

Neocyst-Studie: Blut- und Urinaufbereitung im Labor

0 Ziel und Zweck:

Diese SOP dient dazu, den Ablauf der Verarbeitung der Blut- (EDTA, Serum, Plasma, PAXgene) sowie Urinproben, das Einfrieren und die Lagerung von Biomaterial innerhalb der Neocyst Studie für die Biobank in allen Studienzentren zu standardisieren. Dazu erfolgt die Proben Dokumentation im SRT (sample registration tool), siehe separate Anleitung.

Zusätzliche Bioproben zum Sofort-Versand:

Unabhängig von den in dieser SOP aufgeführten Bioproben sollen je nach Einverständnis eine weitere Urinprobe (ca. 30 ml) sowie eine Schleimhautprobe aus einer Nasenbürstung von den Studienteilnehmern gewonnen werden. Diese beiden Proben müssen direkt verarbeitet und noch am selben Tag an folgende Adressen versandt werden:

- Urin: Dr. Wolfgang Ziegler, MHH Hannover
- Nasenbürste: Dr. Petra Pennekamp, Uniklinik Münster

Die Gewinnung, Bearbeitung sowie der Versand dieser Proben ist nicht Bestandteil dieser SOP sondern wird in 2 separaten SOPs beschrieben, die unter www.neocyst.de zu finden sind.

Voraussetzung für Gewinnung von Bioproben:

Es muss eine gültige unterschriebene Einverständniserklärung für die Teilnahme an NEOCYST sowie das hierauf angekreuzte Einverständnis zur Bereitstellung von Bioproben vorliegen (Formular unter www.neocyst.de)

Zeitpunkte der Probenentnahme:

- 1) bei Einschluss des Patienten in die NEOCYST-Studie (Visitenkit 1)
- 2) 1 Jahr nach Einschluss in die NEOCYSt-Studie (Visitenkit 2)
- 3) 2 Jahre nach Einschluss in die NEOCYSt-Studie (Visitenkit 3)

Kontakt für Fragen rund um die Probengewinnung und Probenabholung:

Dr. Norman Klopp

Tel.: 0511-5350-8452

klopp.norman@mh-hannover.de

HUB.Labor@mh-hannover.de

Hannover Unified Biobank (HUB)
Medizinische Hochschule Hannover
Feodor-Lynen-Str. 15
30625 Hannover

1 Material

Die Hannover Unified Biobank stellt jedem Studienzentrum folgendes Material für die Probengewinnung, -verarbeitung, -registrierung und -lagerung zur Verfügung.

1.1 Visitenkit 1

- 2 EDTA Röhrrchen, 1,2 ml und 2,7 ml (etikettiert)
- 2 Serumröhrrchen, 1,2 ml und 2,7 ml (etikettiert)

Hinweis: Für unter 5-jährige Kinder werden die 1,2ml Monovetten verwendet.
Für Kinder ab 5 Jahren werden die 2,7ml Monovetten verwendet.

- 2 2D Röhrrchen Nunc Matrix (1,8 ml Tube)
- 2 Urin-Monovetten a 10 ml mit Aufsatz zum Urinaufziehen (etikettiert)
- 2 Transferpipetten, 3,5 ml, steril, single use
- Membran-Adapter für Luer-Systeme (Sarstedt #14.1112), (<http://sarstedt.com/>)
- 1 PAXgene Röhrrchen (etikettiert)
- HOLDEX Einweghalter (Greiner #450263DE), (https://www.gbo.com/de_DE.html)



1.2 Visitenkit 2 und 3

- 2 EDTA Röhrrchen, 1,2 ml und 2,7 ml (etikettiert)
- 2 Serumröhrrchen, 1,2 ml und 2,7 ml (etikettiert)

Hinweis: Für unter 5jährige Kinder werden die 1,2ml Monovetten verwendet.
Für Kinder ab 5 Jahren werden die 2,7ml Monovetten verwendet.

