

Tipy pro fixaci tkáně FFPE

Jak zajistit kvalitu RNA a podíl nádoru při cíleném testování genové exprese metodou NGS



MAMMAPRINT+BLUEPRINT

Illuminating Tumor Biology

Předanalytické zpracování tkáně zásadně ovlivňuje kvalitu RNA a úspěšnost testu. Včasná fixace, vhodná tloušťka tkáně, kontrolovaná expozice formalinu a dostatečný podíl nádoru pomáhají zvýšit pravděpodobnost získání dostatečného množství kvalitní RNA pro následné cílené testování genové exprese metodou NGS.

1 OKAMŽITÉ ZPRACOVÁNÍ PO OPERACI

- **Minimalizujte dobu studené ischemie:** kdykoli je to možné, vložte tkáň do fixačního roztoku do **30 minut od chirurgického odběru**.
- **Až do fixace uchovávejte tkáň v chladu**, ale před fixací formalinem ji nezmrazujte.
- Před fixací se vyhněte dlouhodobému působení pokojové teploty nebo fyziologického roztoku.
- Očekávané zpoždění fixace sdělte patologické laboratoři.

2 POSTUPY FIXACE

- Pro rutinní zpracování FFPE použijte **10% neutrální pufovaný formalin (10% NBF)**.
- Tloušťka tkáně je zásadní pro dostatečnou a rovnoměrnou fixaci. Vzorek o tloušťce přibližně **4 mm vyžaduje za obvyklých podmínek asi 24 hodin** k úplné fixaci.
- Obecně se doporučuje fixovat klinické tkáňové vzorky v 10% NBF **nejméně 6 hodin a nejdéle 72 hodin**.
- Zajistěte úplné ponoření tkáně do dostatečného objemu fixačního roztoku; vzorky v nádobě těsně nestlačujte.
- Vyhněte se nedostatečné i příliš dlouhé fixaci. Obě mohou nepříznivě ovlivnit kvalitu nukleových kyselin a následné molekulární testování.
- Dodržujte validované laboratorní postupy pro zpracování tkání a příslušná doporučení CAP pro manipulaci se vzorky.
- **Odkaz CAP:** Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology.

3 ODESLÁNÍ VYBRANÉHO BLOKU NEBO SKLA

- **Odešlete jeden vybraný FFPE blok s nádorovou tkání.** Patologická laboratoř z něj může vybrat nejvhodnější tkáň a určit potřebný počet řezů.
- Odesíláte-li nebarvené sklo, použijte čerstvě nařezané řezy a před molekulárním testováním minimalizujte dobu jejich skladování.
- Pokud se předpokládá molekulární testování, vyhněte se zbytečné spotřebě tkáně při histologickém zpracování.

4 VÝBĚR VZORKU A PODÍL NÁDORU

- Každý řez zaslaný k genomickému vyšetření by měl mít plochu alespoň **9 mm²**.
- K provedení testu je nutný nejméně **30% podíl invazivního nádoru**.
- Procento nádoru se vypočítá jako odhadovaný počet invazivních nádorových buněk dělený celkovým počtem buněk s jádrem.
- Je-li to klinicky vhodné, mohou core-cut biopsie zajistit rovnoměrnější fixaci, protože formalin menšími tkáňovými válečky rychle proniká.
- Vyberte oblasti s invazivním nádorem a zbytečně nezahrnujte:
 - karcinom in situ (DCIS)
 - nekrózu
 - tukovou tkáň
 - nenádorové stromální vazivo
 - krvácení
 - rozsáhlý artefakt po kauterizaci nebo kompresi

5 DALŠÍ ASPEKTY KVALITY RNA

- **Vyhněte se zbytečným prodlevám** mezi krájením tkáně a izolací RNA.
- Minimalizujte opakované vystavení tkáně teplu, vlhkosti a kontaminantům z prostředí.
- **Dekalcifikované vzorky mohou mít narušenou kvalitu nukleových kyselin**, proto je vhodné se jím vyhnout.
- Zaznamenejte významné předanalytické okolnosti, například prodlouženou ischemii, fixaci mimo doporučený rozsah nebo neobvyklé zpracování, protože mohou přispět k problémům s kvalitou RNA.