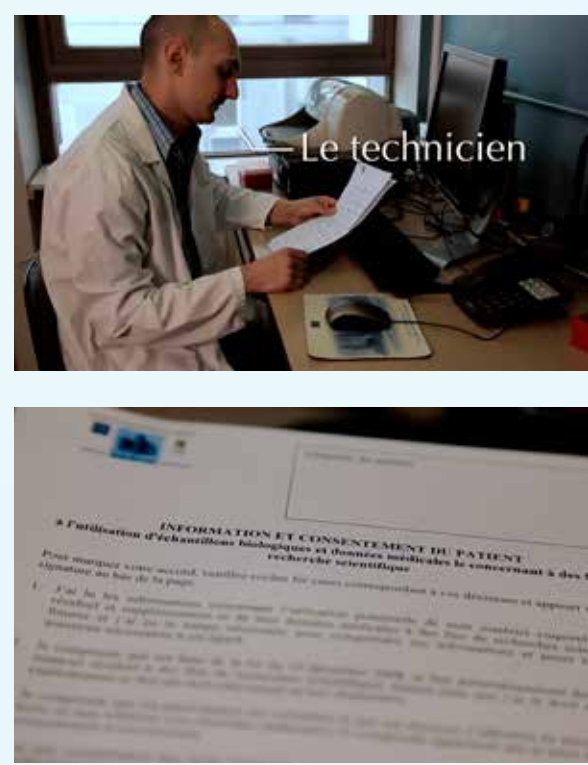


OPTIMALISEREN VAN DE PROCEDURE VOOR WEEFSELBEHANDELING MET HET OOG OP TRANSLATIONEEL WETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK IN HET KADER VAN INTERNATIONALE KLINISCHE STUDIES.

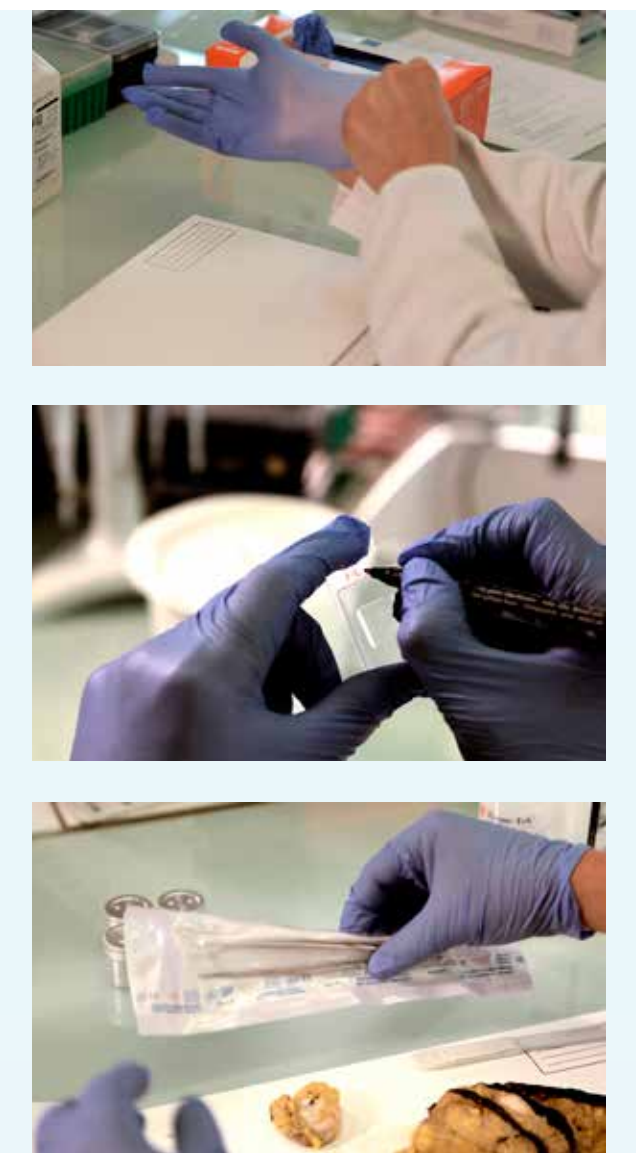
Aandachtspunten:



- Breng al het personeel dat bij de staalname betrokken is, op de hoogte van de geplande biopsie. Dit kunnen enerzijds de chirurg zijn, maar anderzijds ook de verpleegkundigen of de medewerkers van de beeldvorming, afhankelijk van de aard van de biopsie.
- Het is belangrijk dat vooraf is nagekeken of de patiënt zijn toestemming heeft gegeven voor het nemen van biopten voor wetenschappelijk onderzoek.

