

SOP-Manual Pädiatrie-Modul

NAPKON

Nationales Pandemie Kohorten Netz

Bioprobensammlung für das NAPKON Pädiatrie-Modul

Gültigkeit ab:	Freigabe	
Version:	2.0	
Ersetzte Version:	1.0 mit Freigabe vom 23.09.2021	
Änderungshinweis:	<p>Gesamtes SOP-Manual: Anpassung Versionierung, Inhaltsangabe. S. 2: Ergänzung des Erstellers, Änderung des Prüfers. S. 9, PBB 11S, PBB 12S: Reduktion der Aliquotanzahl des Liquor-Überstandes auf max. 10 Aliquote; Erhöhung Aliquotgröße des Liquor-Überstandes auf 0,5 ml. S. 10, Erhöhung Aliquotgröße der Liquorzellen auf 0,5 ml S. 96: Liquorgewinnung: Ergänzung „oder ab 18 Jahre nach separater Aufklärung für wissenschaftliche Untersuchungen“. S. 97, Flow Charts S.18: Erniedrigung Zentrifugation auf 145xg und 15 min, Reduktion der Aliquotanzahl des Liquor-Überstandes auf max. 10 Aliquote, Erhöhung Aliquotgröße der Liquorzellen auf 0,5 ml. S. 104: Aktualisierung der Links [2],[9],[10],[11],[20].</p>	
Verteiler:	An der Bioprobensammlung des NAPKON Pädiatrie-Moduls teilnehmende Studienzentren	
Erstellt und angepasst von: Inga Bernemann Dr. Maike Tauchert Dr. Folke Brinkmann Dr. Nicole Töpfer	Geprüft: Dr. Andrea Kühn-Steven Dr. Bärbel Fösel	Freigegeben von: Dr. Gabriele Anton Prof. Dr. Thomas Illig
Datum: 26.08.2022	Datum: 13.09.2022	Datum: 14.09.2022
Koordination NAPKON Bioprobekern:	Prof. Dr. Thomas Illig Hannover Unified Biobank (HUB) Medizinische Hochschule Hannover (MHH) Feodor-Lynen-Straße 15 30625 Hannover	
Kontakt für Support:	napkon_bioprobe@listserv.dfn.de	

1. INHALTSVERZEICHNIS

1.	Inhaltsverzeichnis.....	3
2.	Zielsetzung	4
3.	Übersicht Bioprobensammlung	5
4.	Hinweise zum Umgang mit Bioproben von SARS-CoV-2 positiv-getesteten Patient*innen.....	11
5.	Vorbereitung Entnahme-Kits NAPKON Pädiatrie-Modul.....	13
6.	Standardarbeitsanweisungen (SOPs).....	19
7.	Abbildungsverzeichnis.....	104
8.	Anlagen	106

2. ZIELSETZUNG

Zusammenstellung aller relevanten Standardarbeitsanweisungen (SOPs) inklusive Probenbegleitbögen (PBB) zur standardisierten und qualitätskontrollierten Sammlung, Prozessierung, Lagerung und Dokumentation des Basismaterialsets von humanen Bioproben von pädiatrischen SARS-CoV-2 infizierten Patient*innen und entsprechenden Kontrollen im Rahmen des NAPKON Pädiatrie-Moduls.

3. ÜBERSICHT BIOPROBENSAMMLUNG

Entnahme von Bioproben + Dokumentation von assoziierten Daten auf PBB und in Excel bzw. im Labor-Informations-Management-System (LIMS)

Hinweis zur Ethik: Jegliche Entnahme von Bioproben im Rahmen des NAPKON Pädiatrie-Moduls ist nur zulässig sofern eine unterschriebene Patient*innen- bzw. Sorgeberechtigten-Einwilligung hierfür vorliegt.

a) Blut Kinder (bis ca. 26 Kilogramm Körpergewicht)

Die Größe der Entnahmeröhrchen ist je nach Alter, Gewicht und Größe der Kinder und Jugendlichen sowie anderen klinischen Begleitfaktoren auszuwählen. Mögliche Entnahmeröhrchen sind im Kapitel 5 aufgeführt. Füllvolumen: Gesamtmenge von **max. 1 ml pro Kilogramm Körpergewicht pro Woche, maximal entsprechend der Erwachsenenmenge (siehe 3.b)**). Die Befüllung der Entnahmeröhrchen sollte nach Möglichkeit vollständig entsprechend der Herstellerangabe und anhand nachfolgender Priorisierung erfolgen:

Priorisierung	Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
1	Serum	ca. 25 % [‡]	Zentrifugation Gewinnung von Serum	<ul style="list-style-type: none"> Serum: max. 8 x 0,3 ml 	<ul style="list-style-type: none"> Schutzstufe 2 PSA[#] Sicherheitswerkbank Klasse 2 empfohlen Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
2	Citrat-Blut	ca. 10 % [‡]	Zentrifugation Gewinnung von Plasma	<ul style="list-style-type: none"> Plasma: max. 7 x 0,3 ml 	
3	PAXgene [®] RNA-Blut Abnahme direkt in RNA-Röhrchen	ca. 10 % [‡]	Keine	<ul style="list-style-type: none"> Direktes Einfrieren der Röhrchen nach Lagerung von mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) 	
4	Heparin-Blut Alternativ: 2. Röhrchen EDTA-Blut oder BD CPT [™] -Heparin	ca. 30 % ^{‡,Δ}	Isolierung von PBMCs, Gewinnung von Plasma	<ul style="list-style-type: none"> Plasma: max. 16 x 0,3 ml PBMCs isolieren und Zellzahl einstellen auf 10x10⁶ Zellen/ml → Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 4 x 0,5 ml 	

Priorisierung	Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
5	EDTA-Blut	ca. 25 % [‡]	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> • Plasma • Zellen = <i>Buffy coat</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma: max. 8 x 0,3 ml • Zelluläre Bestandteile (Buffy coat): 1-2 x 0,5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Schutzstufe 2 • PSA[#] • Sicherheitswerkbank Klasse 2 empfohlen • Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)

[‡] Bezogen auf Gesamtmenge von **max. 1 ml pro Kilogramm Körpergewicht pro Woche, maximal entsprechend der Erwachsenenmenge**

[#] PSA = Persönliche Schutzausrüstung (Schutzkittel, Einmalhandschuhe Nitril, Schutzbrille/Gesichtsschild, Mundschutz (bei Umgang mit respiratorischen Proben mind. FFP2))

[^] Hierfür ist jeweils lokal zu prüfen, welche Blutmenge abhängig vom Körpergewicht und anderen klinischen Begleitfaktoren entnommen werden kann. Falls dieser Umfang sowie das bestehende Ethikvotum es zulassen, wird empfohlen zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs zu entnehmen, um die Ausbeute an PBMCs zu erhöhen.

b) Blut Jugendliche und im Intervall der Studienteilnahme erwachsen gewordene Patient*innen und Kontrollen (ab ca. 26 Kilogramm Körpergewicht)

Die Befüllung der Entnahmeröhrchen sollte nach Möglichkeit vollständig entsprechend der Herstellerangabe erfolgen:

Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
Serum	4,9 ml	Zentrifugation Gewinnung von Serum	<ul style="list-style-type: none"> • Serum: max. 8 x 0,3 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Schutzstufe 2 • PSA[#] • Sicherheitswerkbank Klasse 2 empfohlen
Citrat-Blut	4,3 ml	Zentrifugation Gewinnung von Plasma	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma: max. 7 x 0,3 ml 	

Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
Heparin-Blut Alternativ: 2. Röhrchen EDTA-Blut 9 ml oder BD CPT™-Heparin 8 ml	9 ml ^Δ	Isolierung von PBMCs, Gewinnung von Plasma	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma: max. 16 x 0,3 ml • PBMCs isolieren und Zellzahl einstellen auf 10x10⁶ Zellen/ml. Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 4 x 0,5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
EDTA-Blut	4,9 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> • Plasma • Zellen = <i>Buffy coat</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma: max. 8 x 0,3 ml • Zelluläre Bestandteile (<i>Buffy coat</i>): 2 x 0,5 ml 	
PAXgene® RNA-Blut Abnahme direkt in RNA-Röhrchen	2,5 ml	Keine	<ul style="list-style-type: none"> • Direktes Einfrieren der Röhrchen nach Lagerung von mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) 	

^Δ Es wird empfohlen zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs zu entnehmen, um die Ausbeute an PBMCs zu erhöhen. Hierfür ist jeweils lokal zu prüfen, ob das bestehende Ethikvotum eine Erhöhung der entnommenen Blutmenge in diesem Umfang abdeckt.

c) Sonstige Bioproben Kinder (bis ca. 26 Kilogramm Körpergewicht)

Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
Oropharyngealabstrich oder Nasopharyngealabstrich° [bei Intensivpatient*innen ggf. BAL oder ENTA (s. unten) im Rahmen diagnostischer Eingriffe]	1 Abstrich	Keine	<ul style="list-style-type: none"> • Oro- oder Nasopharyngealabstrich: Direktes Einfrieren in 2,0 ml Cryoröhrchen mit DNA/RNA Shield™ 	<ul style="list-style-type: none"> • Schutzstufe 2 • PSA (Mundschutz, mind. FFP2¹) • Sicherheitswerkbank Klasse 2 verwenden

¹ filtering face piece 2

Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
Wangenabstrich ²	1 Abstrich	Keine	<ul style="list-style-type: none"> • Direktes Einfrieren im eSwab™ 	<ul style="list-style-type: none"> • Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
Speichel	1 Salivette®	Keine	<ul style="list-style-type: none"> • Direktes Einfrieren der Salivette® 	
Bronchoalveoläre Lavage (BAL) [°] (bei Intensivpatient*innen)	3x1 ml/kg; ca. 5-10 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> • Überstand • Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • BALF: max. 5 x 1,6 ml • BAL-Zellen: Zellzahl einstellen auf 2x10⁶ Zellen/ml. Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 6 x 0,3 ml 	
Trachealsekret (ENTA) [°] (bei Intensivpatient*innen)	ca. 2 ml	Versetzen mit 6 ml DNA/RNA Shield™	<ul style="list-style-type: none"> • ENTA: max. 3 x 1,6 ml 	
Urin [°]	10 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> • Überstand • Sediment 	<ul style="list-style-type: none"> • Überstand: max. 10 x 0,5 ml • Sediment: 1 x 0,5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Schutzstufe 2 • PSA • Sicherheitswerkbank Klasse 2 empfohlen • Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
Stuhl [°]	1 Röhrchen mit Stabilisierungsreakanz	Keine	<ul style="list-style-type: none"> • Direktes Einfrieren 	
Liquor [™]	max. 5 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> • Überstand • Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Überstand: max. 10 x 0,5 ml • Liquorzellen: Zellzahl einstellen auf 1x10⁵ Zellen/ml. Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 4 x 0,5 ml 	
Haare [†]	Haare in einer Gesamtlänge von min. 6 cm	Keine	<ul style="list-style-type: none"> • Lagerung bei RT in lichtgeschützter Verpackung 	<ul style="list-style-type: none"> • PSA

d) Sonstige Bioproben Jugendliche und im Intervall der Studienteilnahme erwachsen gewordene Patient*innen und Kontrollen (ab ca. 26 Kilogramm Körpergewicht)

Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
Oropharyngealabstrich oder Nasopharyngealabstrich° [bei Intensivpatient*innen ggf. BAL oder ENTA (s. unten) im Rahmen diagnostischer Eingriffe]	1 Abstrich	Keine	<ul style="list-style-type: none"> Oro- oder Nasopharyngealabstrich: Direktes Einfrieren in 2,0 ml Cryoröhrchen mit DNA/RNA Shield™ 	<ul style="list-style-type: none"> Schutzstufe 2 PSA (Mundschutz, mind. FFP2) Sicherheitswerkbank Klasse 2 verwenden Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
Speichel	1 Salivette®	Keine	<ul style="list-style-type: none"> Direktes Einfrieren der Salivette® 	
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)° (bei Intensivpatient*innen)	3x1 ml/kg; ca. 5-10 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> Überstand Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> BALF: max. 5 x 1,6 ml BAL-Zellen: Zellzahl einstellen auf 2×10^6 Zellen/ml. Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 6 x 0,3 ml 	
Trachealsekret (ENTA)° (bei Intensivpatient*innen)	ca. 2 ml	Versetzen mit 6 ml DNA/RNA Shield™	<ul style="list-style-type: none"> ENTA: max. 3 x 1,6 ml 	
Urin°	10 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> Überstand Sediment 	<ul style="list-style-type: none"> Überstand: max. 10 x 0,5 ml Sediment: 1 x 0,5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> Schutzstufe 2 PSA Sicherheitswerkbank Klasse 2 empfohlen Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
Stuhl°	1 Röhrchen mit Stabilisierungsreakanz	Keine	<ul style="list-style-type: none"> Direktes Einfrieren 	
Liquor ^π	max. 5 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> Überstand 	<ul style="list-style-type: none"> Überstand: max. 10 x 0,5 ml 	

Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
		<ul style="list-style-type: none"> Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> Liquorzellen: Zellzahl einstellen auf 1×10^5 Zellen/ml. Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 4 x 0,5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> Schutzstufe 2 PSA Sicherheitswerkbank Klasse 2 empfohlen Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
Haare [†]	Haare in einer Gesamtlänge von min. 6 cm	Keine	<ul style="list-style-type: none"> Lagerung bei RT in lichtgeschützter Verpackung 	<ul style="list-style-type: none"> PSA

^Σ Einmalige Abnahme

^π Abnahme nur bei Patient*innen und Kontrollen ab 4 und bis 17 Jahren im Rahmen medizinisch indizierter Lumbalpunktion

[°] wird max. 1x pro Woche abgenommen

[†] Abnahme möglichst in 1. Studienvsiste, nach Ende des Akutverlaufes und bei den Follow-ups nach 3 und 12 Monaten

4. HINWEISE ZUM UMGANG MIT BIOPROBEN VON SARS-COV-2 POSITIV-GETESTETEN PATIENT*INNEN

Zum Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen, wie humanen Bioproben, sind die Regelwerke Biostoffverordnung (BioStoffV), Infektionsschutzgesetz, Arbeitsschutzgesetz und Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 400) maßgeblich. Vom Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) wurde am 26.05.2020 ein aktualisierter Beschluss veröffentlicht, der die Eingruppierung des neuartigen SARS-CoV-2 Virus sowie Empfehlungen zu nicht gezielten Tätigkeiten (Labordiagnostik, Lagerung) und gezielten Tätigkeiten für positiv getestete Bioproben behandelt. Am 08.12.2020 wurde der Beschluss aktualisiert und SARS-CoV-2 in Risikogruppe 3 eingestuft.

Bitte stimmen Sie das angemessene Vorgehen in Ihrer Einrichtung mit ihrem/ihrer zuständigen Beauftragten für die biologische Sicherheit ab, da lokale Abweichungen von den unten aufgeführten Vorgaben möglich sind.

Es gilt zu beachten: das Virus SARS-CoV-2 wurde der **Risikogruppe 3** zugeordnet.

- Nicht gezielte Tätigkeiten im Rahmen der Labordiagnostik von SARS-CoV-2, ausgehend vom Untersuchungsmaterial, z. B. die Probenvorbereitung und -aufbereitung, die Inaktivierung zur Durchführung molekularbiologischer Techniken (PCR) sowie die Verwendung von positiv getestetem Untersuchungsmaterial (ohne Vermehrung oder Anreicherung der Viren) als Referenzmaterial zur Erprobung alternativer SARS-CoV-2-Nachweis- und Testverfahren, können unter den Bedingungen der **Schutzstufe 2** durchgeführt werden. *Vorzugsweise sollte mit inaktivierten Proben gearbeitet werden.*
- Alle Tätigkeiten, die zur Freisetzung von SARS-CoV-2 führen können, z. B. das Öffnen von Probengefäßen mit respiratorischem Material (Abstriche, Sputum, BAL, etc.) sind in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchzuführen. Dabei sind Schutzkittel und geeignete Schutzhandschuhe zu tragen. Atemschutzmaßnahmen (mindestens FFP2-Schutzmasken) und das Tragen von Schutzbrillen oder Gesichtsschilden werden im Rahmen der Primärdiagnostik empfohlen und sind anzuwenden bei der Weiterverwendung von positiv getestetem Untersuchungsmaterial als Referenzmaterial zur Erprobung alternativer SARS-CoV-2 Nachweisverfahren.
- Die Tätigkeiten haben durch fachkundige Beschäftigte zu erfolgen, die auch zur sicheren Handhabung zum Tragen der persönlichen Schutzausrüstung unterwiesen sind.
- Nach der Arbeit ist eine Desinfektion und Entsorgung möglicherweise kontaminierter Oberflächen, Materialien oder der persönlichen Schutzausrüstung so umzusetzen, das eine Verschleppung und Exposition der Beschäftigten oder Dritter mit dem SARS-CoV-2 ausgeschlossen ist. Die Möglichkeit eine für SARS-CoV-2 reservierte

Sicherheitswerkbank oder eine andere räumliche Trennung von anderen Arbeitsbereichen vorzusehen kann in diesem Zusammenhang sinnvoll sein.

- Gezielte Tätigkeiten nach §5 BioStoffV mit dem SARS-CoV-2, wie z. B. dessen Vermehrung, Verfahren zur Anreicherung von infektiösen nicht-inaktivierten Viren, die Verwendung von SARS-CoV-2 infizierten Zellkulturen und Proben, welche bereits angereichertes Virus enthalten, sind in Laboratorien der **Schutzstufe 3** durchzuführen.

Quelle: Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe – ABAS, Beschluss 1/2020 in aktualisierter Fassung vom 26.05.2020 und 08.12.2020

Eine Übersicht zum aktuellen Stand im Umgang mit SARS-CoV-2-Proben ist der Webseite des German Biobank Node (GBN) zu entnehmen:

<http://www.bbmri.de/covid-19/arbeiten-mit-sars-cov-2-proben/>

Die gültigen Arbeitsschutzregeln der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin sind hier zu finden:

<https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/AR-CoV-2/AR-CoV-2.html>

5. VORBEREITUNG ENTNAHME-KITS NAPKON PÄDIATRIE-MODUL

Sofern am jeweiligen Standort Entnahme-Kits für das NAPKON Pädiatrie-Modul vorab zusammengestellt werden sollen, kann dies anhand folgender Übersicht erfolgen. Ausführliche Informationen entnehmen Sie bitte der aktuellen Version der Bestellübersicht.

Alternativ zu den hier angegebenen Blutentnahmeröhrchen (Monovetten) von Sarstedt ist auch die Verwendung vergleichbarer Blutentnahmeröhrchen, z. B. Vacutainer von Becton Dickinson (BD) o. ä. zulässig.