- 2 2D Röhrrchen Nunc Matrix (1,8 ml Tube)
- 2 Urin-Monovetten a 10 ml mit Aufsatz zum Urinaufziehen (etikettiert)
- 2 Transferpipetten, 3,5 ml, steril, single use



1.3 weiteres Versandmaterial

- Lagerbox für Monovetten mit Rastereinsatz 7x7
- Lagerbox für 1,8 ml Tubes
- 1D/2D Scanner

Hinweis:

Den Scanner können Sie einfach in Betrieb nehmen! Verbinden Sie zunächst den Scanner mit dem mitgelieferten Kabel. Schließen Sie das Scannerkabel dann an einen USB-Port an dem PC, mit dem die Probenregistrierung erfolgt, an. Der Scanner ist nach wenigen Sekunden betriebsbereit (Scanner piepst einmal kurz).

2 Durchführung:

2.1 Probenpriorisierung

Priorisierung Blutproben	Röhrchen
1.	EDTA (1,2 ml für unter 5 jährige; 2,7 ml für über 5 jährige)
2.	Serum (1,2 ml für unter 5 jährige; 2,7 ml für über 5 jährige)
3.	PAXgene-Röhrchen

Priorisierung Urin	Röhrchen
1.	Urinmonovette 1
2.	Urinmonovette 2 (optional)

2.2 Hinweise zur Blutabnahme

2.2.1 Paxgene: Verwendung des Adaptersystems

Das Adaptersystem ermöglicht die Blutabnahme mittels Sarstedt Butterfly in einen BD-Vacutainer. Das Adaptersystem kann nach der Gewinnung von EDTA und Serum auf die bereits verwendete Butterfly Kanüle aufgesetzt werden.

- Vor der Befüllung des Paxgene Röhrchens den Butterfly mit Adapter versehen (siehe Abb. A, B)

