

Retningslinje for håndtering, opbevaring og registrering af væv Regionernes Bio- og GenomBank

De nationale instrukser for vævsprøver i Regionernes Bio- og GenomBank (RBGB) er baseret på anbefalingerne i Dansk CancerBiobank (DCB), som er udarbejdet af teknikgruppen under DCBs faglig følgegruppe. Valget af procedurer er generelt baseret på en vurdering og afvejning af forskellige metoder til indsamling i forhold til bl.a. fremtidig anvendelse, prøve kvalitet, praktiske muligheder og økonomi. Målet er at materialet i RBGB kan anvendes til translationel forskning og dermed bidrage til en mere personaliseret behandling af de patientgrupper, der er dækket i RBGB. I det følgende uddybes baggrunden for instrukser til indsamling, opbevaring og registrering væv i RBGB.

Sikkerhed i arbejdet med biologisk materiale

Arbejde med flydende kvælstof (N₂) og isopentan skal godkendes af den lokale sikkerhedsorganisation. Isopentan kan bl.a. være eksplosivt og de lokale afdelinger skal følge retningslinjer for håndtering, opbevaring, bortskaffelse m.m.

Alt væv betragtes som potentielt smittefarligt og skal håndteres ifølge lokale sikkerhedsforskrifter for smittefarligt materiale. Det anbefales at bruge handsker ved håndtering af prøver i laboratoriet.

Det forudsættes, at alle afdelinger ved håndtering af biologisk materiale arbejder på rene overflader og med rene rør, beholdere og instrumenter. Instrumenter rengøres efter lokale forskrifter. Ved skæring skiftes knive hyppigt. Blandt andet skiftes kniven mellem håndtering af hhv. normal- og tumorvæv. De anbefalede mikrorør og skruelåg til nedfrysning af biologisk materiale er certificeret fri for DNaser, RNaser og human DNA.

Baggrund for vævsprøver indsamlet til RBGB

Procedure

Det er muligt at indsamle væv i regi af alle biobankerne under RBGB. Dansk CancerBiobank indsamler så vidt muligt vævsprøver fra alle patienter som undergår operation/biopsitagning som følge af en mulig malign diagnose. Alt vævsmateriale i DCB verificeres af en patolog for at sikre dets egnethed til translationelle undersøgelser. Transport af væv fra operationsstue til patologi afdelingen anbefales at ske på våd-is. Biobanken i Uppsala har sammenlignet effekten af forskellige transportbetingelser og tid på RNA stabilitet samt ekspresion af udvalgte gener i ufixeret tonsil væv. De fandt ingen tegn på RNA nedbrydning (målt på Bioanalyser) under de forskellige betingelser (6 t ved stuetemperatur, på is, i kold NaCl eller i RNAlater), men målt ved RT-PCR sås et stabilt ekspressionsniveau af de undersøgte gener kun for de prøver, der var transporteret på is (0,5-16 t). RNA kvalitet så ud til at være stabil ved væv transporteret på is indenfor en transporttid på 15 min - 2 t før nedfrysning (1). RBGBs registreringsmodul giver mulighed for at indberette evt. transport ved stuetemperatur, hvis lokale forhold kan vanskeliggøre fremskaffelse af is eller transporttiden er meget kort (få minutter). Det må understreges, at der altid vil finde en række nedbrydningsprocesser sted, hvilket reducerer anvendelsesmulighederne for vævet, hvorfor hurtig transport og håndtering er

ultimativ. Derfor bør der på de enkelte indsamlingssteder arbejdes ihærdigt på at optimere transport af væv fra operationsstue til vævsmodtagelsen.

Vævsudtagning til biobank sker optimalt ved en patolog. Forskelle i logistik (placering af operationsstue i forhold til patologiafdeling) mellem de enkelte sygehuse i regionen kan nødvendiggøre oplæring af en ikke-patolog til vævsudtagning, evt. i form af telepatologi under vejledning af en patolog. Der skal ved alle væv indlagt i Dansk CancerBiobank være en patolog, som foretager verificering af vævet. **Procent verificerede vævsmaterialer er en kvalitetsindikator for DCB og denne indgår i årsrapport.**

Der opbevares - i prioriteret rækkefølge - tørt nedfrosset væv (nabovæv til diagnostisk materiale), paraffin-indstøbt væv, O.C.T. Tissue-Tek monteret væv og RNAlater behandlet væv. Det vil være ønskeligt, om der fra det kliniske vævs materiale - nabo til væv som indgår i DCB - kan skæres et snit til H&E farvning. Snittet fra den diagnostiske klods vil sammen med et H&E farvet snit af biobankklodsens kunne verificere tumorindhold i top og bund af det tørt nedfrosne væv i DCB.