Zusammenstellen der benötigten Verbrauchsmaterialien	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
Folientüte für alle benötigten Verbrauchsmaterialien und ggf. Unterlagen	Beschriften: „NAPKON Pädiatrie-Modul“
<p>1x Serum-Microvette® (Verschluss weiß, EU Farbcode):</p> <p>100 µl (Bestellnr. 20.1280, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>200 µl (Bestellnr. 20.1290, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>300 µl (Bestellnr. 20.1308, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>500 µl (Bestellnr. 20.1343, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>1x Serum-Monovette (Verschluss weiß, EU Farbcode):</p> <p>1,2 ml (Bestellnr. 06.1663, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>2,7 ml (Bestellnr. 05.1557, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>4,9 ml (Bestellnr. 04.1934, Sarstedt)</p>	<div data-bbox="794 869 1059 949" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="783 972 906 994">Bildquelle: [1]</p> <div data-bbox="794 1473 1305 1568" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="783 1585 906 1608">Bildquelle: [2]</p>

Zusammenstellen der benötigten Verbrauchsmaterialien	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
<p>1x Citrat-Monovette (Verschluss grün, EU Farbcode):</p> <p>1,4 ml (Bestellnr. 06.1668.001, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>1,8 ml (Bestellnr. 04.1955, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>2,9 ml (Bestellnr. 04.1902, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>4,3 ml (Bestellnr. 04.1922, Sarstedt)</p>	 <p>Bildquelle: [3]</p>
<p>1x EDTA-Microvette® (Verschluss rot, EU Farbcode):</p> <p>100 µl (Bestellnr. 20.1278, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>200 µl (Bestellnr. 20.1288, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>500 µl (Bestellnr. 20.1341, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>1x EDTA-Monovette (Verschluss rot, EU Farbcode):</p> <p>1,2 ml (Bestellnr. 06.1664, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>2,7 ml (Bestellnr. 05.1167, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>4,9 ml (Bestellnr. 04.1931, Sarstedt)</p>	 <p>Bildquelle: [4]</p>  <p>Bildquelle: [5]</p>

Zusammenstellen der benötigten Verbrauchsmaterialien	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
<p>1x Heparin-Monovette^A (Verschluss orange, EU Farbcode):</p> <p>2,7 ml (Bestellnr. 05.1553, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>4,9 ml (Bestellnr. 04.1936, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>7,5 ml (Bestellnr. 01.1604, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>9 ml (Bestellnr. 02.1065, Sarstedt)</p> <p>Hinweis: Sollten für die Aufreinigung der PBMCs andere Röhren verwendet werden (z. B. EDTA-Monovette oder CPT™), entfällt diese Monovette!</p>	 <p>Bildquelle: [6]</p>
<p>1x BD Vacutainer™ CPT™ Preparation Tube with Sodium Heparin 8 ml^A (Bestellnr. 362780, Becton Dickinson)</p> <p>Hinweis: Sollten für die Aufreinigung der PBMCs andere Röhren verwendet werden (z. B. Heparin- oder EDTA-Monovette), entfällt dieses Röhren!</p>	 <p>Bildquelle: [7]</p>
<p>Blutkultur-Adapter LongNeck mit montiertem Membran-Adapter (Bestellnr. 14.1207, Sarstedt)</p> <p>oder</p> <p>Kombination aus:</p> <p>1x Vacutainer Einmalhalter (Bestellnr. 364815, Becton Dickinson)</p> <p>+</p> <p>1x Luer-Adapter (Bestellnr. 367300, Becton Dickinson)</p> <p>+</p> <p>1x Membran-Adapter (Bestellnr. 14.1112, Sarstedt)</p>	 <p>Bildquelle: [8]</p>  <p>Bildquelle: [9]</p>  <p>Bildquelle: [10]</p>  <p>Bildquelle: [11]</p>

Zusammenstellen der benötigten Verbrauchsmaterialien	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
1x BD PAXgene®-Röhrchen 2,5 ml (Bestellnr. 762165, Becton Dickinson)	 Bildquelle: [12]
1x Urin-Monovette 10 ml (Bestellnr. 10.252, Sarstedt)	 Bildquelle: [13]
1x Urin-Auffangbeutel mit Ablauf für Frühgeborene und Säuglinge (z. B. Bestellnr. 227571, Braun) oder 1x Urinbecher (Bestellnr. 75.562.105, Sarstedt)	 Bildquelle: [14]  Bildquelle: [15]
1x Salivette® (Bestellnr. 51.1534, Sarstedt)	 Bildquelle: [16]
Sterile Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer in Blistern ohne Medium für Oro- oder Nasopharyngealabstrich (Bestellnr. 502CS01, Hain Lifescience)	 Bildquelle: [17]
1 ml verschließbares Röhrchen gefüllt mit 0,9%iger Kochsalzlösung	Für Oro- oder Nasopharyngealabstrich
2D-codierte 2,0 ml Cryoröhrchen gefüllt mit 0,4 ml DNA/RNA Shield™ (Bestellnr. R1100-50 o. R1100-250, Zymo Research)	Für Oro- oder Nasopharyngealabstrich
1x eSwab™ für Wangenabstrich (Bestellnr. 482CE, Hain Lifescience)	 Bildquelle: [18]
Für Intensivpatient*innen zusätzlich: 15 ml Zentrifugen-Röhrchen gefüllt mit 6 ml DNA/RNA Shield™ (entfällt	Für Gewinnung von Trachealsekret

Zusammenstellen der benötigten Verbrauchsmaterialien	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
bei Entnahme von Bronchoalveolärer Lavage)	
1x Stuhlsammelgefäß mit DNA Stabilisator (Bestellnr. 1038111200 oder 1038111300, Invitek Molecular)	 Bildquelle: [19]
Stuhlfänger MED AUXIL 150 x 470 mm (Bestellnr. S1000, Süsse)	 Bildquelle: [20]
Gewinnung Haarprobe: Alufolie Schere Haarklemme Kamm Bindfaden	 Bildquelle: [21]
15 ml Zentrifugen-Röhrchen	Für Haarprobe

^Δ Empfehlung: Entnahme von zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs (zusätzliche Blutmenge muss über lokales Ethikvotum abgedeckt sein!)

a) Röhrchen mit entsprechenden Proben-ID-Etiketten bekleben

Die nachfolgende Benennung der Bioprobenarten, die auf den Proben-ID-Etiketten angegeben sind, bezieht sich auf die verwendeten Bezeichnungen im LIMS des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK).

- 1x Serum-Röhrchen mit Etikett „Serum“
- 1x Citrat-Röhrchen mit Etikett „Citrat“
- 1x Heparin-/EDTA /CPT™-Röhrchen mit Etikett „Heparin für PBMC“/„EDTA für PBMC“/„CPT für PBMC“^Δ
- 1x EDTA-Röhrchen mit Etikett „EDTA Vollblut“
- 1x BD PAXgene®-Röhrchen mit Etikett „PAX-Gene“
- Urin-Monovette mit Etikett „Urin“. Das Etikett für die Urin-Monovette außen an die Packung tackern (nach Öffnen sonst unsteril).
- 1x Salivette® mit Etikett „Speichel“

- 1x Stuhlröhrchen mit Etikett „Stuhl“
- 1x 15 ml Zentrifugen-Röhrchen für Haare mit Etikett „Haare“
- 1x Sammelgefäß für Liquor mit Etikett „Liquor“
- 1x eSwab™ mit Etikett „Wangenabstrich“

△ Es wird empfohlen zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs zu entnehmen, um die Ausbeute an PBMCs zu erhöhen. Hierfür ist jeweils lokal zu prüfen, ob das bestehende Ethikvotum eine Erhöhung der entnommenen Blutmenge in diesem Umfang abdeckt.

Nur bei Intensivpatient*innen:

- Gefäß(e) (z. B. 50 ml Zentrifugen-Röhrchen) mit Bronchoalveolärer Lavage mit Etikett „BAL“ (entfällt bei Entnahme von Trachealsekret)
- 15 ml Zentrifugen-Röhrchen gefüllt mit DNA/RNA Shield™ mit Etikett „Trachealsekret“ (entfällt bei Entnahme von Bronchoalveolärer Lavage)

b) Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

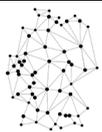
Ausdrucken der notwendigen Unterlagen und Etikettieren

- Ausdrucken aller relevanten PBB ([s. Anlage](#))
- Auf die Folientüte (s. Kap. 5a) sowie die KIT-ID-Felder der PBB Papier-Etiketten **mit der gleichen KIT-ID** aufkleben
- Auf die Proben-ID-Felder der PBB und auf die Entnahmeröhrchen die entsprechenden Etiketten **mit der gleichen Proben-ID** aufkleben (ein Etikett für das Entnahmeröhrchen, Papier-Etiketten für die PBB)
- 1x Hauspostumschlag mit der Adresse der Studienassistentz beschriften und ebenfalls beilegen (für PBB, die an die Studienassistentz zurückgeschickt werden sollen)

6. STANDARDARBEITSANWEISUNGEN (SOPS)

Nachfolgend werden alle für die Bioprobensammlung im Rahmen des NAPKON Pädiatrie-Moduls erforderlichen SOPs aufgeführt:

- [Blutgewinnung und -verarbeitung](#) zu [Serum](#), [Plasma](#), zellulären Bestandteilen ([Buffy coat](#)) und [PBMCs](#) sowie [RNA-stabilisiertem Blut \(PAXgene®\)](#)
- [Oropharyngealabstrich](#) oder [Nasopharyngealabstrich](#), im Falle von Intensivpatient*innen [Bronchoalveoläre Lavage \(BAL\)](#) oder [Trachealsekret \(ENTA\)](#)
- [Wangenabstrich](#)
- [Speichel](#)
- [Uringewinnung und -verarbeitung](#)
- [Stuhlgewinnung](#)
- [Haargewinnung](#)
- [Liquorgewinnung und -verarbeitung](#)



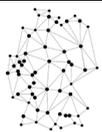
Standardarbeitsanweisung

09.2021/V1.0

Blutentnahme und -verarbeitung

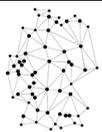
NAPKON-PÄD-SOP-01: Blutentnahme und -verarbeitung

Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	Keiner
Anlagen:	A1: Handbuch CPT™ A2: Handbuch Leucosep™ A3: Herstelleranleitung SepMate™ PBB 1B-9B „Blut“ Flow Chart zur Blutentnahme: Vorbereitung Flow Chart zur Blutentnahme Flow Chart zur Blutverarbeitung Serum Flow Chart zur Blutverarbeitung Citrat-Plasma Flow Chart zur Blutverarbeitung EDTA-Plasma Flow Chart zur Probenverarbeitung von Heparin- oder EDTA-Blut zu Plasma und PBMCs Flow Chart zur Probenverarbeitung RNA-Röhrchen PAXgene® Flow Chart zur Probenverarbeitung von BD-CPT™ zu Plasma und PBMCs



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben.....	22
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen.....	22
3.	Geltungsbereich	23
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen.....	23
5.	Zuständigkeiten	23
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	23
6.1.	Benötigte Materialien	23
6.2.	Benötigte Dokumente	24
6.3.	Arbeitsanleitung.....	24
6.3.1.	Blutentnahme.....	24
6.3.2.	Anweisung zur Weiterverarbeitung der Blutproben	29
6.3.2.1.	Serum.....	29
6.3.2.2.	Citrat-Blut.....	30
6.3.2.3.	EDTA-Blut	30
6.3.2.4.	PBMC-Reinigung (Vollblut aus unterschiedlichen Röhrchentypen zulässig).....	32
6.3.2.5.	RNA-Blut (PAXgene®).....	45
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	45
8.	Anlagen.....	45

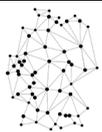


1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf von Blutentnahmen und die Weiterverarbeitung der pädiatrischen Blutproben unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

Microvetten®	System für die kapilläre Blutentnahme
Monovetten®	Blutentnahmeröhrchen nach diesem System (z. B. Monovette®) entsprechen dem Aufbau einer Spritze. Durch Herausziehen des Stempels entsteht ein Unterdruck, der die Blutentnahme beschleunigt (Aspirationssystem).
Vacutainer®	Innerhalb des Probengefäßes dieses Typs (z. B. Vacutainer®) herrscht ein Unterdruck. Wird es auf den mit der Punktionskanüle verbundenen Adapter gesteckt, wird durch diesen Unterdruck das Blut angesaugt.
PAXgene® RNA Tube	Blutentnahmeröhrchen, das ein Additiv enthält, das die intrazelluläre RNA stabilisiert und damit die Standardisierung von Genexpressionsanalysen ermöglicht. Die RNA wird bereits im Blutentnahmeröhrchen während der Blutentnahme stabilisiert.
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
BD CPT™	Becton Dickinson Cell Preparation Tube™; Blutentnahmeröhrchen mit integriertem FICOLL™-Gradienten zur Gewinnung von PBMCs.
PBB	Probenbegleitbogen
RNA/DNA	Ribonukleinsäure/Desoxyribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
x g	Zentrifugationsgeschwindigkeit in g
min	Minuten



ml	Milliliter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure: Komplexbildner
Heparin	Gerinnungshemmer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
Hämolyse	Zerstörung von Erythrozyten und Freisetzung intrazellulärer Bestandteile
ZVK	Zentraler Venenkatheter

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Lokale SOPs zur Blutentnahme

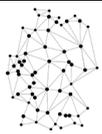
5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz/Pflegekraft
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistentz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistentz
Einlagerung	Technische Assistentz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistentz

6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Blutentnahmeröhrchen (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit). Die Befüllung der Entnahmeröhrchen sollte nach Möglichkeit **vollständig** entsprechend der Herstellerangabe und bei Kindern anhand nachfolgender Priorisierung erfolgen:



Probenart	Volumen	Verwendung für	Verarbeitung
Serum	4,9 ml/ 2,7 ml/ 1,2 ml/ 0,1-0,5 ml (Microvette®)	Biomarkeranalysen	Zentrifugation; Gewinnung von Serum
Citrat-Blut	4,3 ml/ 2,9 ml/ 1,8 ml/ 1,4 ml	Gerinnungsanalysen	Zentrifugation; Gewinnung von Plasma
PAXgene® RNA-Blut	2,5 ml	RNA-Isolation, Expressionsanalysen	Keine
Heparin-Blut ^Δ <i>Alternativ:</i> 2. Röhrchen EDTA- Blut oder BD CPT™ Heparin 8 ml	9 ml/ 7,5 ml/ 4,9 ml/ 2,7 ml	Zelluläre Immunologie	Zentrifugation; Gewinnung von Plasma und Isolierung von PBMCs
EDTA-Blut	4,9 ml/ 2,7 ml/ 1,2 ml/ 0,1-0,5 ml (Microvette®)	Plasma: Klinische Chemie, Metabolomics, Proteomics, etc. <i>Buffy coat:</i> Gewinnung genomischer DNA	Zentrifugation; Gewinnung von Plasma und <i>Buffy coat</i>

^Δ Es wird empfohlen zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs zu entnehmen, um die Ausbeute an PBMCs zu erhöhen. Hierfür ist jeweils lokal zu prüfen, ob das bestehende Ethikvotum eine Erhöhung der entnommenen Blutmenge in diesem Umfang abdeckt.

6.2. Benötigte Dokumente

- Etiketten mit Proben-ID für Blutröhrchen (Serum, Citrat, Heparin oder 2. EDTA oder CPT™, EDTA und PAXgene®)

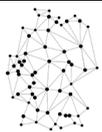
Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Blut“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Blutentnahme

Grundsätzlich gilt: Jegliche Gewinnung von Bioproben muss sich an den Richtlinien der „Guten wissenschaftlichen Praxis“ orientieren!



Bei der Gewinnung und Verarbeitung von pädiatrischen Blutproben wird keinerlei gewonnenes Blut bzw. generierte Blutderivate verworfen, sondern vollständig als Restmaterial asserviert!

1. Vorbereitung Patient*innen und Kontrollen

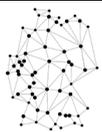
Parameter	NAPKON Pädiatrie-Modul
Dauer von Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz (Nüchternheit)	Bitte im PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren
Tageszeit der Blutentnahme	Bitte im PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren
Ruhezeit in unveränderter Körperhaltung vor Blutentnahme	Falls möglich: 5-10 min Bitte im PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren
Körperhaltung bei Blutentnahme	Sitzend oder liegend möglich Bitte im PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren

2. Blutentnahme

Die Blutentnahme hat gemäß den lokalen gültigen Arbeitsanweisungen zu erfolgen.

Parameter	NAPKON Pädiatrie-Modul
Dauer der Blutstauung vor Blutentnahme	Nach Möglichkeit maximal 1 Minute, öffnen sobald Nadel in Vene und Blut fließt!
Arterielle Blutentnahme	Zulässig Bitte im PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren
Blutentnahme aus zentralem Venenkatheter (ZVK)	Zulässig Bitte im PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren
Probenreihenfolge bei Blutentnahme [§]	Reihenfolge: Serum → Citrat → Heparin (entfällt bei CPT™ oder 2. EDTA-Röhrchen) → EDTA → CPT™ (entfällt bei Heparin- oder 2. EDTA-Röhrchen) → RNA-Blut

[§]Die Befüllung der Entnahmeröhrchen sollte nach Möglichkeit vollständig entsprechend der Herstellerangabe und bei Kindern entsprechend der angeführten Priorisierung erfolgen (s. Kap. 6.1).



Blutentnahme Kinder

Die Wahl des Infusionsbestecks für die Blutentnahme erfolgt je nach Alter und Gewicht von dem/der Patient*in bzw. Kontrolle.

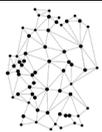
Vorgehen bei Säuglingen und ggf. Kleinkindern:

- Venenpunktion mit der Spitze einer geeigneten sterilen Kanüle. Aus dem Konus, der in dem/der Patient*in liegenden Kanüle bzw. des Abbocaths mit einer 5 oder 10 ml Spritze, auf die eine sterile Nadel aufgesetzt wurde, die geplante Menge Blut abziehen. Danach Entfernung der Kanüle und Venenkompression.
- Zügiges Umfüllen des entnommenen Blutes aus der Spritze in die Blutröhrchen entsprechend der priorisierten Reihenfolge. Schrauben Sie dazu den oberen Verschluss des entsprechenden Röhrchens ab, lassen Sie das Blut eintropfen und verschrauben Sie das Röhrchen wieder sorgfältig.
- Nach der Befüllung und dem Verschließen mit dem Schraubdeckel können Sie den Kolben seitlich abbrechen und beiseitelegen.
- Vermischen Sie den Röhrcheninhalt vorsichtig indem Sie die Röhrchen 2-3-mal um 180° schwenken (Luftblasen müssen vollständig durchlaufen). Vermeiden Sie Schaumbildung.
- Dokumentieren Sie alle erforderlichen Parameter auf den PBB bzw. im LIMS.

Neben den Blutentnahmeröhrchen (Monovetten) von Sarstedt ist auch die Verwendung vergleichbarer Blutentnahmeröhrchen, z. B. Vacutainer von Becton Dickinson (BD) o. ä. zulässig.

Folgendes ist bei der Befüllung der Blutröhrchen zu beachten:

Reihenfolge der Befüllung, wie oben beschrieben, einhalten. **Es ist sehr wichtig die Blutröhrchen vollständig zu befüllen, insbesondere bei Citrat-, CPT™- und PAXgene®-Röhrchen, damit das Verhältnis von Additiv und Blutmenge stimmt!** Generell gilt: Die Befüllung der Entnahmeröhrchen sollte nach Möglichkeit vollständig entsprechend der Herstellerangabe erfolgen.



Verwendung von Monovetten-Systemen: Füllen Sie die Monovetten durch gleichmäßigen Zug am Stempel (übermäßiger Unterdruck und damit zu schnelles Einfließen kann Hämolyse bedingen!). Der Stempel kann nach vollständiger Befüllung unter leichtem Druck abgeknickt werden. Anschließend wird die Monovette nach einer leichten Linksdrehung vom Multi-Adapter abgezogen, 2-3-mal um 180° geschwenkt (Luftblase muss komplett durchlaufen) und dann aufrecht in einen Ständer gestellt (entsprechend der Ausrichtung nachher bei der Zentrifugation).

Befüllung der Vacutainer-Systeme (CPT™ (BD), PAXgene®):

Falls für die Blutentnahme ein Monovetten-System verwendet wird, müssen für das Befüllen der Vacutainer Röhrchen auf die Kanüle der Sarstedt Membran Adapter, der Vacutainer Luer Adapter und der Vacutainer Einmalhalter aus Kunststoff aufgesetzt werden (s. Abbildung 1). Alternativ kann ein Blutkultur-Adapter LongNeck verwendet werden (s. Kapitel 5a).

CPT™-Röhrchen in Vacutainer Einmalhalter einführen und ca. 8 ml Blut sammeln (Rückfluss und Kontakt des Röhrcheninhalts mit dem Stopper vermeiden). Röhrchen nach dem Befüllen 8-10-mal um 180° schwenken (nicht schütteln!) und bei RT aufrecht in den Ständer stellen.

Optimal: innerhalb von 2 h weiterverarbeiten.

PAXgene® RNA Vacutainer-Röhrchen in Vacutainer Einmalhalter einführen, nach der vollständigen(!) Befüllung (ca. 2,5 ml, schwarze Markierung am Röhrchen) ca. 8-10-mal über Kopf schwenken. Bei RT 2 h aufrechtstehend lagern bis zum Einfrieren bei -20°C und nach mindestens 24 h finale Lagerung bei -80°C.



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

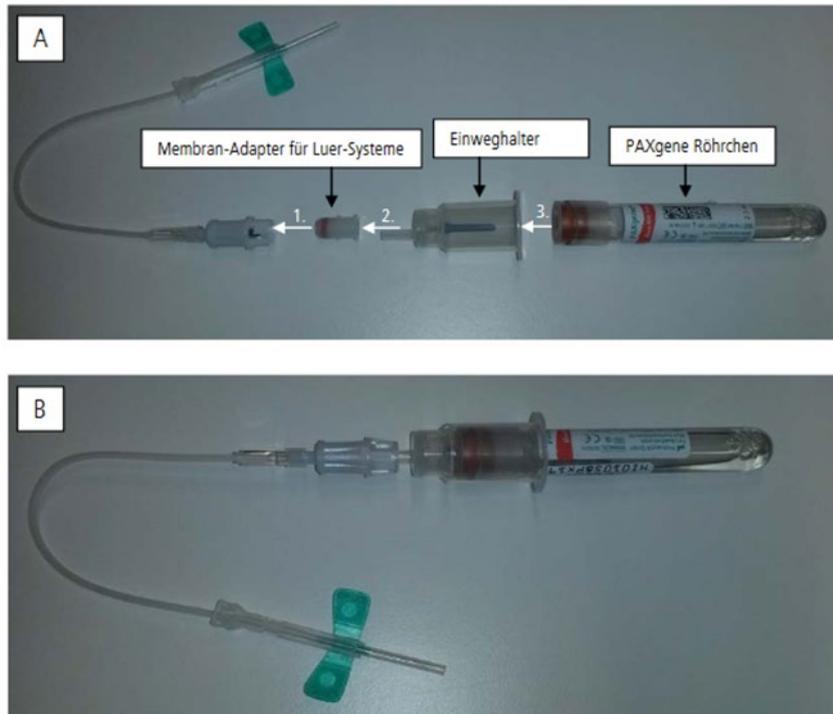


Abb. A und B:

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).