Belangrijk:

- Draag altijd handschoenen.
- Gebruik enkel steriele instrumenten die vrij zijn van DNA-ase en RNA-ase.
- Gebruik nooit hetzelfde instrument voor het wegnemen van zowel normaal als tumoraal weefsel.
- Neem nooit monsters van macroscopisch duidelijk necrotische zones.
- Blijf bij het wegnemen van gezond weefsel zo ver mogelijk uit de buurt van de tumor; vermijd hierbij ook het nemen van louter vetweefsel (tenzij het de bedoeling is natuurlijk).
- Neem nooit een weefselmonster voor wetenschappelijk onderzoek zonder vooraf te verifiëren of de patiënt hiertoe zijn toestemming heeft gegeven.
- Neem nooit een weefselmonster zonder de patholoog te raadplegen.



Eens de biopsiename plaats heeft gevonden:

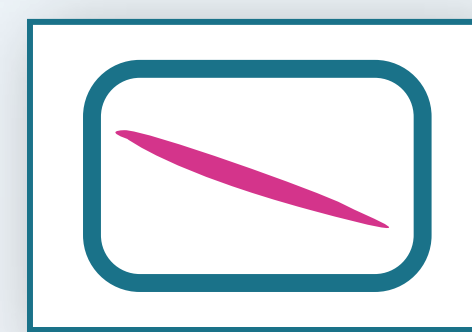
- Stuur het weefsel onmiddellijk door naar het laboratorium. Het is cruciaal dat de koude-ischemietijd zo kort mogelijk wordt gehouden, en dat die bij voorkeur minder dan 30 minuten bedraagt, te tellen vanaf het moment van de resectie.
- Controleer het tijdsverloop tussen biopsiename en het invriezen van het staal bij voorkeur in realtime.
- Op de recipiënt die gebruikt wordt voor het invriezen moet duidelijk het unieke patiënten-identificatienummer vermeld worden. Gebruik hiervoor inkt die resistent is tegen vocht en koude.
- Het is zeer belangrijk dat het biopt niet samengedrukt of gefragmenteerd wordt tijdens de monstername. Het weefsel moet altijd voorzichtig gemanipuleerd worden.

Versnijdt het monster volgens de spiegelbeeldtechniek!

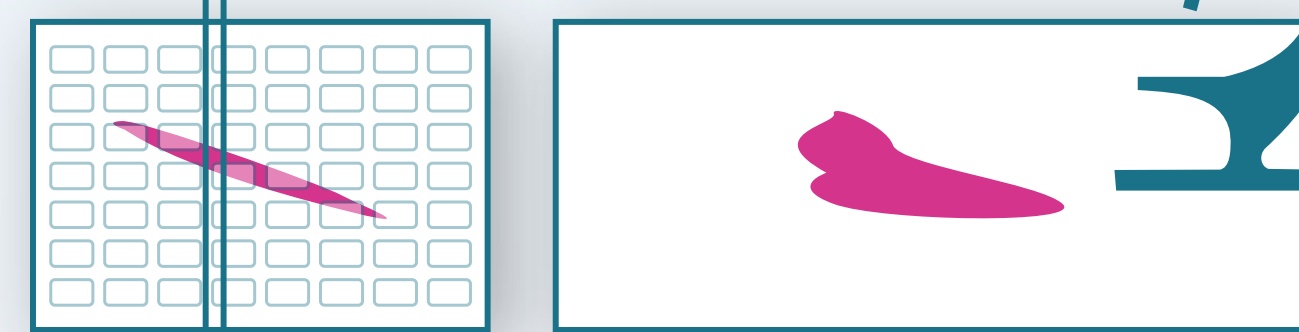
- Dit betekent dat een snede wordt genomen voor morfologisch onderzoek en dat de beide aanpalende coupes respectievelijk worden ingevroren en gefixeerd.
- Spiegelbeelden tussen het gefixeerde staal en het ingevroren staal zijn belangrijk voor het vermijden van heterogeniteit tussen 2 stalen van dezelfde tumor.