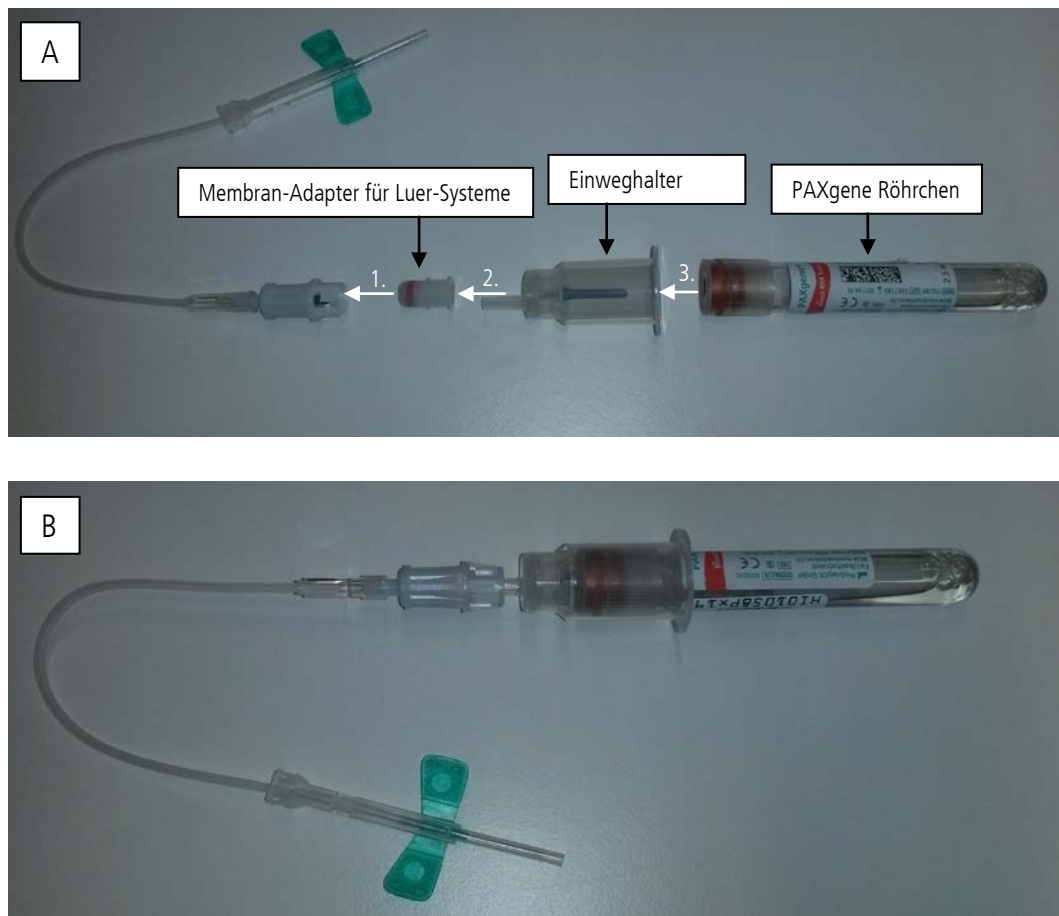


Abb. A und B:

Einzelne Komponenten (A), zusammengestecktes System (B):

Adaptersystem für die Abnahme von Blut in Kombination von Sarstedt und BD-System (Safety-Multifly-Set, Membran-Adapter Sarstedt, Einweghalter).

1. und 2. Membran-Adapter (1.) und Einweghalter (2.) auf Safety-Multifly-Set (Sarstedt) stecken.

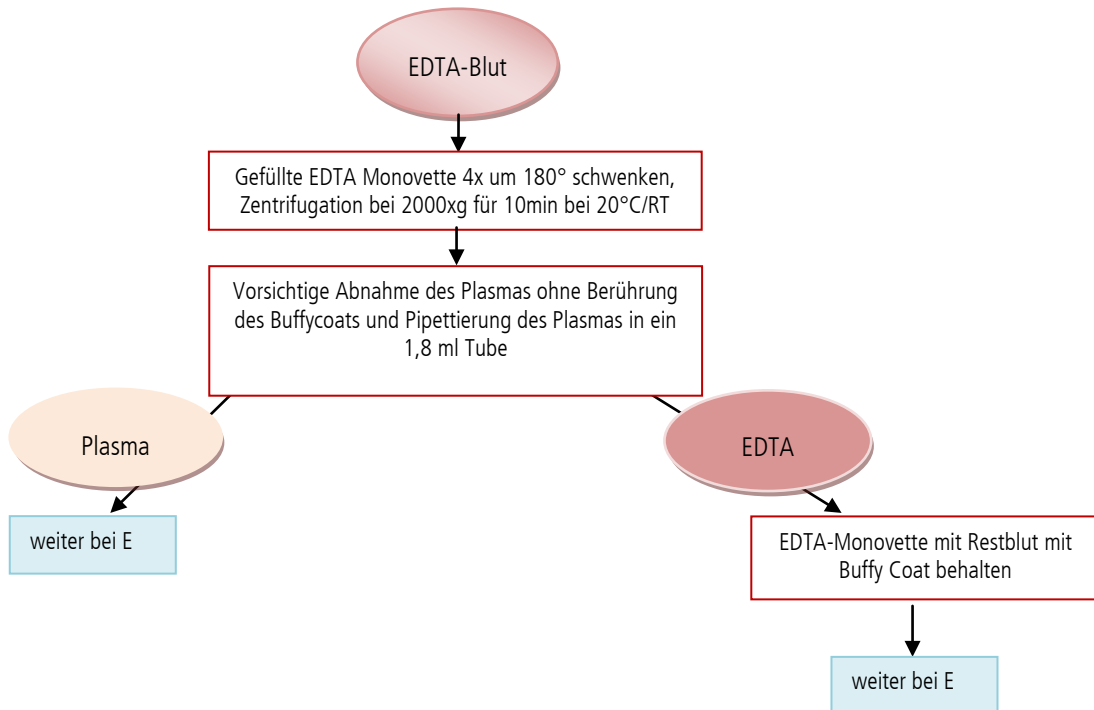
3. Erst nach Punktion und Aufsetzen des Adapters darf die Nadel des Adapter-Systems in das Vacutainer PAXgene Blutröhrchen eingeführt werden. (Bei vorherigem Einführen entweicht das Vakuum aus dem Blutröhrchen).