Abbildung 1: Adaptersystem für die Abnahme von Blut in Kombination von Sarstedt- und BD-Systemen (Bildquelle: [22])



6.3.2. Anweisung zur Weiterverarbeitung der Blutproben

Die Empfehlungen zur Verarbeitung von Citrat-Blut zu Plasma basieren auf einer SOP der KORA Fit-Studie.

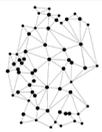
Die Empfehlungen zur Verarbeitung von EDTA-Blut (Plasma und Zellen), RNA-Blut und Serum basieren auf einer SOP der NAKO Gesundheitsstudie.

Die Angaben zur Verarbeitung von PBMC mittels Ficoll basieren auf der SOP der „Immune Monitoring Unit“ des Institutes für Virologie, Helmholtz-Zentrum München/TU München.

Es gilt: Je schneller die Verarbeitung nach der Blutentnahme erfolgt, umso besser (Empfehlung: 1-2 Stunden)! Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse, sofern nicht anders angegeben.

6.3.2.1. Serum

- a. Serum-Monovette wird nach der Blutentnahme 2-3-mal um 180° geschwenkt (Luftblasen müssen vollständig durchlaufen)
- b. Stehende Lagerung bei RT bis zur schnellstmöglichen Weiterverarbeitung und Versand ins Labor/Biobank. **Wichtig: Koagulationszeiten nach Herstellerangaben einhalten (mind. 30 min) bei stehender Lagerung!**
- c. Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Blutentnahme
 - Zentrifugation bei 2000 x g, 15 min, RT
- d. Transfer des Serums mittels z. B. steriler Einwegpipette ohne Berühren des Blutkuchens in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen (z. B. Falcon® Tube); Röhrchen nach Befüllen fest verschließen und Serum durch 2-3-maliges schwenken (nicht schütteln!) gut mischen (Homogenisierung des Überstandes entfällt bei automatisierter Aliquotierung).
- e. Aliquotierung und Einfrieren möglichst direkt nach Zentrifugation → Aliquotierung in max. 8 x 0,3 ml in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
- f. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
- g. Schnellstmögliches Einfrieren bei ≤-80°C, **max. 4 h** nach Blutentnahme



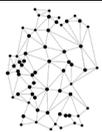
6.3.2.2. Citrat-Blut

- a. Natrium-Citrat-Monovette wird nach der Blutentnahme 2-3-mal um 180° geschwenkt (Luftblasen müssen vollständig durchlaufen)
- b. Stehende Lagerung bei RT bis zur sofortigen Weiterverarbeitung
- c. Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Blutentnahme
 - Zentrifugation bei 2000 x g, 15 min, RT
- d. Von der zentrifugierten Natrium-Citrat-Monovette maximales Volumen an Plasma ohne Berührung der *Buffy coat* Schicht z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen (z. B. Falcon® Tube) abnehmen; Röhrchen nach Befüllen fest verschließen und Plasma durch 2-3-maliges schwenken (nicht schütteln!) gut mischen (Homogenisierung des Überstandes entfällt bei automatisierter Aliquotierung).
- e. Aliquotierung und Einfrieren möglichst direkt nach Zentrifugation → Aliquotierung in max. 7 x 0,3 ml in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
- f. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
- g. Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Blutentnahme

6.3.2.3. EDTA-Blut

I. Plasma

- a. EDTA-Monovette wird nach der Blutentnahme 2-3-mal um 180° geschwenkt (Luftblasen müssen vollständig durchlaufen)
- b. Stehende Lagerung bei RT bis zur schnellstmöglichen Weiterverarbeitung und Versand ins Labor/Biobank
 - Optimal: Weiterverarbeitung innerhalb von 1-2 h
- c. Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Blutentnahme
 - Zentrifugation bei 2000 x g, 15 min, RT
- d. Von der zentrifugierten EDTA-Monovette maximales Volumen an Plasma ohne



Berührung der *Buffy coat* Schicht z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen (z. B. Falcon® Tube) abnehmen; Röhrchen nach Befüllen fest verschließen und Plasma durch 2-3-maliges schwenken (nicht schütteln!) gut mischen (Homogenisierung des Überstandes entfällt bei automatisierter Aliquotierung).

- e. Aliquotierung und Einfrieren möglichst direkt nach Zentrifugation → Aliquotierung in max. 8 x 0,3 ml in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
- f. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
- g. Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Blutentnahme

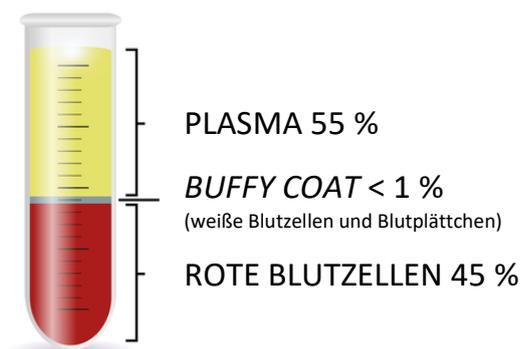
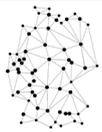


Abbildung 2: EDTA-Plasma nach Zentrifugation
(Bildquelle: [23])

II. Zelluläre Bestandteile (*Buffy coat*)

- a. Lagerung der zellulären Bestandteile bis zur Weiterverarbeitung: 4°C bzw. Eiswasser
- b. Nach Abnahme des Plasmas (s. o.) möglichst **direktes Einfrieren** der zellulären Bestandteile. Dazu die Zellen der *Buffy coat*-Schicht inkl. einem geringen Anteil der oberen und unteren Schichten (Plasma und Erythrozyten) mittels z. B. steriler Einwegpipette abheben und in ein neues 15 ml Röhrchen überführen. Die Zellen durch vorsichtiges Mischen mittels Einwegpipette homogenisieren (2-3-mal auf und abpipettieren); überführen von 2 x 0,5 ml in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
- c. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der



Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID

- d. Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Blutentnahme

6.3.2.4. PBMC-Reinigung (Vollblut aus unterschiedlichen Röhrchentypen zulässig)

Bitte je nach verwendeter Variante entsprechende Standards/Arbeitsanleitungen beachten! Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse, sofern nicht anders angegeben.

Als Alternative zu den Leucosep™-Röhrchen (Variante 2) kann auch das SepMate™-System (STEMCELL Technologies) nach Herstellerangaben verwendet werden. Die Anleitung des Herstellers ist der [Anlage A3](#) zu entnehmen. Es sollten möglichst keine weiteren Methoden zur Anwendung kommen (vorherige Absprache mit Bioprobenkern erforderlich, wenn doch geplant).

Empfehlung für geübte Labore bzw. Biobanken: PBMC-Reinigung über Ficoll-Gradienten (Variante 1) oder mittels Leucosep™- bzw. SepMate™-Röhrchen (Variante 2) durchführen.

Für alle Varianten gilt:

Kontrolliertes Einfrieren der Zellen durch Verwendung von Einfrierhilfen, wie z. B. *Mr. Frosty* oder *Biocision CoolCell* (-1°C pro Minute).

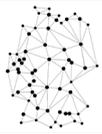
Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der isolierten PBMCs lässt sich manuell mithilfe eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) oder automatisiert ermitteln (z. B. mittels Sysmex XN-1000). Nachfolgend wird das manuelle Vorgehen mittels einer Neubauer-Zählkammer beschrieben (basierend auf Schrödel (2010), *Biologie in unserer Zeit*, 40 (5), S. 298). Empfohlen wird die Verwendung von Einweg-Zählkammern (z. B. C-Chip von Science Services, cat. no. NE63508-01).

1. Oberfläche der Neubauer-Zählkammer mit 70%igem Ethanol gut reinigen.
2. Ein Deckglas leicht anfeuchten (z. B. durch Anhauchen) und auf die Außenstege der Neubauer-Zählkammer aufdrücken. Die Ausbildung von Newton'schen Ringen zwischen den Außenstegen und dem Deckglas bestätigt, dass das Deckglas korrekt aufgesetzt wurde. **Die Schritte 1 und 2 entfallen bei der Verwendung einer Einweg-Zählkammer.**
3. Die isolierten und in Medium (RPMI 1640 Medium ergänzt mit 1 % PenStrep und 2-10 % FCS) resuspendierten PBMCs direkt vor der Probennahme mischen, um eine repräsentative Stichprobe für die Zellzahlbestimmung zu verwenden.



4. 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl der Live/Dead-Färbelösung vermischen. Sollte die Zellsuspension sehr viele Zellen enthalten eine zusätzliche Verdünnung (z. B. 1:5, 1:10) vornehmen. Aufgrund der Zytotoxizität von Trypanblau muss unverzüglich mit der Zellzählung begonnen werden, da sonst das Ergebnis der vitalen Zellen verfälscht wird.
5. Das Gemisch aus Zellsuspension und Live/Dead-Färbelösung direkt vor der Probennahme erneut mischen, um eine repräsentative Stichprobe auszuzählen und in die Neubauer-Zählkammer einfüllen. Hierbei sind Über- oder Unterfüllung zu vermeiden, da Oberflächenspannungen das Volumen der Zählkammer verändern können.
6. Die Neubauer-Zählkammer unter das Lichtmikroskop legen. Das Lichtmikroskop so einstellen, dass die Einteilungslinien der Neubauer-Zählkammer sichtbar werden und sich ein Großquadrat im Blickfeld befindet.
7. Auszählen von vier Großquadraten und Errechnung des Mittelwertes. Blau gefärbte Zellen sind beschädigt bzw. tot; intakte, vitale Zellen sind farblos. Für die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen sind lediglich die farblosen Zellen bei der Auszählung zu berücksichtigen. Bitte beachten: Zellen, die auf den Linien liegen, dürfen nicht zweimal gezählt werden. Dies wird vermieden indem beispielsweise nur die Zellen, die die linke oder untere Mittellinie berühren (L-Form) mitgezählt werden. Bei Neubauer Improved-Zählkammern erfolgt die Abgrenzung der Großquadrate durch dreifache Linien. Hier gilt die mittlere der drei Linien als Maßlinie.
8. Berechnung:
Gezählte Kammerfläche [mm²] x Kammertiefe [mm] = gezähltes Kammervolumen [µl]
Mittelwert der Zellzahl aus den vier Großquadraten x (1/gezähltes Kammervolumen) x 1000 x 2 (ggf. x zusätzlichen Verdünnungsfaktor) = Zellzahl/ml in der Ausgangsprobe
Volumen der Ausgangsprobe x Zellzahl/ml = Gesamtzellzahl
9. Reinigung der Neubauer-Zählkammer mit geeignetem Desinfektionsmittel bzw. fachgerechte Entsorgung der Einweg-Zählkammer.



A) Variante 1: Aufreinigung mittels Ficoll-Gradienten (aus Heparin- oder EDTA-Monovetten)

Reagenzien (Beispiele für geeignete Medien):

- Heparin- oder EDTA-Monovette mit Vollblut
- Medium: RPMI 1640 medium (Gibco, cat. no. 61870010) ergänzt mit 1 % PenStrep (Gibco, cat. no. 15140122) und 2-10 % FCS
- Ficoll Trenn-Lösung: Dichte 1.077 g/ml, **Aufbewahren bei RT in Dunkelheit!**
- Live/Dead Färbelösung: Trypan Blue (Sigma-Aldrich, cat.no. 93595-250ML) in PBS verdünnt (1:4)
- Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS, frisch hergestellt, bis Benutzung bei 4°C lagern (alternativ Verwendung geeigneter kommerzieller Einfriermedien möglich (z. B. CryoStor® CS10, Sigma-Aldrich, cat. no. C2874))
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, cat.no. D4540)
- Fetales Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, cat.no. F7524)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, cat. no. 14190094): pH 7.45

Durchführung unter sterilen Bedingungen (Werkbank):

1. Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette wird nach der Blutentnahme 5-mal um 180° geschwenkt (Luftblasen müssen vollständig durchlaufen)
2. Stehende Lagerung ausschließlich bei RT
3. Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Blutentnahme
 - Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
4. Abnehmen der Plasmaschicht bis ca. 0,5 cm oberhalb der Leukozytenschicht, z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette und überführen in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen
5. Zentrifugation des Plasmas bei 2000 x g, 15 min, RT



6. Abnehmen des Plasmas, z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette und überführen in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen
7. Röhrchen nach Befüllen fest verschließen und Plasma durch 2-3-maliges schwenken (nicht schütteln!) gut mischen (Homogenisierung des Überstandes entfällt bei automatisierter Aliquotierung).
8. Zeitnahe Aliquotierung in max. 16 x 0,3 ml-Aliquote in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
9. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
10. Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Blutentnahme
11. Restlichen Inhalt der Monovette (aus 4., Plasma wurde entnommen) in ein leeres Zentrifugen-Röhrchen überführen und mit PBS auf 35 ml auffüllen
12. In einem weiteren leeren Zentrifugen-Röhrchen (50 ml) 15 ml raumtemperierten Ficoll vorlegen
13. Langsames Auffüllen des Röhrchens mit dem verdünnten Heparin- oder EDTA-Blut aus 11. Beachten: Schichten sollten nicht vermischt werden.
14. Zentrifugation 800 x g, 20 min, RT, **ohne Bremse**

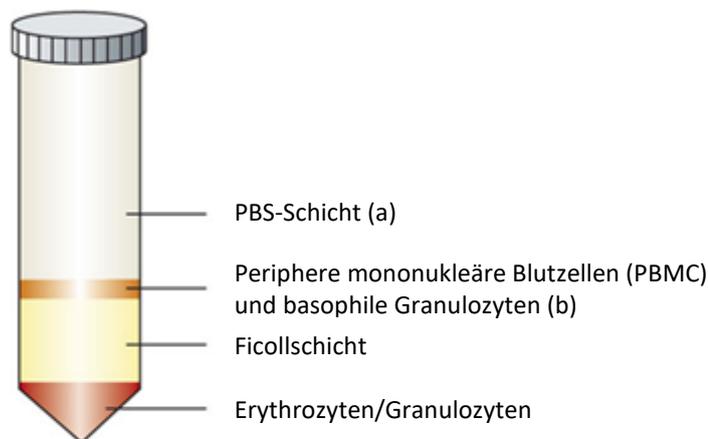
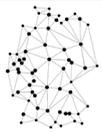


Abbildung 3: 50 ml Zentrifugen-Röhrchen nach Zentrifugation (Bildquelle: [23])



15. Abnehmen des Überstands bis ca. 0,5 cm oberhalb der Leukozytenschicht, z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette, Überstand verwerfen
16. Abnehmen der Leukozytenschicht (Abbildung 3, (b)) und Übertrag in ein neues 50 ml Zentrifugen-Röhrchen
17. Auffüllen mit PBS auf 45 ml
18. Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
19. Überstand verwerfen
20. Resuspendieren des Pellets mit 10 ml PBS
21. Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
22. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Medium zur Zellzahlbestimmung
23. Bestimmung der Zellzahl (s. Seite 32)
24. Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
25. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Einfriermedium auf eine Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml. Wichtig ist die Dokumentation der tatsächlichen Zellzahl auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS.
26. Aliquotieren in max. 4 x 0,5 ml mit einer Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml (= 5×10^6 Zellen pro Aliquot) in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen → **mindestens** 2 Aliquote mit angegebener Konzentration befüllen, ggf. Volumen pro Aliquot reduzieren (Minimalvolumen pro Aliquot: 250 µl)! Beträgt das Gesamtvolumen ≤ 500 µl nur **ein** 0,5 ml Cryoröhrchen befüllen. **Wichtig ist die Einhaltung der vorgegebenen Zellzahl/ml!**
Sollte die Gesamtausbeute unterhalb der geforderten Menge von 5×10^6 Zellen liegen, dann alle gewonnenen Zellen in 250 µl Einfriermedium aufnehmen und in **ein** 0,5 ml Cryoröhrchen überführen. Dokumentation des abweichenden Volumens und der entsprechenden Zellzahl auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS.
27. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-ID und verknüpfen mit Primärproben-ID



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

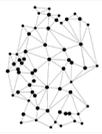
NAPKON Pädiatrie-Modul

Standardarbeitsanweisung

09.2021/V1.0

Blutentnahme und -verarbeitung

28. Schnellstmöglich mit dem Einfrierprozess beginnen. Langsames, kontrolliertes Einfrieren der Zellen durch die Verwendung von Einfrierhilfen, wie z. B. *CoolCell*[®] *Cell Freezing Containers* (Biocision) oder *Mr. Frosty* (Nalgene), Zwischenlagerung für max. 14 Tage bei -80°C möglich, **Langzeitlagerung in N₂-Gasphase**



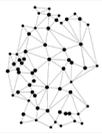
B) Variante 2: Aufreinigung mittels Leucosep™-Röhrchen (Leucosep™ Centrifuge Tubes, Greiner Bio-One) – alternativ Verwendung des SepMate™-Systems nach Herstellerangaben möglich (STEMCELL Technologies)

Reagenzien (Beispiele für geeignete Medien):

- Heparin- oder EDTA-Monovette mit Vollblut
- Leucosep™-Röhrchen, 50 ml (Greiner Bio-One)/alternativ: Leucosep™-Röhrchen, 50 ml, befüllt mit Ficoll (Greiner Bio-One)
- Medium: RPMI 1640 medium (Gibco, cat. no. 61870010) ergänzt mit 1 % PenStrep (Gibco, cat. no. 15140122) und 2-10 % FCS
- Ficoll Trenn-Lösung: Dichte 1.077 g/ml (entfällt bei Benutzung befüllter Leucosep™-Röhrchen), **Aufbewahren bei RT in Dunkelheit!**
- Live/Dead Färbelösung: Trypan Blue (Sigma-Aldrich, cat.no. 93595-250ML) in PBS verdünnt (1:4)
- Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS, frisch hergestellt, bis Benutzung bei 4°C lagern (alternativ Verwendung geeigneter kommerzieller Einfriermedien möglich (z. B. CryoStor® CS10, Sigma-Aldrich, cat. no. C2874))
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, cat.no. D4540)
- Fetales Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, cat.no. F7524)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, cat. no. 14190094): pH 7.45

Durchführung unter sterilen Bedingungen (Werkbank):

1. Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette wird nach der Blutentnahme 5-mal um 180° geschwenkt (Luftblasen müssen vollständig durchlaufen)
2. Stehende Lagerung ausschließlich bei RT
3. Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Blutentnahme
 - Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT



4. Abnehmen der Plasmaschicht bis ca. 0,5 cm oberhalb der Leukozytenschicht, z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette und überführen in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen
5. Zentrifugation des Plasmas bei 2000 x g, 15 min, RT
6. Abnehmen des Plasmas, z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette und überführen in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen
7. Röhrchen nach Befüllen fest verschließen und Plasma durch 2-3-maliges schwenken (nicht schütteln!) gut mischen (Homogenisierung des Überstandes entfällt bei automatisierter Aliquotierung).
8. Zeitnahe Aliquotierung in max. 16 x 0,3 ml-Aliquote in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
9. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
10. Schnellstmögliche Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Blutentnahme
11. Restlichen Inhalt der Monovette (aus 4., Plasma wurde entnommen) in ein leeres Zentrifugen-Röhrchen überführen und mit PBS auf 35 ml auffüllen
12. 50 ml Leucosep™-Zentrifugen-Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Lösung füllen (Schritte 12. und 13. entfallen bei Verwendung vorbefüllter Leucosep™-Röhrchen)
13. Zentrifugation 700 x g, 1 min, RT
14. Langsames Auffüllen des Leucosep™-Zentrifugen-Röhrchens mit dem verdünnten Heparin- oder EDTA-Blut aus 11.
15. Zentrifugation 800 x g, 15 min, RT, **ohne Bremse**
16. Abnehmen des Überstands bis ca. 0,5 cm oberhalb der Leukozytenschicht, z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette, Überstand verwerfen
17. Abnehmen der Leukozytenschicht (Abbildung 4, 3) b)) und Übertrag in ein neues 50 ml Zentrifugen-Röhrchen



Arbeitsablauf

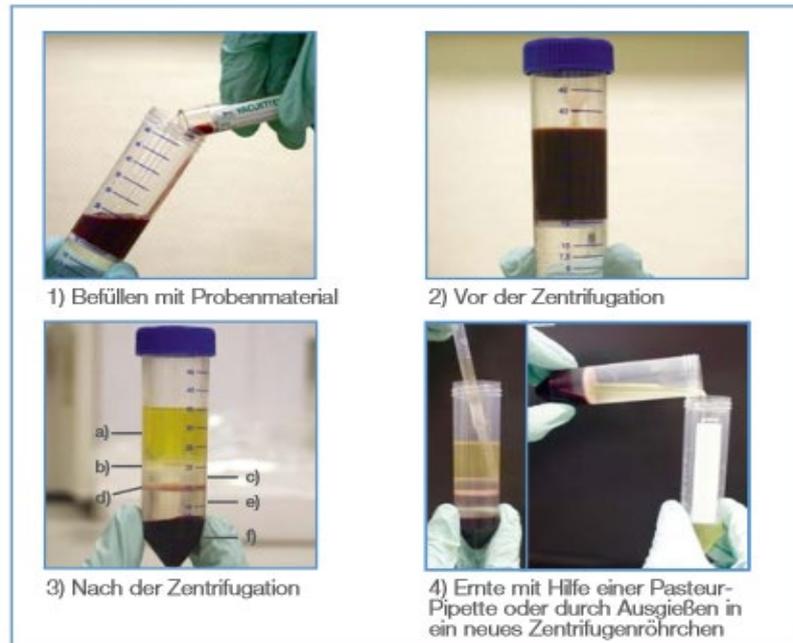
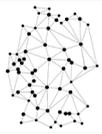


Abbildung 4: Arbeitsablauf Leucosep™-Röhrchen vor (2) und nach (3) Zentrifugation (Bildquelle: [24])

18. Auffüllen mit PBS auf 45 ml
19. Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
20. Überstand verwerfen
21. Resuspendieren des Pellets mit 10 ml PBS
22. Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
23. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Medium zur Zellzahlbestimmung
24. Bestimmung der Zellzahl (s. Seite 32)
25. Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
26. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Einfriermedium auf eine Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml. Wichtig ist die Dokumentation der tatsächlichen Zellzahl auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS.
27. Aliquotieren in max. 4 x 0,5 ml mit einer Konzentration von 10×10^6 /ml (= 5×10^6 Zellen pro Aliquot) in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen → **mindestens** 2 Aliquote mit angegebener Konzentration befüllen, ggf. Volumen pro Aliquot



reduzieren (Minimalvolumen pro Aliquot: 250 µl)! Beträgt das Gesamtvolumen ≤ 500 µl nur **ein** 0,5 ml Cryoröhrchen befüllen. **Wichtig ist die Einhaltung der vorgegebenen Zellzahl/ml!**

Sollte die Gesamtausbeute unterhalb der geforderten Menge von 5×10^6 Zellen liegen, dann alle gewonnenen Zellen in 250 µl Einfriermedium aufnehmen und in **ein** 0,5 ml Cryoröhrchen überführen. Dokumentation des abweichenden Volumens und der entsprechenden Zellzahl auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS.

28. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
29. Schnellstmöglich mit dem Einfrierprozess beginnen. Langsames, kontrolliertes Einfrieren der Zellen durch die Verwendung von Einfrierhilfen, wie z. B. *CoolCell® Cell Freezing Containers* (Biocision) oder *Mr. Frosty* (Nalgene), Zwischenlagerung für max. 14 Tage bei -80°C möglich, **Langzeitlagerung in N_2 -Gasphase**



C) Variante 3: Aufreinigung mittels CPT™-Röhrchen (BD Vacutainer™ CPT™ Preparation Tubes with Sodium Heparin)

Reagenzien (Beispiele für geeignete Medien):

- Vollblut in 8 ml CPT™-Röhrchen (Becton Dickinson)
- Medium: RPMI 1640 medium (Gibco, cat. no. 61870010) ergänzt mit 1 % PenStrep (Gibco, cat. no. 15140122) und 2-10 % FCS
- Live/Dead Färbelösung: Trypan Blue (Sigma-Aldrich, cat.no. 93595-250ML) in PBS verdünnt (1:4)
- Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS, frisch hergestellt, bis Benutzung bei 4°C lagern (alternativ Verwendung geeigneter kommerzieller Einfriermedien möglich (z. B. CryoStor® CS10, Sigma-Aldrich, cat. no. C2874))
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, cat.no. D4540)
- Fetales Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, cat.no. F7524)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, cat. no. 14190094): pH 7.45

Durchführung unter sterilen Bedingungen (Werkbank):

1. CPT™-Röhrchen wird nach der Blutentnahme 8-10-mal um 180° geschwenkt (invertieren, NICHT schütteln!)
2. Stehende Lagerung ausschließlich bei RT bis zur Weiterverarbeitung
3. Vor Beginn der Zentrifugation CPT™-Röhrchen nochmals 8-10-mal vorsichtig um 180° schwenken (invertieren, NICHT schütteln!)
4. Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Blutentnahme
 - Zentrifugation bei 1650 x g, 20 min, RT (Ausschwingrotor)

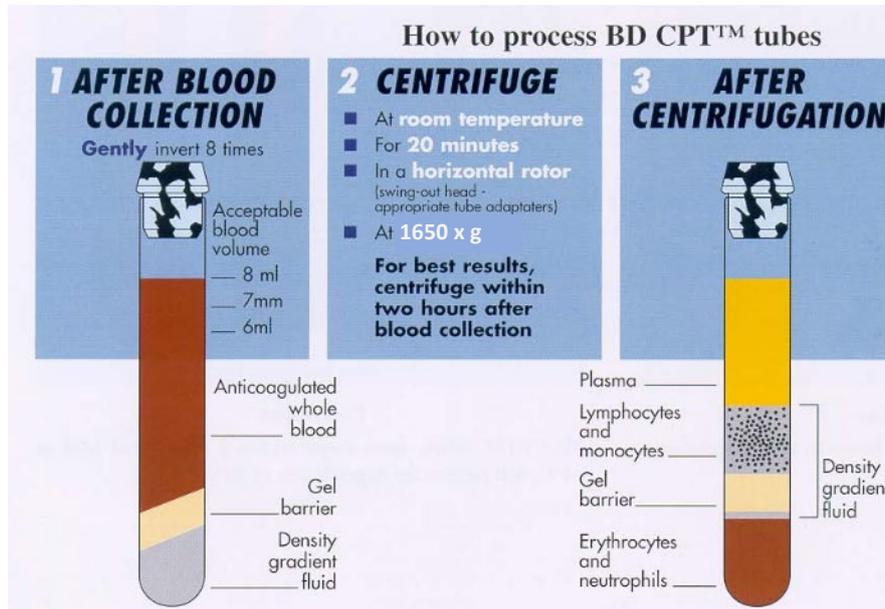


Abbildung 5: Arbeitsablauf CPT™-Röhrchen vor (1) und nach (3) Zentrifugation (Bildquelle: [23])

5. Abnehmen des Plasmas (Abbildung 5, (3) Plasma), z. B. mittels steriler Einweg-Pasteurpipette und überführen in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen
6. Röhrchen nach Befüllen fest verschließen und Plasma durch 2-3-maliges schwenken (nicht schütteln!) gut mischen (Homogenisierung des Überstandes entfällt bei automatisierter Aliquotierung).
7. Zeitnahe Aliquotierung in max. 16 x 0,3 ml-Aliquote in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
8. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
9. Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Blutentnahme
10. Abnehmen der Leukozytenschicht (Abbildung 5, (3) *Lymphocytes and monocytes*) und transferieren in ein neues 50 ml Zentrifugen-Röhrchen (die Gelbarriere des CPT™-Röhrchens bleibt intakt).
11. Auffüllen mit PBS auf 50 ml. Zellen durch 5-maliges Invertieren des Zentrifugen-Röhrchens mischen.
12. Zentrifugation bei 300 x g, 15 Minuten, RT



13. Überstand verwerfen
14. Resuspendieren des Pellets mit 10 ml PBS. Zellen durch 5-maliges Invertieren des Zentrifugen-Röhrchens mischen.
15. Zentrifugation bei 300 x g, 10 Minuten, RT
16. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Medium zur Zellzahlbestimmung
17. Bestimmung der Zellzahl (s. Seite 32; zum Vergleich: laut Hersteller beträgt die durchschnittliche Ausbeute bei gesunden Proband*innen $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml Blut)
18. Zentrifugation bei 300 x g, 10 Minuten, RT
19. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Einfriermedium auf eine Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml. Wichtig ist die Dokumentation der tatsächlichen Zellzahl auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS.
20. Aliquotieren in max. 4 x 0,5 ml mit einer Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml (= 5×10^6 Zellen pro Aliquot) in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen → **mindestens** 2 Aliquote mit angegebener Konzentration befüllen, ggf. Volumen pro Aliquot reduzieren (Minimalvolumen pro Aliquot: 250 µl)! Beträgt das Gesamtvolumen ≤ 500 µl nur **ein** 0,5 ml Cryoröhrchen befüllen. **Wichtig ist die Einhaltung der vorgegebenen Zellzahl/ml!**

Sollte die Gesamtausbeute unterhalb der geforderten Menge von 5×10^6 Zellen liegen, dann alle gewonnenen Zellen in 250 µl Einfriermedium aufnehmen und in **ein** 0,5 ml Cryoröhrchen überführen. Dokumentation des abweichenden Volumens und der entsprechenden Zellzahl auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS.
21. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
22. Schnellstmöglich mit dem Einfrierprozess beginnen. Langsames, kontrolliertes Einfrieren der Zellen durch die Verwendung von Einfrierhilfen, wie z. B. CoolCell® Cell Freezing Containers (Biocision) oder Mr. Frosty (Nalgene), Zwischenlagerung für max. 14 Tage bei -80°C möglich, **Langzeitlagerung in N₂ Gasphase**



6.3.2.5. RNA-Blut (PAXgene®)

- a. Sofort nach der Blutentnahme das PAXgene® Blood RNA-Röhrchen 8-10-mal leicht schwenken.
- b. Das PAXgene® Blood RNA-Röhrchen für mindestens 2 Stunden aufrecht bei RT stehen lassen.
- c. Das PAXgene® Blood RNA-Röhrchen aufrecht lagern.
- d. Röhrchen **niemals** in einem Styropor-Ständer einfrieren, da das zum Zerschneiden der Röhrchen führen kann; stattdessen: Pappständer/Kunststoffboxen verwenden
- e. Schnellstmögliche Einfrieren bei -20°C, **max. 4 h** nach Blutentnahme
- f. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS
- g. Nach mindestens 24 Stunden Lagerung des Röhrchens bei -20°C überführen auf -80°C für die Langzeitlagerung.
- h. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf den PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [A1: Handbuch CPT™](#)
- [A2: Handbuch Leucosep™](#)
- [A3: Herstelleranleitung SepMate™](#)
- [PBB 1B-9B „Blut“](#)
- [Flow Chart zur Blutentnahme: Vorbereitung](#)
- [Flow Chart zur Blutentnahme](#)
- [Flow Chart zur Blutverarbeitung Serum](#)
- [Flow Chart zur Blutverarbeitung Citrat-Plasma](#)
- [Flow Chart zur Blutverarbeitung EDTA-Plasma](#)



- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Heparin- oder EDTA-Blut zu Plasma und PBMCs](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von BD-CPT™ zu Plasma und PBMCs](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung RNA-Röhrchen PAXgene®](#)



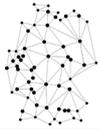
NAPKON-PÄD-SOP-02: Oropharyngealabstrich

Dokumentenategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	Keiner, da V1.0
Anlagen:	PBB 1S-5S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	49
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	49
3.	Geltungsbereich	49
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	49
5.	Zuständigkeiten.....	49
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	50
6.1.	Benötigte Materialien	50
6.2.	Benötigte Dokumente.....	50
6.3.	Arbeitsanleitung.....	50
6.3.1.	Vorbereitung.....	50
6.3.2.	Durchführung.....	51
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	52
8.	Anlagen	53



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu die Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

Tonsillen	Lymphatische Organe im Bereich von Mundhöhle und Rachen
DNA/RNA Shield™	Stabilisierungslösung für Nukleinsäuren (DNA und RNA) in biologischen Proben
PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur
ml	Milliliter
Sek.	Sekunden

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz/Pflegekraft
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistentz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistentz
Einlagerung	Technische Assistentz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistentz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Verbrauchsmaterial (Beispiele für geeignete Medien):

- 1 ml verschließbares Röhrchen (z. B. Greiner)
- 0,9%ige Kochsalzlösung
- Sterile Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer in Blistern ohne Medium (z. B. Kat. Nr. 502CS01, Hain Lifescience, www.hain-lifescience.de)
- 2D-codiertes 2,0 ml Cryoröhrchen
- DNA/RNA Shield™
- Einmalhandschuhe, Mundschutz (mind. FFP2), Laborkittel, Schutzbrille (ggf. Visier)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Oropharyngealabstrich

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

- Pro Patient*in bzw. Kontrolle ein 1 ml verschließbares Röhrchen mit 0,9%iger Kochsalzlösung befüllen und bei RT lagern (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit).
- Sterilen Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer in Blistern ohne Medium bereitlegen
- Pro Patient*in bzw. Kontrolle wird ein 2D-codiertes 2,0 ml Cryoröhrchen mit 0,4 ml DNA/RNA Shield™ gefüllt (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit)
- Von einer vorherigen Mundspülung vor der Probenahme ist abzusehen.



6.3.2. Durchführung

1. Einweghandschuhe, Kittel und Mundschutz anziehen. Den/die Studienteilnehmer*in auf dem Blutentnahmestuhl platzieren. Darauf achten, dass der Kopf bequem auf dem Kopfpolster ruht.
2. Ein mit 0,9%iger Kochsalzlösung vorgefülltes 1 ml Röhrchen öffnen.
3. Das mit 0,4 ml DNA/RNA Shield™ vorgefüllte 2D-codierte 2,0 ml-Cryoröhrchen wird aufgeschraubt.
4. Die Verpackung eines Abstrichtupfers wird am unteren Ende geöffnet und der Tupfer am Stielende festgehalten.
5. Tupferspitze (max. das vordere Drittel) ca. 3 Sek. lang in das Röhrchen mit Kochsalzlösung tauchen. Dann die Tupferspitze leicht am Röhrcheninnenrand ausdrücken, wobei darauf geachtet werden muss, dass der Tupfer dabei nirgends anstößt und kontaminiert wird.
6. Studienteilnehmer*in öffnet den Mund weit.
7. Mundhöhle mit einer Lampe beleuchten.
8. Nur wenn nötig: Zunge mit Holzspatel herunterdrücken.
9. Der/die Studienteilnehmer*in muss „aaaahhh“ sagen, damit die Zunge unten liegt und sich das Gaumensegel hebt. Manche Studienteilnehmer*innen können die Zunge willentlich nach hinten und unten ziehen.
10. Tupfer einführen, ohne dabei die Lippen, Mundschleimhaut oder Uvula zu berühren.
11. Tupfer unter leichtem gleichmäßigem Druck über die linke und rechte Tonsille streifen, dabei den Tupfer vorsichtig drehen (siehe Abbildung 6). Zudem sollte ein Abstrich von der Rachenhinterwand entnommen werden. Wahlweise kann der Abstrich auch vom Gaumensegel genommen werden. Beim Zurückziehen des Tupfers sollte die Berührung anderer Oberflächen wie der Wangenschleimhäute sowie die Speichelaufnahme vermieden werden.

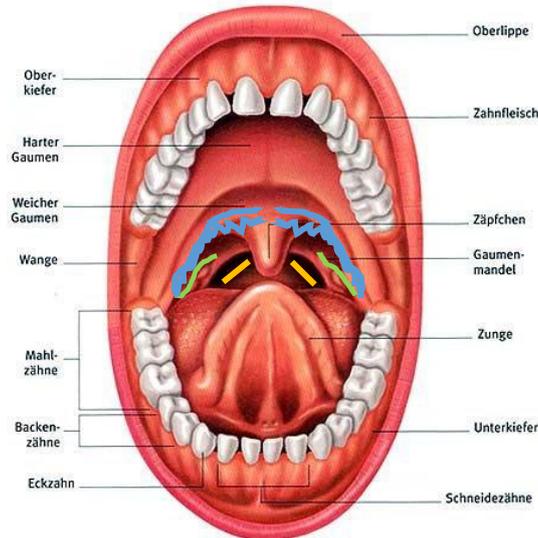


Abbildung 6: Vorgehen bei einem Oropharyngealabstrich (Bildquelle: [25])

12. Der Tupferstiel wird nun an der Sollbruchstelle (1 cm über der Tupferspitze) durch Knicken über den Röhrchenrand abgebrochen, sodass die Spitze in das mit DNA/RNA Shield™ vorgefüllte Cryoröhrchen fällt. Abstrichtupfer ohne Sollbruchstelle müssen mithilfe einer sterilen Schere bzw. eines Clippers auf eine Länge von ca. 3 cm (inkl. Watte) gekürzt und ins vorgefüllte Cryoröhrchen überführt werden. Cryoröhrchen fest verschließen.
13. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-ID und verknüpfen mit Primärproben-ID
14. Kurzfristige Lagerung bei 4°C im Kühlschrank möglich; dann schnellstmögliches Einfrieren bei -80°C, **max. 4 h** nach Entnahme des Abstriches.

7. Verhalten bei Abweichungen

Bei Würg - oder Brechreiz, Erbrechen oder Schmerzen:

Abbruch der Probenahme und Vermerk auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS. Mit Einverständnis des Studienteilnehmers bzw. der Studienteilnehmerin ist ein weiterer Versuch gestattet.



Verweigerung des Studienteilnehmers bzw. der Studienteilnehmerin:

Vermerk auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS

8. Anlagen

- [PBB 1S-5S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON Pädiatrie-Modul

Standardarbeitsanweisung

09.2021/V1.0

Nasopharyngealabstrich

NAPKON-PÄD-SOP-03: Nasopharyngealabstrich

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

Keiner, da V1.0

Anlagen:

PBB 1S-5S „Sonstige Bioproben“
Flow Chart zur Gewinnung eines Nasopharyngealabstrichs



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	56
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	56
3.	Geltungsbereich	56
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	56
5.	Zuständigkeiten.....	56
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	57
6.1.	Benötigte Materialien	57
6.2.	Benötigte Dokumente.....	57
6.3.	Arbeitsanleitung.....	57
6.3.1.	Vorbereitung.....	57
6.3.2.	Durchführung.....	58
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	59
8.	Anlagen	59



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Gewinnung und Aufarbeitung eines tiefen Nasopharyngealabstrichs unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

DNA/RNA Shield™	Stabilisierungslösung für Nukleinsäuren (DNA und RNA) in biologischen Proben
PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur
ml	Milliliter
Sek.	Sekunden

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz/Pflegekraft
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistentz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistentz
Einlagerung	Technische Assistentz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistentz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Verbrauchsmaterialien (Beispiele für geeignete Medien):

- 1 ml verschließbares Röhrchen (z. B. Greiner)
- 0,9%ige Kochsalzlösung
- Sterile Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer in Blistern ohne Medium (z. B. Kat. Nr. 502CS01, Hain Lifescience, www.hain-lifescience.de)
- 2D-codiertes 2,0 ml Cryoröhrchen
- DNA/RNA Shield™
- Einmalhandschuhe, Mundschutz (mind. FFP2), Laborkittel, Schutzbrille (ggf. Visier)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Nasopharyngealabstrich

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

- Pro Patient*in bzw. Kontrolle ein 1 ml verschließbares Röhrchen mit 0,9%iger Kochsalzlösung befüllen und bei RT lagern (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit).
- Sterilen Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer in Blistern ohne Medium bereitlegen
- Pro Patient*in bzw. Kontrolle wird ein 2D-codiertes 2,0 ml Cryoröhrchen mit 0,4 ml DNA/RNA Shield™ gefüllt (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit).
- **Sollte der/die Patient*in bzw. Kontrolle an einer Hämophilie leiden oder Blutverdünner (z. B. Aspirin, Marcumar, Marcuphen, etc.) einnehmen ist besondere Vorsicht beim Nasopharyngealabstrich geboten. Eine Verletzung der**



Nasenschleimhaut ist unbedingt zu vermeiden!

- Der/die Patient*in bzw. Kontrolle sollte während der Probenentnahme sitzen oder liegen.
- Die Probenentnahme ist in der Regel schmerzfrei, jedoch ist der tiefe Nasopharyngealabstrich sehr unangenehm und führt zu starkem Tränenfluss.
- Vom Naseputzen vor der Entnahme des Nasopharyngealabstrichs ist abzusehen, um Aerosolbildung zu vermeiden.