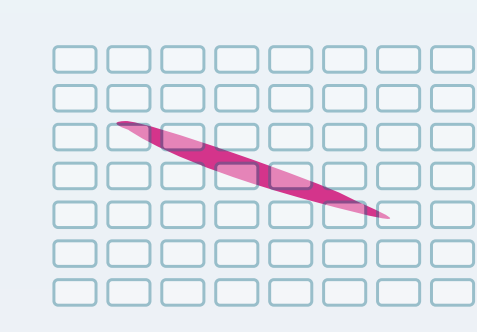
1. INVRIEZEN



2. MORFOLOGIE



3. FFPE



Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded

Er bestaan 3 manieren voor het invriezen van weefsels:

INVRIEZEN MET VLOEIBARE N₂:

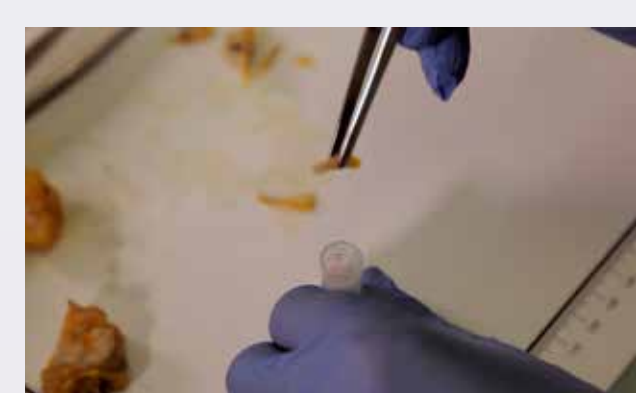


- Het weefselmonster wordt eerst snel bevroren in vloeibare stikstof bij temperaturen van -160°C tot -190°C en wordt daarna naar de -80°C diepvries overgebracht.

– Het belangrijkste nadeel is dat met deze methode vriesbrandartefacten mogelijk zijn.

+ Het belangrijkste voordeel is dat dit een gemakkelijke en relatief snelle methode is.

INVRIEZEN MET RNALATER®:

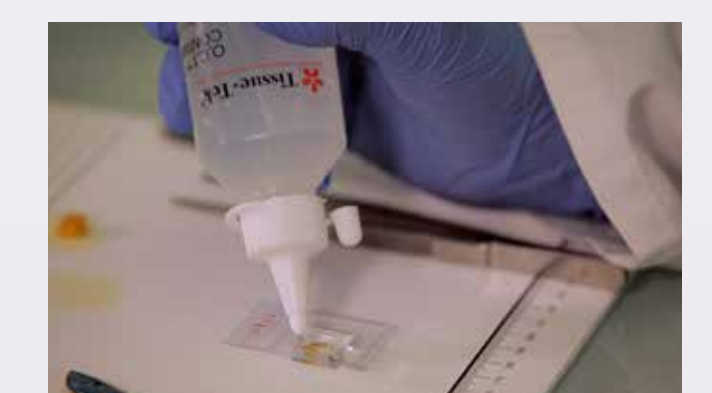


- Het biopt wordt eerst voorzichtig in RNALater® gebracht.
- Het monster kan daarna worden bewaard op kamertemperatuur of in de koelkast op 4 a 5°C, en dit voor verscheidene dagen. Daarna wordt het biopt overgebracht naar de -20°C vriezer waar het zelfs gedurende enkele weken kan bewaard worden. Tenslotte wordt het monster naar de -80°C diepvries verplaatst.
- Bij voorkeur gebeurt het invriezen geleidelijk. Hou er rekening mee dat RNALater® moet kunnen binnendringen in het weefsel. Vermijd dus al te grote fragmenten.