Tørt nedfrosset væv: Kan anvendes til alle molekyllære analyser hvis nedfrysning foretages efter gældende Instruks for håndtering af væv. Nedfrysningsdato og klokkeslæt noteres. Antal vævsstykker samt placering i biobank fryseren registreres. Væv indfryses i rør ved anvendelse af tøris-afkølet isopentan (2-methyl butan) eller flydende kvælstof. Transport af indfrosset væv til fryser skal ske på tøris.

Paraffinindstøbt væv: Tid for formalin fiksering varierer alt efter hvornår på ugen, vævet tages ud. Ensartet tid er ikke umiddelbart mulig, men tiden skal registreres i registreringsmodulet.

Nedfrysning: Metoder til nedfrysning er diskuteret ud fra kendskab til lokalt anvendte procedurer og den eksisterende litteratur. TubaFrost anbefaler efter gennemgang af litteraturen flere teknikker til nedfrysning baseret på N₂- eller tørisafkølet isopentan. Der er på nuværende tidspunkt ingen undersøgelser, der indikerer om den ene indfrysningsmetode er bedre end den anden. Afdelingerne, som indsamler væv, indberetter i registreringsmodulet, hvilken metode de anvender.

Direkte indfrysning af væv uden anvendelse af rør kan *ikke* anbefales: Risikoen for sammenblanding af væv fra forskellige patienter samt for kontaminering er u hensigtsmæssig for væv, der efterfølgende skal anvendes til molekyllærbiologiske analyser.

O.C.T. Tissue-Tek: Kan anvendes til vævssnit og DNA/RNA oprensning. Væv monteres enten direkte i O.C.T. Tissue-Tek i specialrør eller monteres i O.C.T. Tissue-Tek i folieform, der efterfølgende placeres i mikrorør. Der benyttes folieform fra NH Technology, som er specielt designede efter diameteren på det rør, hvori form inkl. Tissue-Tek monteret væv opbevares i fryser. Folieformene er fremstillet af stanniol, hvilket giver en meget glat bund, så vævsprøverne bliver helt plane. Foliens gode køleledende evne bevirker, at prøverne hurtigt og effektivt bliver nedfrosset. Folieformen markeres med nummer for at sikre identitet af vævsprøven.

Ifølge leverandøren (Ambion) eliminerer RNAlater behovet for øjeblikkelig processering eller nedfrysning af væv i flydende N₂ til senere RNA analyser. Væv behandlet i RNAlater kan ikke umiddelbart anvendes til andre histomorfopatologiske/molekyllærbiologiske analyser. I overensstemmelse med Ambions oplysninger er det i litteraturen vist, at RNAlater behandling og snap-freezing i flydende N₂ er sammenlignelige metoder m.h.t. at sikre RNA kvaliteten (2,3). Vævsprøver til behandling i RNAlater skal skæres i tynde ($\leq 0,5$ cm) skiver og henstå minimum 1 døgn (maksimalt 1 md.) i RNAlater ved 4 °C for at sikre indtrængen i vævet. RNAlater skal afpipetteres inden det behandlede væv fryses ved -80 °C.

RNAlater er således et godt alternativ til øjeblikkelig nedfrysning, f.eks. på indsamlingssteder der ikke råder over flydende N₂ (-196 °C). Ifølge Uppsala Biobank eliminerer RNAlater behandling dog *ikke* kravet til hurtig håndtering. Det har endnu ikke været muligt at finde direkte oplysninger om RNA kvalitet i væv indfrosset

vha. tøris/isopentan (-78 °C). Exiqon oplyser, at hvis det forventes, at en vævprøve skal "optøs" flere gange ved udlevering af en mindre mængde væv, er RNAlater behandlet væv at foretrække til RNA analyser. Ved gentagne optøninger fås bedre udbytte og kvalitet af RNA fra RNAlater behandlet væv i forhold til tilsvarende lynnedefrosset væv. Dette blev bekræftet ved besøget i Uppsala Biobank. Da RNAlater ikke er beko-steligt, og da det er en relativ simpel arbejdsprocedure, er denne medtaget i kravspecifikationerne for DCB og inkluderet i standardsættet for væv.

