


Préservation du tissu: Enrobage de paraffine

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Préservation du tissu: Enrobage de paraffine			
Numéro de PNF:	08.03.005	Version:	f2.0
Remplace:	8.3.005 f1.0	Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel – Tissu solide
Approuvée par:	Le groupe administratif du RCBT		01 juin 2012
	Par: Brent Schacter 		28 juin 2012

1.0 INTENTION

Les tissus tumoraux sont appropriés pour des recherches spécifiques seulement s'ils sont préservés adéquatement. Jusqu'à ce jour, la formaldéhyde est le fixatif universel le plus largement utilisé parce qu'il préserve un large éventail de tissus et de composés tissulaires. Le tissu fixé à la formaldéhyde et enrobé de paraffine «Formaldehyde fixed and paraffin embedded» (FFPE), peut facilement être entreposé sous des conditions de laboratoire normales pour une longue période de temps. La méthode est efficace pour préserver la morphologie histologique du spécimen tissulaire. L'intention de ce document est de tracer les grandes lignes des procédures normalisées pour les banques du RCBT afin de suivre la préservation du tissu par la méthode FFPE.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment les tissus doivent être préservés par FFPE. Cette PNF ne couvre pas les procédures de sécurité détaillées pour la manipulation du matériel biologique humain (MBH) et il est recommandé que le personnel suive les guides de biorisques des institutions.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES PNFs ET POLITIQUES DU RCBT

Remarque: Lors de l'adoption de cette PNF pour un usage local, s'il vous plaît faire référence au RCBT.

- 3.1 *Politique du RCBT: POL 5 Registres et documentation*
- 3.2 *Politique du RCBT: POL 2 Éthiques*
- 3.3 *Politique du RCBT: POL 4 Vie privée et politique*
- 3.4 *Politique du RCBT: POL 7 Manipulation du matériel et de l'information*
- 3.5 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.03.001 Collecte et transport du tissu*
- 3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.03.002 Prise en charge du tissu*
- 3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF: 08.01.002 Gestion du matériel à biorisque*

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette politique s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable du traitement FFPE des tissus collectés.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle
Technicien de laboratoire	Transport, prise en charge et entreposage du tissu tumoral
Technicien de laboratoire d'histologie	Peut être spécifiquement responsable du processus FFPE des tissus

5.0 MATÉRIEL, RÉACTIFS, ÉQUIPEMENT ET FORMULAIRES

Le matériel, les réactifs, l'équipement et les formulaires inscrits sur la liste suivante ne sont que recommandés et peuvent être substitués par des produits alternatifs/équivalents plus appropriés aux tâches ou aux procédures spécifiques aux sites.

Matériel et équipement	Matériel et équipement (spécifiques au site)
Marqueurs, encre et crayons	
Pincés propres	
Scalpels propres pour le découpage du tissu	
Contenant pour fixer le tissu	
Suffisamment d'étiquettes appropriées (Voir PNF #8.01.001) pour tubes et cassettes d'histologie	
Cassettes d'histologie	
Unité de récupération pour les aiguilles/objets tranchants	
Gants jetables pour protéger le personnel qui manipule le tissu	
Recouvrements propres pour couvrir la surface de travail	
Feuille de travail pour la collecte/traitement du tissu (Voir annexe 1 pour le formulaire pour un échantillon)	
Formol à pH neutre tamponné au phosphate	
Alcool (absolu, 100% anhydre)	
Xylène	
Paraffine	

6.0 DÉFINITIONS

Voir le glossaire du programme du RCBT: <http://www.ctrnet.ca/glossary>

7.0 PROCÉDURES

Cette procédure a été développée pour s'assurer que les échantillons de tissus obtenus des participants consentants sont traités de manière sécuritaire et efficace tout en éliminant les risques de contamination. Les tissus mis en banque qui ont été adéquatement préservés sont utiles pour un grand nombre d'études. L'uniformité des procédures est importante pour obtenir des résultats comparables et relier les résultats de laboratoire entre eux. La fixation au formol est une pratique standard dans la routine de la plupart des laboratoires en histopathologie. Les procédures suivantes sont destinées pour les tissus préservés sous forme de spécimens fixés par le formol.

- a) Les spécimens de tissus ne doivent pas dépasser les dimensions suivantes : 1.5 x 1 x 0.5 cm.
- b) Une fixation insuffisante représente un grand risque pour la qualité du tissu mais une fixation excessive pourrait causer des problèmes pour les méthodes immunohistochimiques.
- c) Les fixateurs comme le Bouin qui contiennent de l'acide picrique doivent être évités parce que ces composés interfèrent avec les analyses PCR subséquentes d'acides nucléiques extraits.

