

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT			
Préservation du tissu: enrobage de paraffine			
Numéro de PNF:	8.3.005	Version	f1.0
Remplace:	LP 002.001	Date d'entrée en vigueur	9 janv 08
Objet:	Préservation du tissu	Catégorie	Manipulation et documentation du matériel

Préparée par:		Jean de Sousa-Hitzler		
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa
Approuvée par:		Peter Geary	CEO	09 janv 08
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa
Approuvée par:				
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa

Historique des révisions

Numéro de PNF	Date des modifications	Auteur (Initiales)	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	Révisée pour couvrir seulement l'enrobage de paraffine des tissus

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 POLITIQUES ET PNFS

1. Politique du RCBT: POL 005.001 Registres et documentation
2. Politique du RCBT: POL 002.001 Éthique
3. Politique du RCBT: POL 004.001 Vie privée et sécurité
4. Politique du RCBT: POL 007.001 Manipulation du matériel et de l'information
5. Procédure générique du RCBT: FS 002.001 PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
6. PNF du RCBT: 8.3.001 Collecte et transport du tissu vers la pathologie
7. PNF du RCBT: 8.3.002 Cueillette des tissus
8. PNF du RCBT: 8.1.002 Gestion des déchets 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	Site personnel spécifique et coordonnées de contact
Technicien de laboratoire	Transport du tissu tumoral, processus de collecte et entreposage	
Technicien de laboratoire d'histologie	Peut être spécifiquement responsable du processus FFPE des tissus	

5.0 MATÉRIEL, RÉACTIFS, ÉQUIPEMENT ET FORMULAIRES

Le matériel, 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 #8.1,001) 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 «underpads» 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 (éthanol)	
Xylène	
Paraffine	

6.0 DÉFINITIONS

Préservation: Utilisation d'agents chimiques, altérations dans les conditions environnementales ou autre moyens durant le processus pour prévenir ou retarder la détérioration biologique ou physique d'un spécimen.

Déshydratation: retrait de l'eau des tissus

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.

1. Les spécimens de tissus ne doivent pas dépasser les dimensions suivantes : 1.5 x 1 x 0.5 cm.
2. Une fixation insuffisante représente un grand risque pour la qualité du tissu mais une fixation excessive pourrait causer des problèmes pour les méthodes immunohistochimiques.

3. 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.

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

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. La fixation est effectuée par un technicien de laboratoire ou une personne formée désignée par la banque de tumeurs.
3. Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de contenants, de cassettes ou de tubes nécessaires étiquetés et prêts.
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.
5. Enregistrer le temps écoulé entre la résection et la fixation.
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. Procéder à la fixation à la température de la pièce (25° C).
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).
9. Si nécessaire, disséquer le tissu avant la fixation pour s'assurer une pénétration adéquate du fixateur.
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.
11. Idéalement, la durée de la fixation devrait être jusqu'à 24 heures mais ne devrait pas dépasser 48 heures.

7.2 Processus pour l'enrobage

1. Déshydrater le tissu à travers une série d'alcools.
2. Nettoyer le tissu par un traitement de xylène.
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

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

7.3 Enrobage dans la paraffine

1. Utiliser préférentiellement de la paraffine à point de fusion bas pour améliorer la qualité des acides nucléiques.
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

3. Après avoir complété le processus, les cassettes étiquetées sont ouvertes à l'endroit désigné pour le processus suivant.
4. Enlever le tissu et le placer dans un moule de grandeur appropriée chauffé.
5. Maintenir le spécimen de tissu avec une aiguille à dissection pendant le remplissage partiel du moule avec de la paraffine fondue.
6. Placer les étiquettes de façon appropriée et remplir le moule jusqu'au bord avec de la paraffine.
7. Refroidir les blocs dans un endroit frais pour fixer la paraffine pour 30 minutes.
8. Enlever les blocs du moule.
9. Les blocs sont maintenant prêts pour être sectionnés ou entreposés.
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.
11. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET LIGNES DIRECTRICES

1. Declaration of Helsinki. <http://ohsr.od.nih.gov/helsinki.php3>
<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
2. Tri-Council Policy Statement; 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, August 1998. <http://www.pre.ethics.gc.ca/english/policystatement/policystatement.cfm>
3. Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics Series.
http://www.mrc.ac.uk/pdf-tissue_guide_fin.pdf
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>
5. 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>
6. US National Biospecimen Network Blueprint
http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp
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. Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf
9. SOP-PRO-Tissue-Paraffin-02, Oct 3, 2006, Paraffin. Procure Quebec Prostate Cancer Biobank.
10. Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups. http://ctep.cancer.gov/forms/draft_ffpe_tissue.pdf
11. SOP# TB306.001, 18th Sep. 2006. Paraffin Block Generation, Ontario Institute for Cancer Research Tumour Bank.
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.

ANNEXE 1.

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 pris?	Taille de la tumeur	Observation sur le tissu

Cueillette 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 pris par:

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