Opbevaring

Der opbevares i alt op til 9 vævsfraktioner pr. patient fra tumor og tilsvarende for normalvæv. Tørt nedfrosset væv, O.C.T. Tissue-Tek indstøbt væv samt RNA-later behandlet væv opbevares ved -80 °C. Formalinbe-handlet og efterfølgende paraffinindstøbt væv og H&E farvede vævssnit opbevares ved stuetemperatur. Det enkelte biobankcenter vælger selv, hvordan prøveopbevaring i fryserne organiseres, f.eks. i) De 8 frak-tioner i fryser fordeles i 8 forskellige fryser. ii) Tørt nedfrosset, O.C.T. Tissue-Tek indstøbt væv og RNA-later behandlet væv fordeles ud på to fryser for ikke at opbevare alt materiale fra den enkelte patient samlet. iii) Alle fraktioner placeres fortløbende i samme fryser. Der har aldrig været registreret et uopdaget fryser-nedbrud på Karolinska, hvorfor risiko for tab af materiale bør kunne elimineres ved altid at have en afkølet tom fryser stående som "reservefryser", samt ved overvågning af fryser (manuelt/elektronisk).

Baggrundsinformationer, registrering af væv

Det enkelte biobankcenter registrerer *Data om laboratoriet* i registreringsmodulet for RBGB. Indfrysnings-metode og opbevaringstemperatur samt beholder (mikrorør) defineres en gang for alle som **standardvær-dier** for hver fraktion i et vævs**fraktionssæt**. N.B. hvis de enkelte afdelinger under centeret bruger forskelli-ge mikrorør, skal der oprettes et fraktionssæt for hver afdeling. Disse oplysninger vil derefter fremkomme som default, dvs. at de ikke skal indtastes igen, medmindre der er ændringer i forhold til standardværdier-ne.

Frysere defineres i registreringsmodulet (klassifikation: fryser) med angivelse af frysernavn, temperatur og beskrivelse f.eks. af indhold. Fryseren får automatisk en forkortelse (ID). Registreringsmodulet tildeler au-tomatisk fryserposition til de enkelte fraktioner, når man ved registrering har valgt en fryser. Systemet kan sortere automatisk til henholdsvis -20 °C og -80 °C fryser, hvis disse temperaturer er defineret som stan-dardværdier for fryseropbevaring af specifikke fraktioner under forudsætning af at der ikke er oprettet flere fryser med samme temperatur . For at registreringsmodulet kan forudsige næste position, oprettes fryse-ren med et antal søjler/racks med angivelse af antal bokse i hver søjle og antal positioner i hver boks. Den enkelte fryser er således unik for det enkelte indsamlingssted. Det er ikke nødvendigt at oprette fryseren med det endelige antal søjler og bokse fra start, da der kan tilføjes nye enheder efterhånden som fryseren fyldes. Der udskrives etiketter til både fryser, racks og bokse fra registreringsmodulet; til bokse genereres automatisk 2 ens etiketter til henholdsvis bund og låg.

Registrering og mærkning af vævsprøver

Specifikke tidspunkter for prøvetagning, modtagelse i laboratoriet og for nedfrysning af materialet registre-res. Tidspunkt for håndtering/fiksering registreres ligesom håndtering/fiksering sluttidspunktet registreres. Stregkoder og skanning anbefales frem for manuel mærkning af hensyn til sikkerhed mod fejl. Etiketter med 2D stregkode udskrives fra registreringsmodulet til mikrorør. Ved statusskift i materialeoversigten kan

prøver *enten* fremkaldes ved at udfylde søgekriterierne med relevante værdier *eller* ved at scanne 2D koden på hvert mikrorør. Det anbefales, at afdelingerne installerer skanner til registrering af statusskift. Det eksterne prøvenummer, histologinummet, indgår i biobank nummeret for vævsprøver. Sammen med information om patientens cpr-nr. og navn sikres det, at forbytning ikke forekommer. I **Forslag til utensilier og reagenser** er eksempler på forskellige etiketter, der anvendes i biobankcentrene.

Referencer

1. Micke P, Ohshima M, Tahmasebpoor S, Ren Z-P, Ostman A, Pontén F, et al. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest.* 2006 Feb;86(2):202–11.
2. Dekairelle A-F, Van der Vorst S, Tombal B, Gala J-L. Preservation of RNA for functional analysis of separated alleles in yeast: comparison of snap-frozen and RNALater solid tissue storage methods. *Clin Chem Lab Med.* 2007 Jan;45(10):1283–7.
3. Mutter GL, Zahrieh D, Liu C, Neuberg D, Finkelstein D, Baker HE, et al. Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics.* 2004 Nov 10;5:88.

Oplysninger om Regionernes Bio- og GenomBank (RBGB) kan fås ved henvendelse til:
Sekretariatet for Regionernes Bio- og GenomBank, Afdeling for Patologi, Herlev Hospital, Borgmester Ib Juuls Vej 73, Opgang 7, 4. etage, L5, 2730 Herlev. Tlf. (+45): 3868 9132/3868 9812 (i tidsrummet kl. 10-12). E-mail: RBGB.sekretariat.herlev-og-gentofte-hospital@regionh.dk