2.3 Kurzanleitung Probenverarbeitung

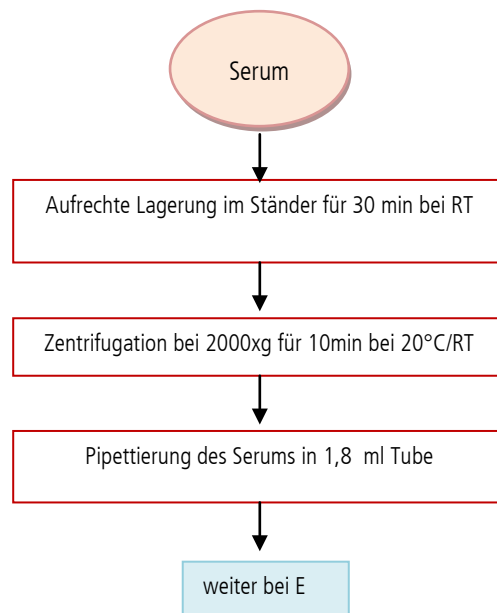
- **Nach der Blutabnahme**
 - **EDTA-Monovette** 4x um 180° schwenken.
 - **Serum-Monovette** mindestens 30 min für eine vollständige Gerinnung aufrecht stehend lagern.
 - **PAXgene Röhrchen** ebenfalls 4x um 180° schwenken und **2h bei RT** stehend lagern.
- **Zentrifugation**
 - **Blutmonovetten (Serum und EDTA)** werden zentrifugiert.
- **Aliquotierung**
 - danach wird pro Monovette ein Aliquot (**Plasma** bzw. **Serum**) in ein 1,8 ml Tube (Nunc) pipettiert.
 - die **EDTA Monovette** mit Buffy Coat und Restblut wird behalten,
 - die **Serum Monovette** wird verworfen.
- **Einfrieren**
 - Die **Serum/Plasma-Tubes** (1,8ml), die **EDTA-Monovette** mit Buffy Coat und Restblut werden in den zur Verfügung gestellten Boxen bei -80°C eingefroren und Datum und Uhrzeit des Einfrierens dokumentiert.
 - Das **Paxgene** Röhrchen wird nach Inkubationszeit (mind. 2 h bei RT) bei -80°C eingefroren.
- **Urinproben**
 - Urinproben werden in 1-2 Urinmonovetten (10 ml) überführt und sofort bei -80°C in den zur Verfügung gestellten Boxen eingelagert.
- **Registrierung**
 - Die Probenregistrierung aller Proben erfolgt im Sample Registration Tool (SRT).
- **Organisation der Probenverschickung**
 - Die oben genannten und bei Ihnen registrierten Proben werden 2x/Jahr durch einen von der HUB beauftragten Kurierdienst bei Ihnen abgeholt.
 - Um diese Abholung zu koordinieren kontaktieren Sie bitte die HUB