6.3.2. Durchführung

1. Einweghandschuhe, Kittel und Mundschutz anziehen.
2. Ein mit 0,9%iger Kochsalzlösung vorgefülltes 1 ml Röhrchen öffnen.
3. Das mit 0,4 ml DNA/RNA Shield™ vorgefüllte 2D-codierte 2,0 ml-Cryoröhrchen wird aufgeschraubt.
4. Die Verpackung eines Abstrichtupfers wird am unteren Ende geöffnet und der Tupfer am Stielende festgehalten.
5. Tupferspitze (max. das vordere Drittel) ca. 3 Sek. lang in das Röhrchen mit Kochsalzlösung tauchen. Dann die Tupferspitze leicht am Röhrcheninnenrand ausdrücken, wobei darauf geachtet werden muss, dass der Tupfer dabei nirgends anstößt und kontaminiert wird.
6. Das Probenmaterial wird von einem Nasenloch entnommen, indem der Tupfer tief in Richtung des Ohrläppchens eingeführt, in der Tiefe 2-3-mal rotiert und dann wieder zurückgezogen wird (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: Vorgehen bei einem tiefen Nasopharyngealabstrich (Bildquelle: [26])



7. Der Tupferstiel wird nun an der Sollbruchstelle (1 cm über der Tüpferspitze) durch Knicken über den Röhrchenrand abgebrochen, sodass die Spitze in das mit DNA/RNA Shield™ vorgefüllte Cryoröhrchen fällt. Abstrichtupfer ohne Sollbruchstelle müssen mithilfe einer sterilen Schere bzw. eines Clippers auf eine Länge von ca. 3 cm (inkl. Watte) gekürzt und ins vorgefüllte Cryoröhrchen überführt werden. Cryoröhrchen fest verschließen.
8. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-ID und verknüpfen mit Primärproben-ID
9. Kurzfristige Lagerung bei 4°C im Kühlschrank möglich; dann schnellstmögliches Einfrieren bei -80°C, **max. 4 h** nach Entnahme des Abstriches.

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

Verweigerung des Patienten bzw. der Patientin oder Kontrolle:

Vermerk auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS

8. Anlagen

- [PBB 1S-5S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Gewinnung eines Nasopharyngealabstrichs](#)



Standardarbeitsanweisung
09.2021/V1.0

Wangenabstrich

NAPKON-PÄD-SOP-04: Wangenabstrich

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

Keiner, da V1.0

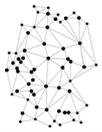
Anlagen:

PBB 1S-3S + 6S „Sonstige Bioproben“
Flow Chart zur Gewinnung eines Wangenabstrichs



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	62
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	62
3.	Geltungsbereich	62
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	62
5.	Zuständigkeiten.....	62
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	63
6.1.	Benötigte Materialien	63
6.2.	Benötigte Dokumente.....	63
6.3.	Arbeitsanleitung.....	63
6.3.1.	Vorbereitung.....	63
6.3.2.	Durchführung.....	63
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	64
8.	Anlagen	64



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Gewinnung eines Wangenabstrichs unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur
ml	Milliliter
min	Minuten
eSwab™	Universelles Abstrich- und Transportsystem bestehend aus einem Röhrchen mit 1 ml Amies-Medium und einem Nylon-Flockfaser-Abstrichtupfer

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz/Pflegekraft
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistenz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Verbrauchsmaterialien (Beispiele für geeignete Medien):

- eSwab™ (Bestellnr. 482CE, Hain Lifescience, www.hain-lifescience.de)
- Einmalhandschuhe, Mundschutz (mind. FFP2), Laborkittel, Schutzbrille (ggf. Visier)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Wangenabstrich

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

- Der/die Patient*in bzw. Kontrolle sollte während der Probenentnahme sitzen oder liegen.
- Die Probenentnahme ist in der Regel schmerzfrei.
- Direkt vor dem Wangenabstrich den Mund durchspülen lassen, danach auf Essen und Zähneputzen verzichten.
- Verpackung mit eSwab™ bereitlegen.

6.3.2. Durchführung

1. Einweghandschuhe, Kittel und Mundschutz anziehen.
2. Die Verpackung des eSwab™ öffnen und den Inhalt entnehmen.
3. Verpackung des Abstrichtupfers öffnen und den Abstrichtupfer am Stielende aus der Verpackung entnehmen.
4. Das Probenmaterial von der Wangenwand (Mundschleimhaut an der Innenseite der



Wange, siehe Abbildung 8) entnehmen, indem der Tupfer 2 min auf der Mundschleimhaut reibend-rollend bewegt wird. Dies hat mit solch einer Intensität zu erfolgen, das dabei Epithelzellen von der Mundschleimhaut gelöst werden.



Abbildung 8: Region der Wange zur Entnahme eines Wangenabstrichs (Bildquelle: [27])

5. Das mit Amies-Medium befüllte Röhrchen aufschrauben und den vorderen Teil des Abstrichtupfers einführen.
6. Den Tupferstiel an der farblich markierten Sollbruchstelle durch Knicken über den Röhrchenrand abbrechen, sodass die Spitze in das Röhrchen fällt. Das Röhrchen mit dem dazugehörigen Deckel verschließen.
7. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS
8. Kurzfristige Lagerung bei 4°C im Kühlschrank möglich; dann schnellstmögliches Einfrieren bei -80°C, **max. 4 h** nach Entnahme des Abstriches.

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

Verweigerung des Patienten bzw. der Patientin oder Kontrolle:

Vermerk auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS

8. Anlagen

- [PBB 1S-3S + 6S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Gewinnung eines Wangenabstrichs](#)



NAPKON-PÄD-SOP-05: Speichelgewinnung

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

Keiner

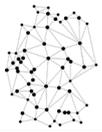
Anlagen:

PBB 1S-3S + 7S „Sonstige Bioproben“
Flow Chart zur Probenverarbeitung von Speichel



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	67
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	67
3.	Geltungsbereich	67
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	67
5.	Zuständigkeiten.....	67
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	68
6.1.	Benötigte Materialien	68
6.2.	Benötigte Dokumente.....	68
6.3.	Arbeitsanleitung.....	68
6.3.1.	Vorbereitung.....	68
6.3.2.	Durchführung.....	68
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	69
8.	Anlagen	69



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Gewinnung von Speichel unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

PBB	Probenbegleitbogen
Salivette®	Probenahmeröhrchen für Speichel
RT	Raumtemperatur
x g	Zentrifugationsgeschwindigkeit in g
min	Minuten
min.	mindestens
ml	Milliliter

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz/Pflegekraft/Sorgeberechtigte*r
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistenz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Verbrauchsmaterialien (Beispiele für geeignete Medien):

- Salivette® (Art.-Nr.: 51.1534, Sarstedt)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Speichel

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

Der/die Patient*in bzw. Kontrolle sollte ca. 30 Minuten vor der Speichelgewinnung auf Essen, Trinken, Rauchen, Zähneputzen sowie das Kauen von Kaugummi verzichten!

Die Speichelgewinnung soll im Sitzen erfolgen.

6.3.2. Durchführung

1. Patient*in bzw. Kontrolle (ggf. siehe Zuständigkeiten) entnimmt aus der Salivette® die Saugrolle. Die Salivette® erlaubt es die Watterolle aus dem Röhrchen so zu entnehmen, dass die Watte nicht mit der Hand angefasst werden muss. Hierzu muss der Stopfen durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen geöffnet werden. Achtung: Die Watterolle befindet sich in einem eigenen Einhängegefäß! Erst im Labor wird dieses Einhängegefäß von dem Röhrchen entfernt. Zur Speichelsammlung soll nur die Saugrolle benutzt werden.
2. Patient*in bzw. Kontrolle nimmt die Saugrolle der Salivette® ohne Zuhilfenahme der Finger in den Mund, legt diese unter die Zunge oder kaut leicht darauf herum, um den



Speichelfluss zu stimulieren.

3. Patient*in bzw. Kontrolle soll die Saugrolle so lange im Mund behalten bis diese komplett mit Speichel durchtränkt ist (min. 1 min).
4. Die speichelgetränkte Saugrolle in das Einhängegefäß der Salivette® zurückgeben (Wattebausch dabei nicht mit den Fingern berühren) und die Salivette® mit dem Stopfen wieder fest verschließen. Die Salivette® äußerlich desinfizieren.
5. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS
6. Schnellstmögliches Einfrieren der Salivette® bei -80°C, **max. 4 h** nach Speichelgewinnung

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [PBB 1S-3S + 7S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Speichel](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON Pädiatrie-Modul

Standardarbeitsanweisung

09.2021/V1.0

Trachealsekret (ENTA)

NAPKON-PÄD-SOP-06: Trachealsekret (ENTA)

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

Keiner

Anlagen:

PBB 1S-3S + 15S „Sonstige Bioproben“
Flow Chart zur Probenverarbeitung von Trachealsekret
(ENTA)



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	72
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	72
3.	Geltungsbereich	72
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	72
5.	Zuständigkeiten.....	72
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	73
6.1.	Benötigte Materialien	73
6.2.	Benötigte Dokumente.....	73
6.3.	Arbeitsanleitung.....	73
6.3.1.	Vorbereitung.....	73
6.3.2.	Weiterverarbeitung der Proben	74
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	74
8.	Anlagen	74



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Probenverarbeitung von Trachealsekret (ENTA) unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

ENTA	Endotracheale Absaugung
PBB	Probenbegleitbogen
DNA/RNA Shield™	Stabilisierungslösung für Nukleinsäuren (DNA und RNA) in biologischen Proben
RT	Raumtemperatur
ml	Milliliter

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Lokale SOPs zur Gewinnung von Trachealsekret

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz/Pflegekraft
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistentz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistentz
Einlagerung	Technische Assistentz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistentz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Verbrauchsmaterialien (Beispiele für geeignete Medien):

- 15 ml Zentrifugen-Röhrchen
- DNA/RNA Shield™
- 2D-codierte 2,0 ml Cryoröhrchen

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Trachealsekret (ENTA)

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

- Pro Patient*in bzw. Kontrolle wird ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen mit 6 ml DNA/RNA Shield™ gefüllt (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit).
- Gewinnung von 2 ml Trachealsekret in die vorbereiteten 15 ml Zentrifugen-Röhrchen gefüllt mit DNA/RNA Shield™
- Lagerung bis zur Weiterverarbeitung bei RT

Für die Weiterverarbeitung der Proben, wie im Kapitel 6.3.2 beschrieben, sind höhere Sicherheitsstandards einzuhalten. Sollten diese seitens der Biobank nicht gewährleistet werden können, sollte die Weiterverarbeitung der Proben in Zusammenarbeit mit einer geeigneten Fachabteilung (z. B. Virologie) erfolgen.



6.3.2. Weiterverarbeitung der Proben

1. Das mit Trachealsekret befüllte Zentrifugen-Röhrchen äußerlich desinfizieren (z. B. mit Incidin oder Isopropanol).
2. Die Probe durch Invertieren gut mischen.
3. Aliquotierung zu max. 3 x 1,6 ml in 2D-codierte 2,0 ml Cryoröhrchen
4. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
5. Schnellstmögliches Einfrieren bei -80°C, **max. 4 h** nach Trachealsekret-Gewinnung

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [PBB 1S-3S + 15S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Trachealsekret \(ENTA\)](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON Pädiatrie-Modul

Standardarbeitsanweisung

09.2021/V1.0

Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

NAPKON-PÄD-SOP-07: Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	Keiner, da V1.0
Anlagen:	PBB 2S-3S + 13S-14S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Probenverarbeitung von Bronchoalveolärer Lavage (BAL)



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	77
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	77
3.	Geltungsbereich	77
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	77
5.	Zuständigkeiten.....	77
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	78
6.1.	Benötigte Materialien	78
6.2.	Benötigte Dokumente.....	78
6.3.	Arbeitsanleitung.....	78
6.3.1.	Durchführung.....	78
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	80
8.	Anlagen	80



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Aufarbeitung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

PBB	Probenbegleitbogen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
RT	Raumtemperatur
x g	Zentrifugationsgeschwindigkeit in g
min	Minuten
ml	Milliliter

3. Geltungsbereich

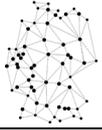
Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Lokale SOPs zur Durchführung einer Bronchoalveolären Lavage

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistentz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistentz
Einlagerung	Technische Assistentz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistentz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Verbrauchsmaterialien (Beispiele für geeignete Medien):

- 2D-codierte Cryoröhrchen (0,5 ml; 2,0 ml)
- Zentrifugen-Röhrchen (50 ml)
- Zählkammer (z. B. NanoEnTek - C-Chip Neubauer Improved Einweg-Zählkammer)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) 500 ml; (z. B. PAA Laboratories – Cat No. H15-002; 1x konzentriert / PAA Laboratories – Cat No. H15-011 10x konzentriert)
- Trypanblau-Lösung, 0,4 %: 100 ml; (z. B. Fa. Sigma, Irvine UK – Bestellnummer: T8154)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für BAL

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Durchführung

Für die Weiterverarbeitung der Proben sind höhere Sicherheitsstandards einzuhalten. Sollten diese seitens der Biobank nicht gewährleistet werden können, sollte die Weiterverarbeitung der Proben in Zusammenarbeit mit einer geeigneten Fachabteilung (z. B. Virologie) erfolgen.



Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

1. Qualität der unbearbeiteten BAL-Probe auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren
2. Aufarbeitung beginnt umgehend, **max. innerhalb von 2 h** (Vermeidung evtl. selektiver Zellverluste und verfälschtem Nachweis von Mediatoren im BAL-Überstand)
3. Im Ausnahmefall (Dokumentation!): Zwischenlagerung der BAL bis zur Verarbeitung (max. 120 min) bei 4-8°C möglich. Anmerkung: Je länger die Lagerung, desto größer die Gefahr der Kontamination (z. B. mit Bakterien) und von Zellverlusten.
4. BAL unter sterilen Bedingungen (Werkbank) in vorbeschriftete 50 ml Zentrifugen-Röhrchen aufteilen
5. Zentrifugation der BAL: 350 x g, 10 min, RT
6. BALF (BAL-Überstand) abnehmen und aliquotieren in max. 5 x 1,6 ml in 2,0 ml 2D-codierte Cryoröhrchen
7. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
8. Schnellstmögliches Einfrieren bei -80°C, **max. 4 h** nach BAL-Gewinnung
9. BALF-Restmaterial verwerfen
10. Pellets jeweils in 1 ml PBS resuspendieren, in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen vereinigen, Auffüllen mit 30-50 ml PBS, gut vortexen; falls Pellet zu blutig → Erythrozytenlyse

Erythrozytenlyse (optional)

- a) Hämolyse: Zellpellet in z. B. 3 ml H₂O (A. dest) resuspendieren und zur Hämolyse 45 sec. schwenken
- b) Beendigung der Hämolyse: Zugabe von gleichem Volumen (z. B. 3 ml) 2x PBS zu Pellet, resuspendieren
- c) + ad 30-50 ml mit 1x PBS auffüllen



11. Zentrifugation: 350 x g, 10 min, RT
12. Überstand verwerfen
13. Zellpellet resuspendieren in 1x PBS (die Menge an PBS richtet sich nach der Größe des Zellpellets, i. d. R. 1-3 ml)
14. Zellzahl bestimmen mit Trypanblau
15. Konzentration einstellen auf 2×10^6 Zellen/ml (in PBS) und aliquotieren in max. 6 x 0,3 ml (= $0,6 \times 10^6$ Zellen pro Aliquot) in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
16. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
17. Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^\circ\text{C}$, **max. 4 h** nach BAL-Gewinnung

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

„Klumpen“ im Zählnetz:

Mögliche Ursache: Zellpellet nicht homogen resuspendiert / Korrektur: homogen resuspendieren

Farbniederschläge in der Vitalfärbung

Mögliche Ursache: Trypanblau-Lösung zu alt / Korrektur: Färbelösung auswechseln

8. Anlagen

- [PBB 2S-3S + 13S-14S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Bronchoalveolärer Lavage \(BAL\)](#)



Standardarbeitsanweisung

09.2021/V1.0

Uringewinnung und -verarbeitung

NAPKON-PÄD-SOP-08: Uringewinnung und -verarbeitung

Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	Keiner, da V1.0
Anlagen:	A1: Anleitung zur Gewinnung von Mittelstrahlurin in der Toilette PBB 1S-4S + 8S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Urinverarbeitung



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	83
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	83
3.	Geltungsbereich	83
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	83
5.	Zuständigkeiten.....	83
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes.....	84
6.1.	Benötigte Materialien	84
6.2.	Benötigte Dokumente.....	84
6.3.	Arbeitsanleitung.....	85
6.3.1.	Uringewinnung.....	85
6.3.1.1.	Säuglinge und Kleinkinder im Windelalter	85
6.3.1.2.	Kleinkinder im Töpfchenalter	85
6.3.1.3.	Kinder, Jugendliche und erwachsen gewordene Patient*innen.....	85
6.3.1.4.	Katheter	85
6.3.2.	Weiterverarbeitung der Urinproben	86
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	87
8.	Anlagen	87



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Uringewinnung und die Weiterverarbeitung der Urinproben unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

Mittelstrahlurin	Eine Urinprobe, die nicht zu Beginn des Wasserlassens, sondern aus dem bereits laufenden Harnstrahl gewonnen wird.
PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur
x g	Zentrifugationsgeschwindigkeit in g
min	Minuten
ml	Milliliter

3. Geltungsbereich

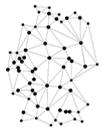
Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Patient*in bzw. Kontrolle oder Studienassistentz/Kinderpflegekraft/Ärztliches Personal (altersabhängig)
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistenz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Probenart	Volumen	Verwendung für	Verarbeitung
Urin	10 ml	z. B. <i>Metabolomics</i>	Zentrifugation; Getrennte Aufbewahrung von Überstand und Sediment

z. B.

- ggf. 1 Urin-Auffangbeutel mit Ablauf für Frühgeborene und Säuglinge; z. B. Bestellnr. 227571, Braun
- 1 Urin-Monovette, Sarstedt, Artikel-Nr.: 10.252
- 1 Urinbecher 100 ml, PP, mit Schraubdeckel, Sarstedt, Artikel-Nr. 75.562.105
- 1 Zentrifugen-Röhrchen, steril mit 15 ml Volumen, konischem Boden, 17 mm x 120 mm groß, aus PP, mit Schraubverschluss aus HDPE, graduiert; z. B. Kat. Nr. 188271, Greiner Bio-One
- 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
- 1 Einmaltransferpipette, steril (6 ml); z. B. Artikel-Nr. 86.1175.001, Sarstedt
- 1 Paar Einmalhandschuhe, latexfrei, unsteril (für Umgang mit Urin)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Urin-Monovette
- [Anlage 1: Anleitung zur Gewinnung von Mittelstrahlurin in der Toilette](#)

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID



6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Uringewinnung

6.3.1.1. Säuglinge und Kleinkinder im Windelalter

1. Gründliche Reinigung des Genitalbereiches mit Wasser
2. Sachgerechtes Anlegen eines Urinbeutels
3. Auffangen von ca. 10 - 50 ml Urin in den Urinbeutel
4. Transfer von 1 x 10 ml Urin in eine etikettierte Urin-Monovette durch Aufziehen gemäß Anleitung des Herstellers

➔ Lagerung des Urins bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung

6.3.1.2. Kleinkinder im Töpfchenalter

1. Auffangen von Urin im Töpfchen
2. Sofortige Übergabe des Töpfchens an das zuständige Personal
3. Transfer von 1 x 10 ml Urin in eine etikettierte Urin-Monovette durch Aufziehen gemäß Anleitung des Herstellers

➔ Lagerung des Urins bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung

6.3.1.3. Kinder, Jugendliche und erwachsen gewordene Patient*innen

1. Auffangen von Mittelstrahlurin in eindeutig beschriftetem Auffangbehälter (Urinbecher) durch den Patienten bzw. die Patientin oder Kontrolle selbst ➔ bitte beiliegende Anweisung (Anlage 1) mitgeben oder mündlich das Vorgehen erläutern
2. Sofortige Übergabe des Auffangbehälters an das zuständige Personal
3. Transfer von 1 x 10 ml Urin in eine etikettierte Urin-Monovette durch Aufziehen gemäß Anleitung des Herstellers

➔ Lagerung des Urins bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung

6.3.1.4. Katheter

Sollte der/die Patient*in einen Katheter tragen, erfolgt die Uringewinnung direkt aus dem



Katheter (Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS):

1. Entleeren des Urinbeutels
2. Abwarten bis sich der Urinbeutel mit ca. 10 - 50 ml frischem Urin gefüllt hat
3. Desinfektion der zur Punktion vorgesehenen Latexmembran an der Urinableitungsstelle
4. Entnahme des Urins
5. Transfer von 1 x 10 ml Urin in eine etikettierte Urin-Monovette durch Aufziehen gemäß Anleitung des Herstellers

➔ **Lagerung des Urins bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung**

6.3.2. Weiterverarbeitung der Urinproben

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

- a) Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Uringewinnung
 - Zentrifugation: 2000 x g, 15 min, RT

Es gilt: Je schneller die Verarbeitung nach der Entnahme erfolgen kann, desto besser!