– Het belangrijkste nadeel van deze methode is de moeilijke evaluatie van de morfologie van de tumor (de evaluatie van de lymfocyten kan bijvoorbeeld problematisch zijn).

+ De belangrijkste voordelen zijn uiteraard een uitstekende RNA-bewaring, geen gebruik van droog ijs of vloeibare stikstof en de gebruiksvriendelijkheid van de methode.

INVRIEZEN D.M.V. OCT:



- Het biopt wordt voorzichtig in een recipiënt geplaatst en ondergedompeld in OCT om het te bevriezen, daarna wordt het naar de -80°C diepvries gebracht.
- Het is belangrijk dat al het weefsel goed ondergedompeld is in OCT, zodat het niet meer in aanraking kan komen met de lucht.
- Het weefselmonster moet horizontaal in het midden van de recipiënt geplaatst worden. Voeg zeker niet te veel OCT toe.
- Het monster kan nu naar de -80°C diepvries gebracht worden.

+ Het belangrijkste voordeel van deze methode is dat vriesbrandartefacten vermeden worden, dat de morfologie behouden blijft, en dat de biopten beschermd worden tegen eventuele vries-dooicycli bij het transporteren van de ene bewaarplaats naar de andere.

– Een groot nadeel is echter dat PCR-reacties kunnen worden geïnhibeerd.

Biopten fixeren met formaline:

- Draag altijd handschoenen.
- Beperk de koude-ischemietijd zo veel mogelijk, fixeer dus de biopten zo snel mogelijk in een fixeermiddel!
- Gebruik bij voorkeur gebufferde formaline om de monsters goed te fixeren.
- Indien u een ander fixatief gebruikt dan gebufferde formaline, vergeet dan niet om dit fixatief eerst te valideren vooraleer u het in het protocol opneemt! Onthoud dat de optimale fixatietijd 6 à 48 uur bedraagt en dat onderfixatie soms even schadelijk is voor de epitopen als overfixatie!

Eens alle stalen bewaard zijn:

- Plan minstens 2 maal per jaar een kwaliteitscontrole van DNA, RNA en eiwitten van willekeurig minimaal 1% van uw monsters. Dit geldt zowel voor weefselstalen voor wetenschappelijk onderzoek als voor weefselstalen bewaard voor diagnostische doeleinden.
- Gebruik droog ijs bij het overbrengen van de monsters van de ene bewaarplaats naar de andere om zo vries-dooicycli te vermijden.
- Zorg ervoor dat alle gebruikte apparatuur zo nodig gevalideerd is.
- Een continue temperatuurregistratie met alarmprocedure wordt ten stelligste aangeraden voor alle belangrijke koelkasten en vriezers.

Meer informatie over het correct manipuleren van weefsel vindt u in onze film en flyer op www.BIGagainstbreastcancer.org

DISCLAIMER

Dit educatief materiaal wil meer toelichting bieden bij de "Goede Laboratoriumpraktijken" (Good Laboratory Practice) op het gebied van het manipuleren van stalen bij translationeel kankeronderzoek. Hiertoe worden de meest gebruikte methodes belicht. Uiteraard is het mogelijk dat in bepaalde laboratoria ook andere methodes en/of bewaarplossingen/fixeermiddelen worden gebruikt. Dit educatief materiaal stelt op geen enkele wijze een oordeel over andere methodes en/of bewaarplossingen/fixeermiddelen. De Breast International Group (BIG) kan op geen enkele manier aansprakelijk worden gesteld voor gebeurlijke schade voortvloeiend uit het al dan niet correct toepassen van de hierbij voorgestelde handelwijze.

DANKWOORD

Dit educatief materiaal kwam mede tot stand dankzij een subsidie van de University of Michigan en het Breast Cancer Research Foundation (IVSA). / Graag willen we ook volgende personen (namen alfabetisch gerangschikt) en instellingen danken voor hun waardevolle samenwerking: / 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 Straehle, 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 & LUISENKRANKENHAUS DÜSSELDORF (Germany), BIG / Cecilia Waldvogel, BIG / Oprechte dank stelling aan alle leden van de Raad van Bestuur van de BIG.