Préservation du tissu: Enrobage de paraffine

Il pourrait y avoir à certains sites, un appareil automatisé pour l'enrobage dans la paraffine qui possède un processus déjà normalisé. Si non, utiliser les étapes suivantes comme guide.

7.1 Fixation dans le formol

- 7.1.1 Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
- 7.1.2 La fixation est effectuée par un technicien de laboratoire ou une personne formée désignée par la banque de tumeurs.
- 7.1.3 Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de contenants, de cassettes ou de tubes nécessaires étiquetés et prêts.
- 7.1.4 La fixation du tissu devrait être entreprise aussi tôt que possible. De façon optimale, le tissu devrait être fixé dans les 4 heures suivant la résection.
- 7.1.5 Enregistrer le temps écoulé entre la résection et la fixation.
- 7.1.6 Utiliser du formol (10%) à pH neutre tamponné au phosphate comme fixateur. Il est important que le fixateur soit tamponné pour éviter la formation de pigment de formaldéhyde sur les tissus riches en sang.
- 7.1.7 Procéder à la fixation à la température de la pièce (25° C).
- 7.1.8 Le volume du fixateur doit être au moins 10 à 15 fois plus gros que le volume du tissu (ex : 10 à 15 ml pour chaque gramme de tissu).
- 7.1.9 Si nécessaire, disséquer le tissu avant la fixation pour s'assurer une pénétration adéquate du fixateur.
- 7.1.10 Il est recommandé que l'épaisseur du spécimen ne dépasse pas 2.5 mm pour être adéquatement fixé. Si ce n'est pas possible, ne pas utiliser des spécimens de plus de 8 mm d'épaisseur.
- 7.1.11 Idéalement, la durée de la fixation devrait être jusqu'à 24 heures mais ne devrait pas dépasser 48 heures.

7.2 Processus pour enrobage

- 7.2.1 Déshydrater le tissu à travers une série d'alcools.
- 7.2.2 Nettoyer le tissu par un traitement de xylène.
- 7.2.3 Les étapes suivantes pour la déshydratation et le nettoyage peuvent être utilisées comme guide.

ÉTAPE	DURÉE	SOLUTION
2	30 min	ALCOOL 70%
3	30 min	ALCOOL 95%
4	30 min	ALCOOL 100%
5	60 min	ALCOOL 100%
6	60 min	ALCOOL 100%
7	60 min	ALCOOL 100%
8	60 min	XYLÈNE
9	60 min	XYLÈNE
10	60 min	XYLÈNE

- 7.2.4 Après l'étape 10 du tableau, continuer l'enrobage dans la paraffine.

Préservation du tissu: Enrobage de paraffine

7.3 Enrobage dans la paraffine

- 7.3.1 Utiliser préférentiellement de la paraffine à point de fusion bas pour améliorer la qualité des acides nucléiques.
- 7.3.2 Utiliser le tableau suivant comme guide pour poursuivre après l'étape 10 :

ÉTAPES	DURÉE	Température °C	SOLUTION
11	60 min	58°C	PARAFFINE
12	60 min	58°C	PARAFFINE
13	60 min	58°C	PARAFFINE

- 7.3.3 Après avoir complété le processus, les cassettes étiquetées sont ouvertes à l'endroit désigné pour le processus suivant.
- 7.3.4 Enlever le tissu et le placer dans un moule de grandeur appropriée chauffé.
- 7.3.5 Maintenir le spécimen de tissu avec une aiguille à dissection pendant le remplissage partiel du moule avec de la paraffine fondue.
- 7.3.6 Placer les étiquettes de façon appropriée et remplir le moule jusqu'au bord avec de la paraffine.
- 7.3.7 Refroidir les blocs dans un endroit frais pour fixer la paraffine pour 30 minutes.
- 7.3.8 Enlever les blocs du moule.
- 7.3.9 Les blocs sont maintenant prêts pour être sectionnés ou entreposés.
- 7.3.10 Entreposer les blocs de paraffine à la température de la pièce ou à une température plus basse. Prévenir l'exposition au soleil ou à des variations de températures extrêmes. Entreposer les blocs dans des boîtes de carton (résistantes à l'humidité de préférence) ou des boîtes d'entreposage en plastique.
- 7.3.11 Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET LIGNES DIRECTRICES