- b) Nach Zentrifugation manueller Transfer von 1 x 9 ml Überstand in ein neues 15 ml Zentrifugen-Röhrchen (markiert als „Überstand“) durch z. B. eine einzige, sterile Einmaltransferpipette. Lagerung bei 4°C bis zur Aliquotierung.
- c) Aliquotieren des Überstandes in max. 10 x 0,5 ml-Portionen in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
- d) Restlichen Überstand bis auf ca. 0,5 cm oberhalb des Sediments abpipettieren, ohne das Sediment zu berühren oder aufzuwirbeln (z. B. mittels Transferpipette) und verwerfen
- e) Das Sediment mit dem verbleibenden Überstand homogenisieren (durch auf- und abpipettieren)
- f) Transferieren des Sediments: 1 x 0,5 ml in ein 2D-codiertes 0,5 ml Cryoröhrchen



- g) Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
- h) Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Uringewinnung

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [A1: Anleitung zur Gewinnung von Mittelstrahlurin in der Toilette](#)
- [PBB 1S-4S + 8S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Urinverarbeitung](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON Pädiatrie-Modul

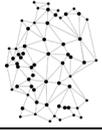
Standardarbeitsanweisung

09.2021/V1.0

Stuhlgewinnung

NAPKON-PÄD-SOP-09: Stuhlgewinnung

Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	Keiner, da V1.0
Anlagen:	A1: Anleitung zur Gewinnung einer Stuhlprobe in der Toilette A2: Gebrauchsanweisung Stool Collection Tube with DNA Stabilizer PBB 2S-4S + 10S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Probenverarbeitung von Stuhl



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	90
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	90
3.	Geltungsbereich	90
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	90
5.	Zuständigkeiten.....	90
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	90
6.1.	Benötigte Materialien	90
6.2.	Benötigte Dokumente.....	91
6.3.	Arbeitsanleitung.....	91
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	92
8.	Anlagen	92



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu die Gewinnung von Stuhlproben unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Patient*in bzw. Kontrolle oder Studienassistentz/Pflegekraft/Sorgeberechtigte*r (altersabhängig)
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistenz

6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Probenart	Volumen	Verwendung für	Verarbeitung
Stuhl	1 Röhrchen	Genetische, molekularbiologische Untersuchungen	keine



- Süsse Stuhlfänger MED AUXIL 150x470mm (Süsse, #S1000)
- Süsse Post Box Slim (185x125x25mm (Süsse, #H11227)), inklusive Schutzbeutel
- Invitek Molecular Stuhlsammelgefäß mit DNA-Stabilisator #1038111200 oder #1038111300
- Einmalhandschuhe
- Rotilabo® Cryo-Boxen aus Karton (Roth®, #Y897.2)
- Rotilabo® Stegeinsätze aus Karton (Roth®, #Y040.2)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Stuhlröhrchen
- [Anlage 1: Anleitung zur Gewinnung einer Stuhlprobe in der Toilette](#)

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

Die Entnahmemethode variiert je nach Alter von Patient*in bzw. Kontrolle:

- Säuglinge und Kleinkinder im Windelalter: Entnahme aus der Windel
- Kleinkinder im Töpfchenalter: Entnahme aus dem Töpfchen
- Kinder, Jugendliche und erwachsen gewordene Patient*innen: Entnahme vom Stuhlfänger über der Toilette

Das detaillierte Vorgehen ist der Anlage 1 „Anleitung zur Gewinnung einer Stuhlprobe in der Toilette“ zu entnehmen. **Die maximale Probenmenge pro Stuhlsammelgefäß sollte 4 Gramm frischen Stuhl (entspricht 1-2 gefüllten Stuhllöffeln) nicht überschreiten!** Die Stuhlproben werden nach Eintreffen in der lagernden Institution bei -80°C eingefroren und auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert. Bis zum Einlagern können die Proben bei RT aufbewahrt werden.



Falls der/die Patient*in bzw. Kontrolle nicht stationär behandelt wird, erhält er/sie die notwendigen Utensilien ausgehändigt oder per Post zugeschickt:

- 2 Stuhlfänger (einen davon als Ersatz)
- 1 Invitek Molecular Stuhlsammelgefäß mit integriertem Stuhllöffel und DNA-Stabilisator
- 1 Paar Einmalhandschuhe
- Anlage 1: Anleitung zur Gewinnung einer Stuhlprobe in der Toilette
- ggf. 1 Post Box inklusive Schutzbeutel

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [A1: Anleitung zur Gewinnung einer Stuhlprobe in der Toilette](#)
- [A2: Gebrauchsanweisung Stool Collection Tube with DNA Stabilizer](#)
- [PBB 2S-4S + 10S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Stuhl](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON Pädiatrie-Modul

Standardarbeitsanweisung

08.2022/V2.0

Liquorgewinnung und -verarbeitung

NAPKON-PÄD-SOP-10: Liquorgewinnung und -verarbeitung

Dokumentenategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	S. 96: Liquorgewinnung: Ergänzung „oder ab 18 Jahre nach separater Aufklärung für wissenschaftliche Untersuchungen“. S. 97, Flow Charts S.18: Erniedrigung der Zentrifugationsparameter auf 145xg und 15 min, Reduktion der Aliquotanzahl des Liquor-Überstandes auf max. 10 Aliquote, Erhöhung Aliquotgröße der Liquorzellen auf 0,5 ml
Anlagen:	PBB 2S-4S + 11S-12S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Probenverarbeitung von Liquor



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	95
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	95
3.	Geltungsbereich	95
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	95
5.	Zuständigkeiten.....	95
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	96
6.1.	Benötigte Materialien	96
6.2.	Benötigte Dokumente.....	96
6.3.	Arbeitsanleitung.....	96
6.3.1.	Liquorgewinnung	96
6.3.2.	Liquorverarbeitung	97
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	98
8.	Anlagen	98



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu die Verarbeitung von Liquorproben unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur
min	Minuten
ml	Milliliter

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Lokale SOPs zur Durchführung einer Lumbalpunktion

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistenz/Technische Assistenz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Probenart	Volumen	Verwendung für	Verarbeitung
Liquor	max. 5 ml	Zellen und Biomarker	Zentrifugation; Getrennte Aufbewahrung von Überstand und Sediment

Reagenzien (Beispiele für geeignete Medien):

- Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS, frisch hergestellt, bis Benutzung bei 4°C lagern (alternativ Verwendung geeigneter kommerzieller Einfriermedien möglich (z. B. CryoStor® CS10, Sigma-Aldrich, cat. no. C2874; Recovery™ Cell Culture Freezing Medium, Thermo Fisher Scientific, cat. no. 12648010))
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, cat. no. D4540)
- Fetales Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, cat. no. F7524)

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Liquorröhrchen

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Liquorgewinnung

Abnahme nur bei Patient*innen und Kontrollen ab 4 und bis 17 Jahren im Rahmen medizinisch indizierter Lumbalpunktion oder ab 18 Jahre nach separater Aufklärung für wissenschaftliche Untersuchungen. Die Gewinnung von Liquor findet entsprechend der klinikinternen Handlungsempfehlungen statt.

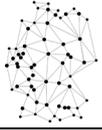


6.3.2. Liquorverarbeitung

Das Protokoll zur Liquorverarbeitung wird ggf. nochmals angepasst, um ein harmonisiertes Vorgehen mit der Liquorverarbeitung im Rahmen der NAPKON-Studie (Patient*innen bzw. Kontrollen ab 18 Jahre) zu gewährleisten.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

- a) Nach der Gewinnung von Liquor Übergabe des verschlossenen, etikettierten Entnahmegefäßes an das weiterverarbeitende Personal.
- b) Qualität der unbearbeiteten Liquor-Probe auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentieren
- c) Beginn der Zentrifugation **max. 2 h** nach Liquorgewinnung
 - Zentrifugation: 145x g, 15 min, RT
- d) Dekantieren des zellfreien Liquorüberstandes und Aliquotieren in max. 10 x 0,5 ml-Portionen in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen
- e) Dokumentation auf dem PBB bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
- f) Schnellstmögliches Einfrieren bei $\leq -80^{\circ}\text{C}$, **max. 4 h** nach Liquorgewinnung
- g) Die Liquorzellen (= Sediment nach Zentrifugation) so in Einfriermedium resuspendieren, das eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml erzielt wird. Wichtig ist die Dokumentation der tatsächlichen Zellzahl auf dem PBB bzw. LIMS.
- h) Aliquotieren in max. 4 x 0,5 ml mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml (= 5×10^4 Zellen pro Aliquot) in 2D-codierte 0,5 ml Cryoröhrchen. Sollte die Gesamtausbeute unterhalb der geforderten Menge von 3×10^4 Zellen liegen, dann alle gewonnenen Zellen in 100 μl Einfriermedium aufnehmen. Dokumentation des abweichenden Volumens und der entsprechenden Zellzahl auf dem PBB bzw. LIMS.
- i) Dokumentation auf dem PBB bzw. LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
- j) Schnellstmöglich mit dem Einfrierprozess beginnen, **max. 4 h** nach Liquorgewinnung.



Langsames, kontrolliertes Einfrieren der Zellen durch die Verwendung von Einfrierhilfen, wie z. B. *CoolCell® Cell Freezing Containers* (Biocision) oder *Mr. Frosty* (Nalgene), Zwischenlagerung für max. 14 Tage bei -80°C möglich, **Langzeitlagerung in N₂-Gasphase**

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [PBB 2S-4S + 11S-12S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Liquor](#)



NAPKON-PÄD-SOP-11: Haargewinnung

Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	Keiner, da V1.0
Anlagen:	PBB 1S-3S + 9S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Probenverarbeitung von Haaren



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	101
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	101
3.	Geltungsbereich	101
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	101
5.	Zuständigkeiten.....	101
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	102
6.1.	Benötigte Materialien	102
6.2.	Benötigte Dokumente.....	102
6.3.	Arbeitsanleitung.....	102
6.3.1.	Haargewinnung.....	102
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	103
8.	Anlagen	103



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu die Gewinnung von Haarproben unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON Pädiatrie-Moduls zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur
cm	Zentimeter
min.	mindestens

3. Geltungsbereich

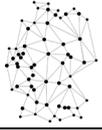
Für die Anwendung in allen am NAPKON Pädiatrie-Modul teilnehmenden Studienzentren; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Ärztliches Personal/Studienassistentz/Pflegekraft
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistentz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistentz
Einlagerung	Technische Assistentz
Dokumentation	Med. Dokumentar*in/Studienassistentz/Technische Assistentz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Probenart	Volumen	Verwendung für	Verarbeitung
Haare	Haare mit einer Gesamtlänge von min. 6 cm	Biomarkeranalysen	keine

Utensilien (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit):

- Aluminiumfolie
- Schere
- Haarklemme
- Kamm
- Bindfaden
- 15 ml Zentrifugen-Röhrchen

6.2. Benötigte Dokumente

- Etikett mit Proben-ID für Haare

Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Proben-ID

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Haargewinnung

1. Teilen Sie das Haar am Hinterkopf mit der Haarklemme ab.
2. Trennen Sie 2-3 Haarsträhnen (Gesamtdurchmesser ähnlich einem halben Bleistift) ca. 2 cm unterhalb des Schädelknochens ab und kämmen Sie die Strähnen.
3. Fädeln Sie die gekämmten Strähnen jeweils durch die Schlaufe eines Bindfadens und



- ziehen Sie die Schlaufe fest.
4. Schneiden Sie die Haarsträhnen so nah wie möglich an der Kopfhaut mit der Schere ab.
 5. Legen Sie die Strähnen auf ein Stück Aluminiumfolie mit einer minimalen Höhe von 10 cm. Markieren Sie das kopfhautnahe Ende der Strähnen mit einem Permanentmarker auf der Alufolie.
 6. Wenn die Haarprobe länger als die Höhe der Aluminiumfolie ist, können die Haarsträhnen vom distalen Ende her abgeschnitten werden.
 7. Wickeln Sie die Haarsträhnen in der Aluminiumfolie röhrenförmig ein, sodass diese vor Licht geschützt sind. **Falten Sie die Probe selbst dabei nicht!**
 8. Überführen Sie die Aluminiumfolieröhre in ein mit der dazugehörigen Proben-ID etikettiertes 15 ml Zentrifugen-Röhrchen und verschließen Sie dieses mit dem Deckel.
 9. Dokumentation auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS
 10. Lagern Sie die Probe im 15 ml Zentrifugen-Röhrchen an einem trockenen und dunklen Ort bei RT.

Besonderheit bei Säuglingen, Kleinkindern und Personen mit Kurzhaarfrisur:

- Die Gesamtlänge aller Haarsträhnen soll mindestens 6 cm betragen. Um diese zu erreichen ggf. mehr Haarsträhnen abschneiden.

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen auf dem PBB und Microsoft Excel bzw. LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [PBB 1S-3S + 9S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Haaren](#)

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Alle nachfolgend aufgeführten Internetquellen wurden abgerufen am 13.04.2022.

- [1] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/kapillarblut/gefaesse/produkt/20.1280/>
- [2] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/04.1934/>
- [3] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/04.1922/>
- [4] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/kapillarblut/gefaesse/produkt/20.1278/>
- [5] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/04.1931/>
- [6] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/02.1065/>
- [7] <https://www.bdbiosciences.com/eu/applications/blood-collection/cell-biomarker-preservation/bd-vacutainerreg-cpttrade-mononuclear-cell-preparation-tube---sodium-heparin/p/362780>
- [8] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/kanuelen-adapter/produkt/14.1207/>
- [9] https://www.tigermedical.com/Products/Vacutainer-Single-Use-Non-Stackable-Holder__BD364815-.aspx
- [10] <https://shop.intermed.de/Injektion-Infusion-Entnahme/Blutentnahme/BD-Kabe-Systeme/BD-Kabe-Lanzetten-Zubehoer/BD-Vacutainer-Luer-Adapter-mit-Ventil-blau-1x100-Stueck.html>
- [11] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/kanuelen-adapter/produkt/14.1112/>
- [12] <https://www.bdbiosciences.com/eu/applications/blood-collection/cell-biomarker-preservation/paxgenereg-blood-rna-tube/p/762165>
- [13] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/urin/urin-monovetter/produkt/10.252/>
- [14] <https://www.bbraun.de/content/dam/catalog/bbraun/bbraunProductCatalog/S/AEM2015/de-de/b9/urinocol-urinbeutelmitablauf.jpeg>
- [15] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/urin/becher/produkt/75.562.105/>
- [16] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/salivasputum/produkt/51.1534/>

- [17] <https://www.hain-lifescience.de/produkte/abstrich--und-transportssysteme/nylon-flockfaser-abstrichtupfer.html>
- [18] <https://www.hain-lifescience.de/produkte/abstrich--und-transportssysteme/eswab.html>
- [19] <https://www.invitek-molecular.com/products/microbiome.html>
- [20] <https://www.woerner-medizinprodukte.de/48502/suesse-stuhlfaenger-med-auxil?msclkid=af79d1e6baff11ec988b86d81d840f70>
- [21] SOP hair sampling and shipment, Dresden LabService GmbH
- [22] NaKo-Biomaterialhandbuch
- [23] Handbuch Biomaterialsammlung des DZIF Transplantations(Tx)-Kohorte e.V., Version 1.5 vom 16.05.2018; Abbildungen modifiziert
- [24] Handbuch Leucosep™ (s. NAPKON-SOP-01_Anlage 2)
- [25] SOP S4_BIOPROBEN I, Version 01 vom 08.11.2017, KORA Fit-Studie, Forschungsplattform Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA)
- [26] Arbeitsanweisung DZL – AA – 0000 – Nasopharyngealabstrich, 04/2020, rev. 1.0, BioMaterialBank Nord, Forschungszentrum Borstel
- [27] SOP Swabs: Collection, processing and storage, Version 1 vom 22.10.2013, COMBACTE-Studie

8. ANLAGEN

- [Übersicht Visiten im NAPKON Pädiatrie-Modul](#)
- [NAPKON-PÄD-SOP-01 Anlage 1](#): Handbuch CPT™
- [NAPKON-PÄD-SOP-01 Anlage 2](#): Handbuch Leucosep™
- [NAPKON-PÄD-SOP-01 Anlage 3](#): Herstelleranleitung SepMate™
- [NAPKON-PÄD-SOP-08 Anlage 1](#): Anleitung zur Gewinnung von Mittelstrahlurin in der Toilette
- [NAPKON-PÄD-SOP-09 Anlage 1](#): Anleitung zur Gewinnung einer Stuhlprobe in der Toilette
- [NAPKON-PÄD-SOP-09 Anlage 2](#): Gebrauchsanweisung Stool Collection Tube with DNA Stabilizer
- [NAPKON Pädiatrie-Modul Probenbegleitbogen Blut V1.0 09/2021](#)
- [NAPKON Pädiatrie-Modul Probenbegleitbogen Sonstige Bioproben V1.0 09/2021](#)
- [NAPKON Pädiatrie-Modul Flow Charts V1.0](#)

Übersicht Visiten im NAPKON Pädiatrie-Modul

Visite	Baseline	Studienvisite (akute Phase)	Abschluss des Akutverlaufs ³	Follow-up Visiten
Zeitpunkt	Tag 0-3	Stationär: Wöchentlich (+/- 2 Tage) bis Entlassung ^{2,3}	Tag der Entlassung ³	3 & 12 Monate (+/- 2 Wochen) nach Erstdiagnose
Standardpanel Bioproben ¹	X	X	X	X
Liquorentnahme ^{1,4}	(X)	(X)	(X)	(X)
PBMC Gewinnung ¹	X	X	X	X

¹ Die Bioprobensammlung erfolgt bei pädiatrischen Patient*innen und Kontrollen optional unter Berücksichtigung altersspezifischer Besonderheiten. Die Bioprobenverarbeitung erfolgt entsprechend des SOP-Manuals für das NAPKON Pädiatrie-Modul.

² Zusätzliche Visite bei Auftreten von infektionsassoziierten Komplikationen oder klinischer Verschlechterung.

³ Der Abschluss des Akutverlaufs entspricht bei Patient*innen mit einem stationären Aufenthalt von min. 5 Tagen der Entlassung. Bei einem stationären Aufenthalt < 5 Tagen ist zu prüfen, ob diese Visite als Hausbesuch oder Einbestellung realisierbar ist.

⁴ Abnahme nur bei Patient*innen und Kontrollen ab 4 und bis 17 Jahren im Rahmen medizinisch indizierter Lumbalpunktion.

REF 362753



Cell Preparation Tube with Sodium Heparin^N

For the Separation of Mononuclear Cells from Whole Blood

Sterile Interior
8 mL Draw Capacity
(16 x 125mm Tube Size)

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

The BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Heparin^N is an evacuated Tube intended for the collection of whole blood and the separation of mononuclear cells. The cell separation medium is comprised of a polyester gel and a density gradient liquid. This configuration permits cell separation during a single centrifugation step. The separated sample can be transported without being removed from the BD Vacutainer® CPT™ Tube since the gel forms a stable barrier between the cell layers.

SUMMARY AND EXPLANATION

Isolation of mononuclear cells from whole blood is a first step for many *in vitro* assays. One currently accepted technique for mononuclear cell separation, referred to as the FICOLL™ Hypaque™ method, employs a liquid density gradient medium of FICOLL™ 400 and sodium metrizoate or sodium diatrizoate solution (1,2,3). The procedure uses anticoagulated blood, collected by routine phlebotomy, which is diluted with a buffered solution, and then carefully layered onto the medium. This preparation is then centrifuged to isolate the mononuclear cells above the medium. The cells are harvested by carefully pipetting them from the liquid interface. The BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Heparin^N combines a blood collection tube containing a sodium heparin anticoagulant with a FICOLL™ Hypaque™ density fluid and a polyester gel barrier which separates the two liquids. The result is a convenient, single tube system for the collection of whole blood and the separation of mononuclear cells. The BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Heparin^N reduces the risk of sample contamination and eliminates the need for additional tubes, pipettes, and reagents. Samples can be transported without removing them from the tube.

Note: Devices labeled with a superscript letter 'N' indicate that the device contains heparin which has been certified to meet the requirements of USP Heparin Monograph October 1, 2009.

TEST PRINCIPLES

This product is an evacuated tube system containing sodium heparin anticoagulant and blood separation media composed of a thixotropic gel and a FICOLL™ Hypaque™ solution.

The tube's internal vacuum allows blood to be drawn in during venipuncture. Sodium heparin provides anticoagulation. The blood separation media takes advantage of the lower density of mononuclear cells and of platelets to isolate them from whole blood. The isolation occurs during centrifugation when the gel portion of the media moves to form a barrier under the mononuclear cells and platelets; this separates them from the denser blood components below. Later, additional washing and centrifugation steps reduce the quantity of platelets present, resulting in a suspension of concentrated mononuclear cells.

REAGENTS, SUPPLIES AND EQUIPMENT

Reagents Provided:

BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tubes with Sodium Heparin^N.

REF 362753

8 mL Draw Capacity (16 x 125mm Tube Size)

Sterile Tube Interior

Contains:

- Minimum of 132 USP Units of Sodium Heparin in 1.0 mL of Phosphate Buffered Saline Solution (Top Fluid Layer)
- 3.0 gm of Polyester Gel (Middle Layer)
- 2.0 mL of Polysaccharide Sodium Diatrizoate Solution (FICOLL™ Hypaque™ solution, Bottom Fluid Layer)
- Silicone Coated Glass Tube
- Silicone Lubricated Rubber Stopper

Reagents Not Provided:

Reagent

- Phosphate Buffered Saline (PBS) without Ca++ or Mg++.