2.4 Übersicht / Flowchart

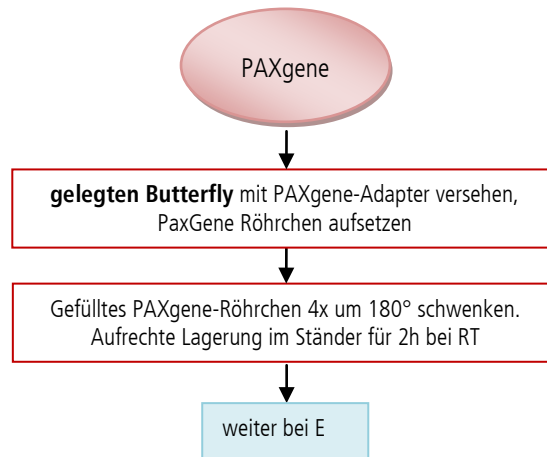
A: EDTA-Blut



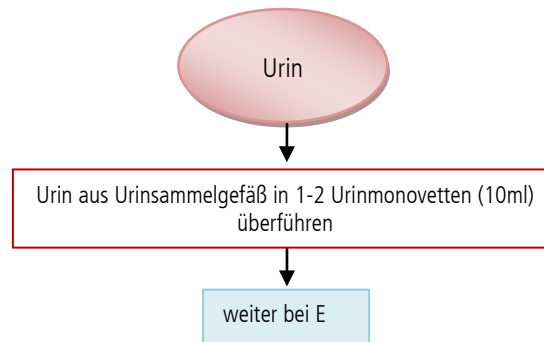
B: Serum



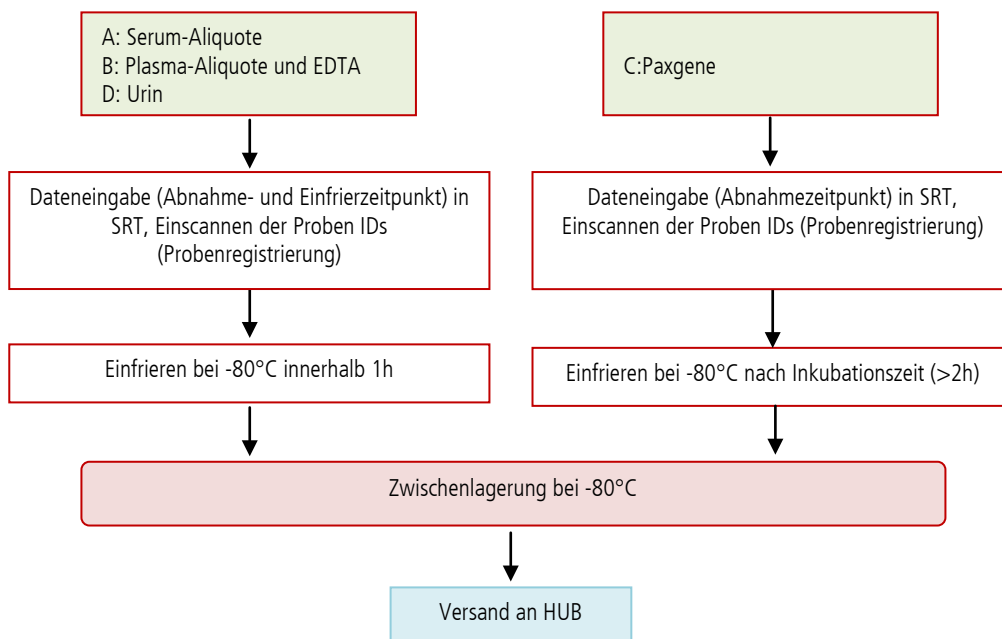
C: PAXgen



D: Urin



E: Registrierung, Einfrieren und Lagerung der Biomaterialien (A,B,C und D)



2.5 Manuelle Blut- und Urinverarbeitung im Labor

Nr.	Aktion
A: EDTA-Blut	
1.	Gefüllte EDTA Monovette 4x um 180° schwenken
2.	EDTA-Monovette bei 2000x g für 10min, 20°C /RT zentrifugieren.
Plasma	
3.	Das voretikettierte 1,8 ml Tube wird im Transportrack bereitgestellt, den Deckel des Röhrchens aufschrauben und kopfüber auf die Arbeitsfläche legen
4.	Vorsichtige Abnahme des Plasmas aus der EDTA-Monovette mittels einer Transferpipette ohne Berührung des Buffy Coats und Pipettierung in das 1,8 ml Tube.
5.	Das 1,8 ml Tube wird verschlossen.
6.	Probenregistrierung (siehe E: Probenregistrierung, Versandvorbereitung und Versand)
7.	Das 1,8 ml Tubes wird innerhalb 1h nach Primär-Probengewinnung weggefroren und im -80°C Freezer in Lagerboxen (siehe 1.3) zwischengelagert.
Restblut mit Buffy Coat (EDTA)	
8.	Aufbewahren der etikettierten EDTA-Monovette mit Buffy Coat und restlichen Blutzellen
9.	Probenregistrierung (siehe E: Probenregistrierung, Versandvorbereitung und Versand)
10.	Die etikettierte EDTA-Monovette wird innerhalb 1h nach Primär-Probengewinnung weggefroren und im -80°C Freezer in Lagerboxen (siehe 1.3) zwischengelagert.

