

برای انجام آزمایش TMB دو نوع نمونه شامل خون و یا DNA بیمار قابل پذیرش می‌باشد. **ولی جهت کسب اطمینان از داشتن نمونه DNA مناسب، توصیه به ارسال نمونه خون می‌باشد.**

نمونه خون

حجم نمونه خون و شرایط نمونه‌گیری

- ۴-۶ میلی لیتر خون در دو لوله آزمایش مجزای (هر یک ۲-۳ میلی لیتر) دارای عامل ضد انعقاد EDTA مورد نیاز است.
- دقت کنید که تاریخ انقضای لوله‌های جمع‌آوری نمونه نگذشته باشد.
- پس از انتقال خون به درون لوله آزمایش، آن را با دقت و به آرامی برای ۱۰ مرتبه سر و ته کنید.
- پس از نمونه‌گیری از بیمار، لوله‌های حاوی خون را جهت نگه‌داری به یک یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد انتقال دهید.
- از یخ‌زدگی خون بیمار پس از نمونه‌گیری و همچنین در طول زمان انتقال جدا جلوگیری کنید.

دستورالعمل انتقال

- لوله‌ها باید دارای یک برچسب شامل اطلاعات کاملی از نام و نام خانوادگی بیمار، تاریخ تولد و همچنین تاریخ نمونه‌گیری باشند.
- برچسب‌های حاوی اطلاعات بیمار را به‌گونه‌ای بر روی لوله بچسبانید که بارکد متصل به لوله را نپوشاند.
- نمونه‌ها باید تا حداکثر ۳ روز پس از جمع‌آوری، با رعایت اصول زنجیره سرد به آزمایشگاه ارسال گردند. جهت تسهیل زمان و بالا بردن کیفیت آزمایش، توصیه می‌شود که نمونه‌های گرفته شده در همان روز ارسال شوند.
- جهت حفظ زنجیره سرد، از کیسه‌های حاوی ژل سرد کننده که حداقل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده باشند استفاده کنید. دقت داشته باشید که کیسه‌های حاوی ژل سرد کننده یخ زده نباشند.
- در صورت ارسال چند نمونه به‌صورت هم‌زمان، ضمن رعایت موارد فوق، لوله‌های مربوط به هر بیمار را در پاکت‌های جداگانه ارسال کنید.

تذکره ۱: در افراد تحت شیمی درمانی به دلیل بروز لوکوپنی حاصل از درمان، نمونه‌گیری حتماً پس از اتمام هر دوره شیمی درمانی و نه بلافاصله پس از شیمی درمانی صورت گیرد.

تذکره ۲: لطفاً دقت فرمایید که در بیماران دریافت کننده پیوند مغز استخوان، نمونه خون برای انجام این آزمایش مناسب نمی‌باشد.

تذکره ۳: در صورت کمبود حجم خون دریافتی و یا بروز هرگونه آسیب به نمونه خون‌های ارسال شده (همولیز شدن، یخ‌زدگی، شکستن لوله‌ها و ...)، آزمایشگاه ساژن درخواست نمونه‌گیری مجدد را از مرکز همکار خواهد نمود.

نمونه DNA

ویژگی‌های نمونه DNA

- غلظت DNA برای هر نمونه باید حداقل ۲۰ نانوگرم/میکرولیتر و حجم نهایی حداقل ۱۰۰ میکرولیتر باشد.
- نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نمونه باید در محدوده ۱/۶ تا ۱/۸ باشد و نسبت ۲۶۰/۲۳۰ نمونه نیز باید در محدوده ۰/۸ تا ۲ باشد.

دستورالعمل انتقال

- نمونه‌های DNA استخراج شده باید در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتر (RNase/DNase free) استریل پوشیده شده با پارافیلیم و یا کرایوتیوب با درب و اشر دار ارسال گردند.
- ظروف انتقال باید دارای اطلاعات کاملی از نام و نام خانوادگی بیمار و همچنین تاریخ تولد بیمار باشند.
- در صورت امکان جهت انتقال نمونه‌ها از زنجیره سرد استفاده کنید. برای این منظور از کیسه‌های حاوی ژل سرد کننده که حداقل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده باشد استفاده کنید.
- تذکر: تایید نهایی پذیرش نمونه DNA ارسالی، وابسته به بررسی‌های کنترل کیفیت توسط آزمایشگاه ساژن است. لذا در شرایطی که نمونه DNA از غلظت کمتری برخوردار بوده و یا از کیفیت مناسبی برخوردار نباشد، درخواست ارسال نمونه مجدد خواهد شد.

نمونه بافت

بلوک بافت پارافینه فیکس شده با فرمالین (FFPE)

این آزمایش بر روی DNA جدا شده از بلوکهای بافت پارافینه و فیکس شده با فرمالین (FFPE) تومور انجام می‌شود. آزمایشگاه پاتولوژی مربوطه باید تعداد چهار برش که هر یک ۱۰ میکرون ضخامت داشته باشند را از بلوک FFPE تهیه کرده و هر یک را جداگانه بر روی یک لام شیشه‌ای معمولی (بدون ماده چسبنده) قرار داده و به آزمایشگاه ساژن برای استخراج DNA ارسال نماید. بعلاوه، پاتولوژیست مربوطه باید یک لام رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) از بلوک FFPE فوق را بررسی کند تا از وجود میزان کافی سلول توموری برای آزمایش اطمینان حاصل گردد. همچنین پاتولوژیست باید محدوده بافت سرطانی را با مارکر بر روی لام رنگ آمیزی شده فوق مشخص نماید و لام علامت‌گذاری شده را به همراه چهار لام دیگر که برش‌های ۱۰ میکرونی بر روی آنها قرار داده شده است را به آزمایشگاه ساژن ارسال نماید.

شرایط بافت توموری:

- حداقل سایز تومور بر روی اسلاید: ۵ میلی متر مربع
- حداقل میزان سلول سرطانی (غیرنکروتیک) در ناحیه تومور (Minimum Tumor Cellularity): ۲۰٪
- وجود سلول‌های بدخیم (Invasive Carcinoma) در بافت ضروری است.

دمای حمل و نقل:

- دمای اتاق (۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد)

علت‌های رد شدن نمونه:

- کمبود سلول‌های توموری (Tumor Cellularity) در بلوک FFPE
- عدم وجود جزء بدخیم تومور در بافت ارسالی
- نکروز وسیع در ناحیه توموری
- کیفیت بد DNA استخراج شده از بافت سرطانی (عدم رعایت شرایط مناسب آماده سازی بافت و کیفیت بد فرمالین منجر به افت کیفیت DNA خواهد شد)

شرایط مناسب آماده سازی بافت FFPE:

فاصله میان خروج بافت از بدن تا فیکس کردن (time to fixation) حداکثر ۱ ساعت باشد، بافت در فرمالین neutral ۱۰٪ به مدت ۶ تا ۷۲ ساعت فیکس شده باشد، بافت به صورت قطعات ۵ تا ۱۰ میلی متر در داخل حجم کافی فرمالین فیکس شود.