Supplies and Equipment Not Provided:

Specimen Collection

- BD Vacutainer® Holder and BD Vacutainer® Needle or BD Vacutainer® Blood Collection Set.
- Alcohol Swab.
- Dry Sterile Gauze.

- Tourniquet.
- Adhesive Bandage.
- Gloves appropriate for the protection of the person collecting specimen.
- Sharps disposal system.

Specimen Processing

- 15 mL Size Plastic Conical Centrifuge Tubes with Caps.
- Pasteur Pipettes.
- Centrifuge with Swinging Bucket Rotor and Tube Carriers/Adapters for 16 x 125mm Tube Size.

NOTE: Centrifuge must be capable of generating at least 1500 RCF at the tube bottom.

- Gloves appropriate for the protection of the person processing specimen.

WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

1. Do not re-use BD Vacutainer® CPT™ Tubes.
2. Do not use tubes after expiration date printed on the tube label.
3. Do not use tubes if the clear liquid solutions above and/or below the gel layer become discolored or form precipitates.
4. Do not use tubes for collection of materials to be injected into patients.
5. Since this BD Vacutainer® CPT™ Tube contains chemical additives, precautions should be taken to prevent possible backflow from the tube during blood drawing (see Prevention of Backflow section).
6. Excessive centrifugation speed (over 2000 RCF) may cause tube breakage, exposure to blood, and possible injury.
7. **Remove and reinsert stopper by either gently rocking the stopper from side to side or by grasping with a simultaneous twisting and pulling action. A "thumb roll" procedure for stopper removal is not recommended, as tube breakage and injury may result.**
8. Endotoxin not controlled. Blood and blood components collected and processed in the tube are not intended for infusion or introduction into the human body.
9. **CAUTION:**
 - All glass has the potential for breakage, therefore, precautionary measures should be taken during handling.
 - Handle all biologic samples and blood collection "sharps" (lancets, needles, and blood collection sets) in accordance with the policies and procedures of your facility.
 - Obtain appropriate medical attention in the event of any exposure to biologic samples (for

example, through a puncture injury) since the samples may transmit HBV (hepatitis), HIV (AIDS), or other infectious diseases.

- Utilize any built-in used needle protector, if the blood collection device provides one. Becton Dickinson does not recommend reshielding used needles, but the policies and procedures of your facility may differ and should always be followed.
- Discard all blood collection "sharps" in biohazard containers approved for their disposal.
- Filling the tubes from a hypodermic syringe while the stopper is in place is not recommended. Forcefully depressing the syringe plunger without removing the stopper can create positive pressure in the tube causing the stopper and specimen to fly out with explosive force.

10. Centrifugation:

CAUTION: If tubes with cracks or chips are used or if excessive speed is used in centrifugation, a tube may break causing the release of sample, droplets, and possibly an aerosol into the centrifuge bowl. The release of these potentially hazardous materials can be mitigated by using specially designed sealed containers in which tubes are held during centrifugation. The use of special containment vessels is not recommended for routine purposes.

Centrifuge carriers and inserts should be of the size specific to the tubes used. Use of carriers too large or too small for the tube may result in breakage. Care should be taken to ensure that tubes are properly seated in the centrifuge cup. Improperly seated tubes may catch on centrifuge head resulting in breakage. Tubes must be balanced in the centrifuge head to minimize the possibility of glass breakage. Always allow centrifuge to come to a complete stop before attempting to remove tubes. When centrifuge head has stopped, open lid and examine for possible broken tubes. If breakage is indicated, use mechanical device such as forceps or hemostat to remove tubes.
Caution: Do not remove broken tubes by hand.

STORAGE

Store BD Vacutainer® CPT™ Tubes upright at room temperature (18-25° C). Protect tubes from direct light. Shelf life at 18-25°C is one year from the date of manufacture.

VENIPUNCTURE TECHNIQUE AND SAMPLE COLLECTION Prevention of Backflow

Since this BD Vacutainer® CPT™ Tube contains chemical additives, it is important to prevent possible backflow from the tube with its attendant possibility of adverse reactions to the patient. To guard against backflow, the following precautions should be taken when drawing blood into the tube:

NAPKON-PÄD-SOP-01_Anlage 1: Handbuch CPT™

1. Keep patient's arm in the downward position during the collection procedure.
2. Hold the tube with the stopper uppermost.
3. Release the tourniquet as soon as the blood starts to flow into the tube, or within 2 minutes of application.
4. Make sure the tube contents do not touch the stopper or the end of the needle during the collection procedure.

Correct Position of Patient's Arm and Tube Assembly to Reduce the Possibility of Backflow

Tourniquet is released as soon as blood starts to flow.

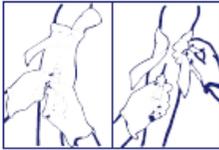


Figure 1

General Instructions

NOTE: Gloves should be worn for venipuncture procedure.

1. Select the tubes appropriate for samples desired.
2. Open needle package but do not remove needle shield. Thread needle onto holder.
3. Insert tube into holder. LEAVE IN THIS POSITION.
4. Select site for venipuncture.
5. Apply tourniquet. Prepare venipuncture site with an appropriate antiseptic. DO NOT PALPATE VENIPUNCTURE AREA AFTER CLEANSING. Allow site to dry.
6. Remove needle shield. Perform venipuncture WITH PATIENT'S ARM IN A DOWNWARD POSITION AND TUBE STOPPER UPPERMOST (see Figure 1). This reduces the risk of backflow of any anticoagulant into the patient's circulation.
7. Push tube onto needle, puncturing diaphragm of stopper.
8. REMOVE TOURNIQUET AS SOON AS BLOOD APPEARS IN TUBE, within 2 minutes of venipuncture. DO NOT ALLOW CONTENTS OF TUBE TO CONTACT THE STOPPER OR THE END OF THE NEEDLE DURING THE PROCEDURE. If no blood flows into the tube or if blood ceases to flow before an adequate sample (approximately 6.0 mL as minimum blood volume) is collected, the following steps are suggested to complete satisfactory collection:
 - a. Confirm correct position of needle cannula in vein.

- b. If a multiple sample needle is being used, remove the tube and place a new tube into the holder.
- c. If the second tube does not draw, remove needle and discard in appropriate disposal device. DO NOT RESHIELD. Repeat procedure from step 1.

NOTE: When using a blood collection set, a reduced draw of approximately 0.5 mL will occur on the first tube. This reduced draw is due to the trapped air in the blood collection set tubing which enters the first tube.

9. When first tube has filled to its stated volume, remove it from holder.
10. Place succeeding tubes in holder, puncturing diaphragm to initiate flow.
11. While each successive tube is filling invert previous tube 8 to 10 times to mix anticoagulant additive with blood. DO NOT SHAKE. Vigorous mixing can cause hemolysis.
12. As soon as last tube is filled and mixed as above, remove needle from vein. Apply pressure to puncture site with dry, sterile gauze until bleeding stops.
13. Apply bandage, if desired.
14. After venipuncture, the top of the stopper may contain residual blood. Proper precautions should be taken when handling tubes to avoid contact with this blood. Any needle holder that becomes contaminated with blood should be considered hazardous.
15. After collection, dispose of needle using an appropriate disposal device. DO NOT RESHIELD.

PROCEDURE

1. The BD Vacutainer® CPT™ Tube with Sodium Heparin® should be at room temperature (18-25° C) and properly labeled for patient identification.
2. Collect blood into the tube using the standard technique for BD Vacutainer® Evacuated Blood Collection Tubes (see Venipuncture Technique & Sample Collection section and Prevention of Backflow section).
3. After collection, store tube upright at room temperature until centrifugation. Blood samples should be centrifuged within two hours of blood collection for best results.
4. Centrifuge tube/blood sample at room temperature (18-25° C) in a horizontal rotor (swing-out head) for a minimum of 15 minutes at 1500 to 1800 RCF (Relative Centrifugal Force).

NOTE: Remix the blood sample immediately prior to centrifugation by gently inverting the tube 8 to 10 times. Also, check to see that the tube is in the proper centrifuge carrier/adaptor.

WARNING: Excessive centrifuge speed (over 2000 RCF) may cause tube breakage and exposure to blood and possible injury. To calculate the correct centrifuge speed for a given RCF, use the following formula:

$$\text{RPM Speed Setting} = \frac{\sqrt{(\text{RCF}) \times (100,000)}}{(1.12) \times (r)}$$

Where r (expressed in centimeters) is the radial distance from the centrifuge center post to the tube bottom, when the tube is in the horizontal position and RCF is the desired centrifugal force, 1500–1800 in this case.

Layering of Formed Elements in the BD Vacutainer® CPT™ Tube

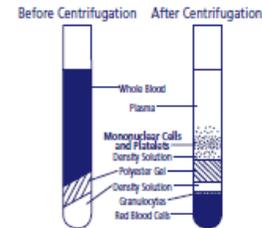


Figure 2

5. After centrifugation, mononuclear cells and platelets will be in a whitish layer just under the plasma layer (see Figure 2). Aspirate approximately half of the plasma without disturbing the cell layer. Collect cell layer with a Pasteur Pipette and transfer to a 15 mL size conical centrifuge tube with cap. Collection of cells immediately following centrifugation will yield best results.
6. An alternative procedure for recovering the separated mononuclear cells is to resuspend the cells into the plasma by inverting the unopened BD Vacutainer® CPT™ Tube gently 5 to 10 times. This is the preferred method for storing or transporting the separated sample for up to 24 hours after centrifugation. To collect the cells, open the BD Vacutainer® CPT™ Tube and pipette the entire contents of the tube above the gel into a separate vessel.

Suggested Cell Washing Steps:

1. Add PBS to bring volume to 15 mL. Cap tube. Mix cells by inverting tube 5 times.
2. Centrifuge for 15 minutes at 300 RCF. Aspirate as much supernatant as possible without disturbing cell pellet.
3. Resuspend cell pellet by gently vortexing or tapping tube with index finger.

4. Add PBS to bring volume to 10 mL. Cap tube. Mix cells by inverting tube 5 times.
5. Centrifuge for 10 minutes at 300 RCF. Aspirate as much supernatant as possible without disturbing cell pellet. Resuspend cell pellet in the desired medium for subsequent procedure.

LIMITATIONS Volume of Blood

The exact quantity of blood drawn will vary with the altitude, ambient temperature, barometric pressure, and venous pressure. The minimum volume of blood that can be processed without significantly affecting the recovery of mononuclear cells is approximately 6.0 mL. However, hematological parameters such as a low hematocrit or a low mean corpuscular hemoglobin concentration may also adversely affect product performance, with increased red blood cell contamination above gel barrier.

Temperature

Since the principle of separation depends on a density gradient, and the density of the components varies with temperature, the temperature of the system should be controlled between 18-25° C during separation.

Centrifugation

Since the principle of separation depends on the movement of formed elements in the blood through the separation media, the "RCF" should be controlled at 1500 RCF to 1800 RCF. The time of centrifugation should be a minimum of 15 minutes. (As noted in the trouble shooting section, some specimens may require up to 30 minutes for optimal separation). Centrifugation of the BD Vacutainer® CPT™ Tube up to 30 minutes has the effect of reducing red blood cell contamination of the mononuclear cell fraction. Centrifugation beyond 30 minutes has little additional effect. The BD Vacutainer® CPT™ Tube may be recentrifuged if the mononuclear "band" or layer is not disturbed.

Time

Blood samples should be centrifuged/separated within two hours of blood drawing. Red blood cell contamination in the separated mononuclear cell fraction increases with longer delays in sample separation. Mononuclear cell recovery decreases with increased time delay before centrifugation.

Cell Separation

As with other separation media, density gradient separation using BD Vacutainer® CPT™ Tubes may alter the proportion of some lymphocyte subsets (e.g., T and B cells) from those in unseparated whole blood^(4,5). This alteration is believed to be relatively insignificant in normal cases. However, in cases where the subject is leucopenic or lymphopenic, the selective loss of one subset may alter proportions significantly.

Certain disease states and/or drugs may also alter cell density and therefore affect separation using BD Vacutainer® CPT™ Tubes⁶.

NAPKON-PÄD-SOP-01_Anlage 1: Handbuch CPT™

Microbial Contamination

Microbial contamination of reagents may alter the results obtained on cells separated using BD Vacutainer® CPT™ Tubes.

Separated Cell Assays

For determinations other than those described in the results section, for which specimens are separated using BD Vacutainer® CPT™ Tubes, a user should establish to his or her satisfaction that the values obtained meet his or her criteria for clinically acceptable values.

Platelet Contamination

Repeatability studies indicate that mononuclear cell samples separated by the BD Vacutainer® CPT™ Tube method have approximately 1.5 times the platelet concentration that a matching sample separated by the FICOLL™ Hypaque™ method contains before the samples are "washed" by subsequent centrifugation steps.

EXPECTED NORMAL DONOR STUDY RESULTS

Table 1 shows the cell percentages obtained from forty-two blood specimens from a total of twenty-nine normal apparently healthy adults using the FICOLL™ Hypaque™ and the BD Vacutainer® CPT™ Tube cell separation methods. Recovery and Purity percentages were determined from values obtained using the Coulter Counter® Model S + STKR cell counting method. Viability percentages were determined by Acridine Orange/Ethidium Bromide method. RBC percentages were determined by hemo-cytometer count under a light microscope. Results are obtained following the procedures recommended by the manufacturer.

Table 1
Cell Percentages, FICOLL™ Hypaque™ versus BD Vacutainer® CPT™ Tube Method ⁽¹⁾.

	FICOLL™-Hypaque™ Method			BD Vacutainer® CPT™ Tube Method		
	AVG%	SD	CV	AVG%	SD	CV
Recovery	68.2	10.3	15.1	63.0	11.7	18.6
Purity						
Total Mononuclear Cells	93.5	*	*	92.2	*	*
Lymphocytes	79.8	*	*	79.6	*	*
Monocytes	13.6	*	*	12.2	*	*
Viability	94.7	4.5	4.8	95.8	2.8	2.9
RBC Contamination	6.3	9.9	157.1	16.9	14.2	84.0
Granulocyte Contamination	6.5	*	*	8.2	*	*

FOOTNOTES:

*Regression analysis shows that the percent purity parameter is donor dependent, thus no independent values of standard deviation are appropriate.

Average number of mononuclear cells (Lymphocytes & Monocytes) recovered per milliliter of whole blood for each method was:

BD Vacutainer® CPT™	1.30x10 ⁶ cells
FICOLL™ Hypaque™	1.40x10 ⁶ cells

Recovery – # of recovered mononuclear cells expressed as a % of the # contained in the original whole blood sample.

Purity – # of mononuclear cells expressed as a % of lymphocytes and monocytes in the separated white blood cells.

Viability – # of viable mononuclear cells expressed as a % of the total # cells separated.

RBC Contamination – # of red blood cells expressed as a % of the # of separated cells.

Granulocyte – # of granulocytes expressed as a % of the total Contamination # of separated white blood cells.

AVG – Mean Number

SD – Standard Deviation

CV – Coefficient of Variation

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Table 2 shows the repeatability of sample preparation using the BD Vacutainer® CPT™ Tube system which was tested and compared to the FICOLL™ Hypaque™ method. Ten samples of one donor's pooled blood were centrifuged and assayed in duplicate for each method. No final washing steps were performed. The samples were resuspended to equal final volumes. Estimates of variability due to repeated measurements are shown for within tube and between tubes. Within tube variation was measured by taking duplicate readings from each tube.

Table 2

Repeatability of recovered Mononuclear Cell values, (FICOLL™ Hypaque™ versus BD Vacutainer® CPT™ Tube Method) ⁽¹⁾.

PARAMETER	% VARIATION					
	AVG WITHIN TUBE*			BETWEEN TUBE		
	%	SD	CV	SD	CV	CV
Recovery						
BD Vacutainer® CPT™ (n=9)**	79.5	3.41	4.3	6.25	7.9	
FICOLL™ Hypaque™ (n=10)	73.3	3.55	4.8	2.22	3.0	
Purity						
BD Vacutainer® CPT™ (n=9)						
Total Mononuclear Cells	94.6	0.69	0.7	1.48	1.6	
Lymphocytes	72.6	0.93	1.3	0.87	1.2	
Monocytes	22.0	0.94	4.3	0.99	4.5	

PARAMETER	% VARIATION					
	AVG WITHIN TUBE*			BETWEEN TUBE		
	%	SD	CV	SD	CV	CV
FICOLL™ Hypaque™ (n=10)						
Total Mononuclear Cells	96.5	0.66	0.7	1.46***	1.5	
Lymphocytes	80.5	0.82	1.0	0.91	1.1	
Monocytes	16.0	1.06	6.6	1.30	8.2	
RBC Contamination						
BD Vacutainer® CPT™ (n=9)	28.4	1.36	4.8	13.73	48.5	
FICOLL™ Hypaque™ (n=10)	14.9	1.21	8.1	5.85	39.3	
Granulocyte Contamination						
BD Vacutainer® CPT™	5.4	0.62	11.4	1.49	27.3	
FICOLL™ Hypaque™	3.5	0.57	16.2	1.47	42.1	

FOOTNOTES:

Parameters defined in Table 1.

Viability was 100% in all samples since no cell wash steps were performed.

* Within tube variation was determined by taking duplicate readings from each tube.

** A duplicate reading was lost, so only 9 samples could be compared.

*** With one apparently unusual tube deleted, SD=0.45.

AVG – Mean Number

SD – Standard Deviation

CV – Coefficient of Variation

n – # of tubes

TROUBLESHOOTING

PROBLEM	POSSIBLE	CAUSE SOLUTION
Granulocyte Contamination Greater than 10%.	Centrifuge not at proper speed.	Adjust centrifuge speed to produce 1500-1800 RCF.
	Centrifuge or BD Vacutainer® CPT™ Tube not at room temperature (18-25°C).	Allow centrifuge and BD Vacutainer® CPT™ Tube to come to room temperature (18-25°C).
	Delay in centrifugation.	Centrifuge as soon as possible after obtaining blood specimen.
	Abnormal sample with high granulocyte ratio.	Subsequent separation step using standard FICOLL™ Hypaque™ method.
Red blood cell contamination.	BD Vacutainer® CPT™ Tube or centrifuge not at room temperature (18-25°C).	Allow centrifuge or BD Vacutainer® CPT™ Tube to come to room temperature (18-25°C).
	Centrifugation time too short.	Increase time of centrifugation (up to 30 minutes).
	MCHC below normal ⁽²⁾ .	Increase time of centrifugation (up to 30 minutes).
Too few cells.	Leucopenia.	Collect additional BD Vacutainer® CPT™ Tube specimens as required.

PROBLEM	POSSIBLE	CAUSE SOLUTION
Platelet excess.	High platelet count.	Wash separated cells two times for 15 minutes at 100 RCF.
No defined or distinct mononuclear layer.	Adapter incorrect size.	Use 16 x 125mm centrifuge tube adapter.
	Centrifuge not calibrated correctly.	Have centrifuge calibrated.
	Centrifuge speed too low.	Increase centrifuge speed to produce 1500-1800 RCF.
	Centrifuge time too short.	Increase time of centrifugation (up to 30 minutes).
	Hyperlipemic Sample.	Obtain fasting blood specimen.
No gel movement.	Centrifuge speed too low.	Increase centrifuge speed to produce 1500-1800 RCF.
	Centrifuge temperature less than 18°C.	Increase centrifuge setting to 18-25°C.

REFERENCES

- Boyer, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl 97 (Paper IV), 77-89, 1968.
- Ting, A. and Morris, P.J. A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox. Sang. 20:561-563, 1971.
- Fotino, M., Merson, E.J. and Allen, F.H. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. Ann. Clin. Lab. Sci. 1:131-133, 1971.
- Dwyer, J.M., Finklestein, F.O., Mangi, R.J., Fisher, K. and Hendler, E. Assessment of the adequacy of immunosuppressive therapy using microscopy techniques to study immunologic competence. Transplant. Proc. 7:785, 1975.
- Brown, G. and Greaves, M.F. Enumeration of absolute numbers of T and B cells in human blood. Scand. J. Immunol. 3:161, 1974.
- McCarthy, D.A., Perry, J.D., et.al. Centrifugation of Normal and Rheumatoid Arthritis Blood on FICOLL™-Hypaque™ and FICOLL™-Nycodenz Solution. J. Immunol. Meth. 73:415-425 (1984).
- Data on File, Report No. R-88-99-QC-195, BD Vacutainer Systems, NJ.
- Needham, P.L. Separation of human blood using "Mono-Poly Resolving Medium." J. Immunol. Meth. 99:283, 1987.

NAPKON-PÄD-SOP-01_Anlage 1: Handbuch CPT™

GENERAL REFERENCES

Centers for Disease Control. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. MMWR 1987, 36 (suppl. no. 2S), pp. 35 - 175.