Nr.	Aktion
B: Serum	
1.	Serum-Monovette vor Verarbeitung min. 30-40 Minuten bei RT für die vollständige Gerinnung aufrecht stehend lagern Überprüfung des Abnahme Zeitpunktes
2.	Serum-Monovette bei 2000x g für 10 min, 20°C zentrifugieren
3.	Das 1,8 ml Tube wird im Transportrack bereitgestellt, den Deckel des Röhrchens aufschrauben und kopfüber auf die Arbeitsfläche legen
4.	Abnahme des gesamten Serums aus der Serum-Monovette mit Hilfe einer Transferpipette in ein 1,8 ml Tube
5.	Das 1,8 ml Tubes wird verschlossen.
6.	Probenregistrierung (siehe E: Probenregistrierung, Versandvorbereitung und Versand)
7.	Das 1,8 ml Tube wird innerhalb 1h nach Primär-Probengewinnung weggefroren und im -80°C Freezer in Lagerboxen zwischengelagert.
8.	Serum-Monovette (Primärröhrchen) wird verworfen.

Nr.	Aktion
C: PAXgene	
1.	Das etikettierte PAXgene-Röhrchen nach Blutabnahme 4x um 180° schwenken und dann 2 h bei RT aufrecht stehend lagern. Überprüfung des Abnahme Zeitpunktes
2.	Probenregistrierung (siehe E: Probenregistrierung Probenerfassung, Versandvorbereitung und Versand)
3.	PAXgene-Röhrchen wird bei -80°C eingefroren und zwischengelagert.

Nr.	Aktion
D: Urin	
1.	Urin aus dem Urinsammelgefäß wird in 1-2 Urinmonovetten (10 ml) überführt.
2.	Probenregistrierung (siehe E: Probenregistrierung, Versandvorbereitung und Versand)
3.	Wegfrieren der etikettierten Urin-Monovette innerhalb 1h nach Probengewinnung. Zwischenlagerung im -80°C Freezer.

Nr.	Verantw.	Aktion
E: Probenregistrierung, Versandvorbereitung und Versand		
1.	Mitarbeiter im Studienzentrum	Probenregistrierung: Probenregistrierung erfolgt vor dem Einfrieren der Proben <ul style="list-style-type: none"> Erfassung der PatientenID im webbasierten SRT, Auswahl der Visite (1-3) Einscannen der ProbenIDs (Serum, Plasma, EDTA-Restblut, Urinmonovette 1-2) im webbasierten SRT mittels Barcode-Scanner Erfassung der Probennahme-, Zentrifugations- und Einfrierzeitpunktes im SRT für Serum-Aliquot, Plasma-Aliquot, EDTA-Restblut, für Paxgene entfällt die Erfassung des Einfrierzeitpunktes Erfassung der Probennahme- und Einfrierzeitpunktes im SRT für Urin
2.	Mitarbeiter im Studienzentrum	Proben werden laut Vorgaben in A-D eingefroren
3.	Mitarbeiter im Studienzentrum	Versandanforderung: Information über Transportbedarf und aktuelle Patientenzahl des Zentrums an die HUB senden (per E-Mail an Hub.Labor@mh-hannover.de)
4.	HUB-Mitarbeiter	Kontaktaufnahme mit Studienzentrum und Koordinierung des Probenversand vom Zentrum an die HUB