- 8.1 Déclaration d'Helsinki
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>
- 8.2 Tri-Council Policy Statement 2; Ethical Conduct for Research Involving Humans; Medical Research Council of Canada; Natural Sciences and Engineering Council of Canada; Social Sciences and Humanities Research Council of Canada, December 2010.
<http://www.pre.ethics.gc.ca/eng/policy-politique/initiatives/tcps2-eptc2/Default/>
- 8.3 Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics
<http://www.mrc.ac.uk/Utilities/Documentrecord/index.htm?d=MRC002420>
- 8.4 Best Practices for Repositories I. Collection, Storage and Retrieval of Human Biological Materials for Research. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER).
http://www.isber.org/Search/search.asp?zoom_query=best+practices+for+repositories
- 8.5 US National Biospecimen Network Blueprint
<http://biospecimens.cancer.gov/resources/publications/reports/nbn.asp>

Préservation du tissu: Enrobage de paraffine

- 8.6 National Bioethics Advisory Commission: Research involving human biological materials: Ethical issues and policy guidance, Vol. I: Report and recommendations of the National Bioethics Advisory Committee. August 1999.
<http://bioethics.georgetown.edu/nbac/hbm.pdf>
- 8.7 Jewell, S. et al. 2002, Analysis of the Molecular Quality of Human Tissues, an experience from the Cooperative Human Tissue Network. Am. J. Clin. Pathol. 118:733-741.
- 8.8 Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups
- 8.9 SOP-PRO-Tissue-Paraffin-02, Oct 3, 2006, Paraffin. Procure Quebec Prostate Cancer Biobank.
- 8.10 Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups.
- 8.11 SOP# TB306.001, 18th Sep. 2006. Paraffin Block Generation, Ontario Institute for Cancer Research Tumour Bank.
- 8.12 Snell L. and P. H. Watson. 2006, Breast Tissue Banking: Collection, Handling, Storage and Release of Tissue for Breast Cancer Research. Methods Mol Med. 120:3-24.

9.0 ANNEXE

- 9.1 Annexe A – Formulaire pour échantillon – Feuille de travail pour la collecte et la prise en charge du tissu

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéro de PNF	Date des modifications	Auteurs	Résumé des révisions
LP 002.001	2005	JdSH	PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
8.3.005	09-01-2008	JdSH	Révision pour couvrir seulement l'enrobage de paraffine des tissus
8.3.005 f1.1	Juin 2012	CMG	<ul style="list-style-type: none"> • Grammaire et mise en page • Retrait des définitions • Historique des révisions déplacé au bas du document • Mise à jour des liens pour les références • Mise à jour des références aux PNFs • Insertion du grade de l'alcool dans le tableau de la section 5.0.

Formulaire pour échantillon – Feuille de travail pour collecte et prise en charge du tissu

La feuille de travail de la collecte des échantillons peut être élaborée par les personnes travaillant aux sites spécifiques pour accéder à l'information qui serait pertinente à ces sites. Ce qui suit peut être utilisé comme guide pour retenir les informations à être enregistrées

Collecte et transport des tissus

Lieu de collecte	
Date de résection de la tumeur	
Heure de la résection de la tumeur	
Date de la réception de l'échantillon au laboratoire de pathologie	
Heure de la réception de l'échantillon au laboratoire de pathologie	
Nom de la personne qui a transporté le tissu	
L'échantillon a-t-il été transporté sur glace?	OUI NON
Pathologiste (Nom)	
Notes de collecte additionnelles:	

Information sur l'échantillon

Étiquette (Identifiant unique)	Type de tissu	Le tissu normal correspondant était-il disponible et a-t-il été collecté?	Taille de la tumeur	Observation sur le tissu

Collecte du tissu

Décongelé par: Nom du technicien

Heure et date de la cueillette: Très important d'enregistrer cette information

Indiquer si le tissu a été collecté pour:

1. Collecte de tissu fraîchement congelé.

Étiquette (identifiant)	Congelé dans tube par :	Date de la congélation	Heure de la congélation	Taille de l'échantillon	Emplacement de l'entreposage

2. Congélation dans OCT

Étiquette (identifiant)	Congelé dans tube par :	Date de la congélation	Heure de la congélation	Taille de l'échantillon	Emplacement de l'entreposage

3. Fixé dans formol. Oui Non

Date:

Emplacement de l'entreposage:

4. Entreposé sous une autre forme (ex. dans RNAlater®) Oui Non

Date:

Emplacement de l'entreposage