

Методические рекомендации по подготовке клинического материала для проведения молекулярно-генетических исследований для выявления мутаций в генах KRAS, NRAS, BRAF методом ПЦР.

1. Оформление направления на исследование.

Бланк направления должен содержать все сведения о пациенте и его диагнозе (приложение 1).

2. Требования к подготовке образцов ткани к проведению исследований.

Материалом для проведения молекулярно-генетических исследований служит фиксированная в формалине и заключенная в парафин ткань (FFPE-блоки) - это может быть материал, полученный во время биопсии, эндоскопии, послеоперационный. Для получения срезов необходимо использовать микротом. В каждом срезе FFPE-блока площадь фрагмента фиксированной ткани должна составлять до 250 мм², толщина среза – до 10 мкм (в среднем 3-5 мкм).

Для анализа ПЦР рекомендуется использовать 2 среза с FFPE –блока.

Требования к подготовке образцов ткани в FFPE-блоках

1. При фиксации ткани формалином использовать 10% нейтральный формалин (рН от 7.0-7.6).
2. Проводить фиксацию ткани формалином не дольше 24 часов.
3. Для декальцинации использовать реагенты только на основе EDTA.

Образцы после декальцинации с применением муравьиной или азотной кислоты для анализа ПЦР не пригодны.

4. Работать в перчатках, внутри вытяжных или ламинарных шкафов, использовать одноразовые инструменты и расходные материалы.
5. Избегать соприкосновения фрагментов биологического материала друг с другом и с любым другим биологическим материалом.
6. Использовать одноразовые лезвия для микротома и стерильные пинцеты
7. Первые два среза утилизировать, а для анализа ПЦР использовать срезы, начиная с третьего.
8. Общий срок хранения фиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани (FFPE-блоке) не более 3 лет при температуре от +15 до +25 С.

Критерии пригодности гистологических препаратов для дальнейшего ПЦР исследования

1. Опухолевые комплексы должны занимать не менее 60% площади ткани в срезе с FFPE-блока.
2. Зоны некроза и кровоизлияний в совокупности должны занимать не более 15% площади ткани в срезе с FFPE-блока.

В случае, если образец не соответствует хотя бы одному из перечисленных критериев, рекомендуется использовать другой образец.

3. Биоматериал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание – оттаивание).
4. Не помещать срезы на водяную баню.

Условия хранения исходного клинического материала

1. Условия хранения биоматериала, предназначенного для проведения молекулярно-генетических исследований:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре 2-8 С – в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 С – в течение 1 недели;

При температуре минус 70 С – длительно.

2. Подготовленный биоматериал упаковать в термоконтейнер для транспортировки с соблюдением правил перевозки биоматериала на воздушном, железнодорожном, автомобильном транспорте. В контейнер необходимо вложить абсорбент на случай нарушения целостности пробирки с биоматериалом и хладоэлементы. Отдельно от образцов вложить упакованное в отдельный файл направление. Хладоэлементы предназначены для поддержания температурного режима на весь период транспортировки при температуре в зависимости от количества дней с момента подготовки к исследованию ткани в парафиновом блоке до момента поступления его в лабораторное отделение.

3. На термоконтейнере указать адрес, куда направляется биоматериал на исследование: 123456, г., улица, дом, лабораторное отделение, кабинет ..., с пометкой «для проведения молекулярно-генетических исследований».

4. При отправлении биоматериала на исследование предварительно сообщить по телефону 8(11111) 2-03-45, добавочный 12-34.

Методические рекомендации разработаны согласно инструкции «Набор выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) ООО «ТестГен»