Centers for Disease Control. Update: Universal Precautions for Prevention of Transmission of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus, and Other Bloodborne Pathogens in Health-Care Settings. MMWR 1988, 37 No. 24, pg. 380.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood Tissue. Tentative Guidelines NCCLS Document M29-T. NCCLS; 1991, Villanova, PA.

OSHA Final Standard for Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. 56 Fed. Reg. 64 175, Dec. 6, 1991; 29 CFR Part 1910.1030.

Symbol & Mark Key:

 --- *In Vitro* Diagnostic Medical Device

 --- Do Not Reuse

 --- Catalog Number

 --- Use By

 --- Batch Code

 --- Method of Sterilization Using Steam or Dry Heat

 --- Consult Instructions For Use

 --- Manufacturer

 --- Keep Away From Sunlight

 --- Fragile, Handle with Care

 --- This End Up

 --- Temperature Limitation

FICOLL is a trademark of GE Healthcare companies.
Hypaque is a trademark of Amersham Health AS.
Coulter and Coulter Counter are trademarks of
Coulter International Corp.

 Becton, Dickinson and Company, 1 Becton Drive,
Franklin Lakes, NJ 07417-1885 USA
BD, BD Logo and all other trademarks are property of
Becton, Dickinson and Company. ©2015 BD. 06/2015 500010323
Made in USA www.bd.com

14. Zubehör/ allg. Labbedarf
10. Reaktions-/ Analysengläser
10. Absorbier- systeme/Folien
11. Cytocentrif. Microtrak
9. Separation
8. Protein- kristallisation
7. Molekular- biologie
6. Liquid Handling
5. Rührer-/ Mehrzweckgefäße
4. Mikrobiologie/ Bakteriologie
3. Immunologie/ HLA
2. HTS- Microplatten
1. Zell- und Gewebekultur



9 Separation

↳ Technische Informationen	9 2
↳ Leucosep™	9 3
12 ml Leucosep™ Röhrenchen	9 3
50 ml Leucosep™ Röhrenchen	9 3
Gebrauchsanleitung Leucosep™	9 4
↳ OncoQuick®	9 5

14. Zubehör/ allg. Labbedarf
13. Reaktions-/ Analysengläser
12. Absorbier- systeme/Folien
11. Cytocentrif. Microtrak
9. Separation
8. Protein- kristallisation
7. Molekular- biologie
6. Liquid Handling
5. Rührer-/ Mehrzweckgefäße
4. Mikrobiologie/ Bakteriologie
3. Immunologie/ HLA
2. HTS- Microplatten
1. Zell- und Gewebekultur



Separation

Mit Hilfe unterschiedlicher Separationstechniken können bestimmte Partikel (DNA, RNA, Proteine, Organellen, Vesikel, Micellen, Zellen etc.) definiert aus komplexen biologischen Gemischen (Zell- und Gewebehomogenaten, Blut, Urin und anderen Körperflüssigkeiten) angereichert und anschließend selektiv untersucht werden.

Die Separation beruht dabei entweder auf den unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten verschiedener Partikel in einer Flüssigkeit oder auf deren unterschiedlichen Dichten. So wird bei der **Dichtegradientenzentrifugation** (auch als Banden-, Gleichgewichts- oder isopyknische Zentrifugation bezeichnet) das Prinzip genutzt, dass Partikel einer bestimmten Dichte in einer umgebenden Lösung mit gleicher Dichte „schweben“.

Erste Anwendungen der Dichtegradientenzentrifugation sind aus den frühen 1950er Jahren bekannt. Mit Hilfe gepufferter Saccharose-Gradienten erfolgte damals die Anreicherung von Zellorganellen. Es ist unbestritten, dass unter anderem die mit diesen angereicherten Materialien gewonnenen Erkenntnisse dazu beitrugen, den Grundstein der modernen Molekularbiologie zu setzen. Schnell stellte sich heraus, dass, vor allem aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber osmotischen Schwankungen,

die Anreicherung von Säugerzellen wesentlich komplexere Separationsmedien benötigt. Von Noble und Boyum wurden bereits in den Jahren 1967 und 1968 Methoden zur Separation mononukleärer Zellen aus Vollblut und Knochenmark beschrieben. Basierend auf diesen wissenschaftlichen Pionierleistungen erfordern gerade heute zahllose Applikationen der biomedizinischen Forschung und Routinediagnostik hoch angereicherte, lebensfähige und funktionell intakte Zellpopulationen als Ausgangsmaterial. Die Separation solcher Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation hat sich dabei aufgrund der unkomplizierten und robusten Durchführbarkeit als weltweit meist verbreitete Methode erwiesen.

Mit dem Produkt **Leucosep™** hat Greiner Bio-One das selbst gesteckte Ziel erreicht, die Dichtegradientenzentrifugation wesentlich zu optimieren und anwenderfreundlich zu gestalten.

Daneben wurde mit dem Produkt **OncoQuick®** das Applikationsspektrum der Dichtegradientenzentrifugation um die Beantwortung relevanter onkologischer Fragestellungen wesentlich erweitert.

1 Zell- und Gewebekultur

2 HTS- Microplatten

3 Immunologie/ HLA

4 Molekularbiologie/ Bakteriologie

5 Zytometrie/ Mehrzweckgefäße

6 Liquid Handling

7 Molekularbiologie

8 Protein-Instillation

9 Separation

10 Biochemie/ Microfluidik

11 Zytometrie

12 Abdecksysteme/Folien

13 Reaktions-/ Analysegefäße

14 Zubehör/ allg. Labbedarf

1 Zell- und Gewebekultur

2 HTS- Microplatten

3 Immunologie/ HLA

4 Molekularbiologie/ Bakteriologie

5 Zytometrie/ Mehrzweckgefäße

6 Liquid Handling

7 Molekularbiologie

8 Protein-Instillation

9 Separation

10 Biochemie/ Microfluidik

11 Zytometrie

12 Abdecksysteme/Folien

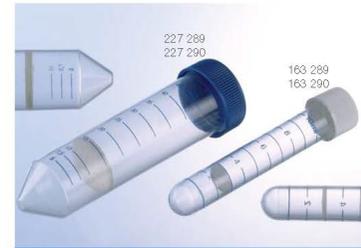
13 Reaktions-/ Analysegefäße

14 Zubehör/ allg. Labbedarf

11 | www.gbo.com/bioscience

Leucosep™

12 ml und 50 ml Leucosep™ Röhren



Leucosep™

Effiziente Separation von Lymphozyten und mononukleären Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark

Eigenschaften:

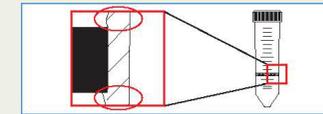
- Anreicherung direkt aus Vollblut
- Vereinfachtes Befüllen durch Trennscheibe
- Durchführung der Separation in 15 Minuten bei Raumtemperatur
- Keine zusätzlichen Laborgeräte notwendig
- Abtrennung von Erythrozyten und Granulozyten
- Keine Rekontamination mit Erythrozyten
- Kein Blockieren von Markermolekülen
- Mit Ficoll-Paque™ PLUS vorbefüllt erhältlich
- Unbefüllt erhältlich zur Verwendung von Separationsmedien nach Wahl des Anwenders

Leucosep™ wurde zur optimierten Separation von Lymphozyten und peripheren mononukleären Zellen (z.B. PBMCs) aus humanem Vollblut und Knochenmark entwickelt. Das besondere Merkmal von Leucosep™ ist die poröse Trennscheibe, die in die Zentrifugierrohre aus hoch transparentem Polypropylen eingesetzt ist. Die Trennscheibe besteht aus hochwertigem Polyethylen und besitzt eine Porengröße, die exakt auf den Einsatzzweck zugeschnitten ist. Durch diese Trennscheibe entfällt das zeitaufwändige und mühselige Übersichten des Probenmaterials.

Antikoagulieretes Blut oder Knochenmark kann einfach direkt aus dem Blutentnahmeröhrchen in die Leucosep™ Röhren gegossen werden. Eine Durchmischung mit dem Separationsmedium wird durch die Trennscheibe verhindert. Während der Zentrifugation werden Lymphozyten und PBMCs aufgrund ihrer Dichte von unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten separiert und in einer Interphase oberhalb des Separationsmediums angereichert. Nach erfolgter Separation wird durch die Trennscheibe die Rekontamination der angereicherten Zellfraktion mit Erythrozyten und Granulozyten während der Ernte vermieden. Ganz gleich,

ob die Separation mittels Ficoll-Paque™ PLUS oder einem anderen Separationsmedium erfolgen soll, egal ob große oder kleine Probenvolumina bearbeitet werden: Greiner Bio-One bietet genau die passenden Leucosep™ Röhren zur jeweiligen Applikation.

Die Gebrauchsanleitung für Leucosep™ sowie weitere Informationen finden Sie unter www.gbo.com/bioscience.



Neu: 50 ml Leucosep™ Röhren verfügen jetzt über **Halteringe**, die die Position der Trennscheibe stabilisieren. Dies erhöht die Robustheit und Benutzerfreundlichkeit, z.B. während der Zentrifugation.

Kat.-Nr.	non-cytotoxik		non-pyrogen			
	163 288	163 289	163 290	227 288	227 289	227 290
Produktbeschreibung	Leucosep™ Röhren mit Trennscheibe	Leucosep™ Röhren mit Trennscheibe	Leucosep™ Röhren mit Trennscheibe	Leucosep™ Röhren mit Trennscheibe	Leucosep™ Röhren mit Trennscheibe	Leucosep™ Röhren mit Trennscheibe
Volumen [ml]	12	12	12	50	50	50
Separationsmedium	+ / befüllt mit Ficoll-Paque™ PLUS		-	+ / befüllt mit Ficoll-Paque™ PLUS		
Steril	as	-	+	as	-	+
Probenvolumen	3 – 8 ml Blut		3 – 8 ml Blut	15 – 30 ml Blut		
Stück pro Box/Karton	50/500	50/500	50/500	25/250	25/300	25/300

Vorbefüllte Leucosep™ Röhren werden mit Ficoll-Paque™ PLUS befüllt, welches von Greiner Bio-One unterverpackt wurde. as = aseptische Herstellung. Ficoll-Paque™ PLUS ist eine Marke der GE Healthcare Unternehmen.

Gebrauchsanleitung Leucosep™

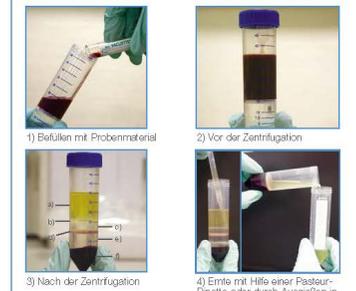
Das Verfahren

Leucosep™ wurde zur optimierten Separation von Lymphozyten und peripheren mononukleären Zellen (sog. PBMCs) aus humanem Vollblut und Knochenmark mit-fels Dichtegradientenzentrifugation entwickelt. Das besondere Merkmal von Leucosep™ ist die poröse Trennscheibe aus Polyethylen, die in die Zentrifugenröhrchen aus hoch transparentem Polypropylen eingesetzt ist. Durch diese Trennscheibe entfällt das zeitaufwändige und mühselige Überschichten des Probenmaterials. Antikoagulierendes Blut oder Knochenmark kann einfach direkt aus dem Blutentnahmeröhrchen in die Leucosep™ Röhrchen gegossen werden. Eine Durchmischung mit dem Separationsmedium wird durch die Trennscheibe verhindert. Während der Zentrifugation werden Lymphozyten und PBMCs aufgrund ihrer Dichte von unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten separiert und in einer Interphase zwischen der Plasmafraktion und dem Separationsmedium angereichert. Nach erfolgter Separation wird durch die Trennscheibe die Rekontamination der angereicherten Zellfraktion mit Erythrozyten und Granulozyten während der Ernte vermieden.

Vorbereitung

- Separationsmedium auf Raumtemperatur (RT) erwärmen, dabei vor Licht schützen.
- Befüllen der Leucosep™ Röhrchen mit Separationsmedium: 3 ml bei Verwendung der Röhrchen Kat.-Nr. 163 289 oder 163 290; 15 ml bei Verwendung der Röhrchen Kat.-Nr. 227 289 oder 227 290.
- Befüllte Röhrchen mit Schraubverschluss verschließen und 30 Sekunden bei 1000 x g und RT zentrifugieren. Das Separationsmedium befindet sich nun unterhalb der Trennscheibe.
- Bei Verwendung von Röhrchen, die bereits mit Separationsmedium vorbegefüllt sind (Kat.-Nr. 163 288 oder 227 288), entfallen die vorgenannten Schritte. Die Röhrchen müssen lediglich vor der Benutzung auf RT erwärmt werden.
- Die Röhrchen können nun mit antikoaguliertem Blut oder Knochenmarkaspirat befüllt werden. Eine Verdünnung des Probenmaterials mit physiologischer Kochsalzlösung muss nicht erfolgen, kann aber dazu beitragen, das Separationsergebnis zu verbessern. Für Blut ist eine Verdünnung von 1:2, für Knochenmark ein Verhältnis von 1:4 empfehlenswert.

Arbeitsablauf

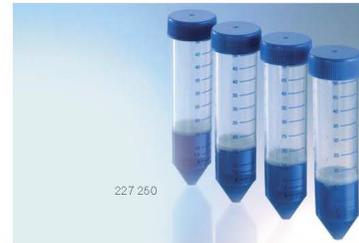


- Antikoagulierendes Probenmaterial (Blut oder Knochenmarkaspirat, ggfs. mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt) direkt aus dem Blutentnahmeröhrchen vorsichtig in das Leucosep™ Röhrchen gießen: 3 – 8 ml Probenmaterial bei Verwendung der Röhrchen Kat.-Nr. 163 288, 163 289 oder 163 290; 15 – 30 ml Probenmaterial bei Verwendung der Röhrchen Kat.-Nr. 227 288, 227 289 oder 227 290.
- 10 Minuten bei 1000 x g und RT oder 15 Minuten bei 800 x g und RT im Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugieren.
- Folgende Schichtung von oben nach unten ergibt sich nach der Zentrifugation: a) Plasma – b) angereicherte Zellfraktion (Interphase aus Lymphozyten / PBMCs) – c) Separationsmedium – d) Trennscheibe – e) Separationsmedium – f) Pellet (Erythrozyten und Granulozyten). Die Plasmafraktion bis auf eine Schichtdicke von 5 bis 10 mm abheben und verwerten.
- Ernte der angereicherten Zellfraktion (Lymphozyten/PBMCs) mit Hilfe einer Pasteur-Pipette oder durch Ausgießen aus dem Leucosep™ Röhrchen in ein frisches Zentrifugenröhrchen. Eine Rekontamination mit den abgereicherten Erythrozyten und Granulozyten wird durch die Trennscheibe verhindert.
- Wäsche der angereicherten Zellfraktion (Lymphozyten/PBMCs) mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), anschließend 10 Minuten bei 250 x g zentrifugieren.
- Waschschritt zweimal wiederholen, dabei das Zellpellet mit 5 ml PBS resuspendieren.

Anmerkung

Biologische Proben und alle zur Blutentnahme erforderlichen Nadeln oder Blutentnahmesets sind in Übereinstimmung mit den Methoden und Verfahrensweisen ihrer Bestimmung bzw. mit denen der jeweiligen Einrichtung zu handhaben. Im Falle einer Kontamination mit Blut oder anderen biologischen Proben (z.B. durch Stichverletzung) müssen umgehend geeignete medizinische Maßnahmen ergriffen werden, da solches Material immer als potenziell infektiös mit HBV, HCV (Hepatitis), HIV (AIDS) oder anderen Infektionserregern eingestuft werden muss.

OncoQuick®



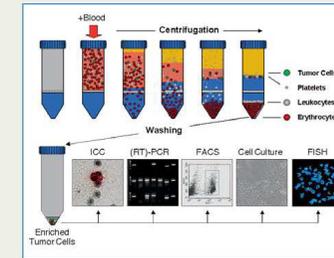
OncoQuick®

Anreicherung disseminierter, zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut

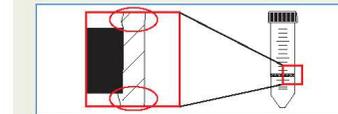
Eigenschaften:

- Zeitbedarf etwa 45 Minuten
- Reproduzierbare Wiederfindung: > 70%
- Blutzellanreicherung um bis zu 6 Logstufen
- Keine zusätzlichen Laborgeräte notwendig
- Kein Bedarf an magnetischen Beads
- Kein Blockieren von Markermolekülen
- Anreicherung direkt aus Vollblut

OncoQuick® ist ein anwenderfreundliches, schnelles und effizientes System zur Anreicherung zirkulierender Tumorzellen, die von einem soliden epithelialen Tumor oder malignen Melanom in das Blut gestreut werden. In OncoQuick® verbinden sich die Vorteile der Zellschichtung durch Dichtegradientenzentrifugation (schnell, reproduzierbar und preiswert) mit Wiederfindungsraten, die mit denen der Immunobead-Techniken vergleichbar sind. OncoQuick® besteht aus einem sterilen 50 ml Polypropylen-Röhrchen mit einer porösen Trennscheibe, die oberhalb des speziell entwickelten Separationsmediums eingefügt ist. Bis zu 30 ml antikoagulierendes Vollblut werden direkt in das OncoQuick® Röhrchen eingefüllt und zentrifugiert. Neben Erythrozyten und Granulozyten erlaubt das Separationsmedium auch die weitgehende Abreicherung von Lymphozyten und mononukleären Zellen. Die disseminierten Tumorzellen werden in der Interphase angereichert. Nach der Ernte erfolgt die Wäsche der angereicherten Zellfraktion. Anschließend stehen die Tumorzellen sämtlichen gängigen diagnostischen Methoden zur Verfügung. OncoQuick® wurde in Kooperation zwischen Hexal Gentech und Greiner Bio-One entwickelt und ist ausschließlich zur Verwendung für Forschungszwecke bestimmt!



Die Gebrauchsanleitung für OncoQuick® sowie weitere Informationen finden Sie unter www.gbo.com/bioscience.



Neu: 50 ml OncoQuick® Röhrchen verfügen jetzt über **Haltering**, die die Position der Trennscheibe stabilisieren. Dies erhöht die Robustheit und Benutzerfreundlichkeit, z.B. während der Zentrifugation.

non-cytotoxisch non-pyrogenisch

Kat.-Nr.	227 255 ^{a)}	227 250
Beschreibung	OncoQuick® Röhrchen mit Trennscheibe und Separationsmedium	OncoQuick® Röhrchen mit Trennscheibe und Separationsmedium
Steril	as	as
Probenvolumen	15 – 30 ml Blut	15 – 30 ml Blut
Röhrchen pro Karton	4	10

^{a)} einmalig als Musterpackung zum Sonderpreis erhältlich

as = aseptische Herstellung



INTENDED USE

SepMate™ tubes are designed for the *in vitro* isolation of mononuclear cells (MNCs) from human whole peripheral blood and cord blood samples by density gradient centrifugation.

PRODUCT DESCRIPTION

Polypropylene tube with insert. Gamma-irradiated.

STORAGE

Store at room temperature (15 - 25°C).

DIRECTIONS FOR USE

Ensure that sample, phosphate-buffered saline with 2% fetal bovine serum (PBS + 2% FBS; Catalog #07905), density gradient medium (see Notes on reverse page), and centrifuge are all at room temperature (15 - 25°C).

1. Add density gradient medium to the SepMate™ tube by carefully pipetting it through the central hole of the SepMate™ insert. Refer to Table 1 for required volumes. The top of the density gradient medium will be above the insert.

Note: Small bubbles may be present in the density gradient medium after pipetting. This will not affect performance.

2. Dilute sample with an equal volume of PBS + 2% FBS. Mix gently.
For example, dilute 5 mL of sample with 5 mL of PBS + 2% FBS.

3. Keeping the SepMate™ tube vertical, add the diluted sample by pipetting it down the side of the tube. The sample will mix with the density gradient medium above the insert.

Note: The sample can be poured down the side of the tube. Take care not to pour the diluted sample directly through the central hole.

4. Centrifuge at **1200 x g** (see Notes) for **10 minutes** at room temperature, with the **brake on**.

Note: For samples older than 24 hours, a centrifugation time of 20 minutes is recommended.

5. Pour off the top layer, which contains the enriched MNCs, into a new tube. Do not hold the SepMate™ tube in the inverted position for longer than 2 seconds.

Note: Some red blood cells (RBCs) may be present on the surface of the SepMate™ insert after centrifugation. This will not affect performance.

6. Wash enriched MNCs with PBS + 2% FBS. Repeat wash.

Note: Centrifuging at 300 x g for 8 minutes at room temperature, with the brake on, is recommended.

SEPMATE™ PROCEDURE

Numbers in brackets refer to steps under Directions for Use.

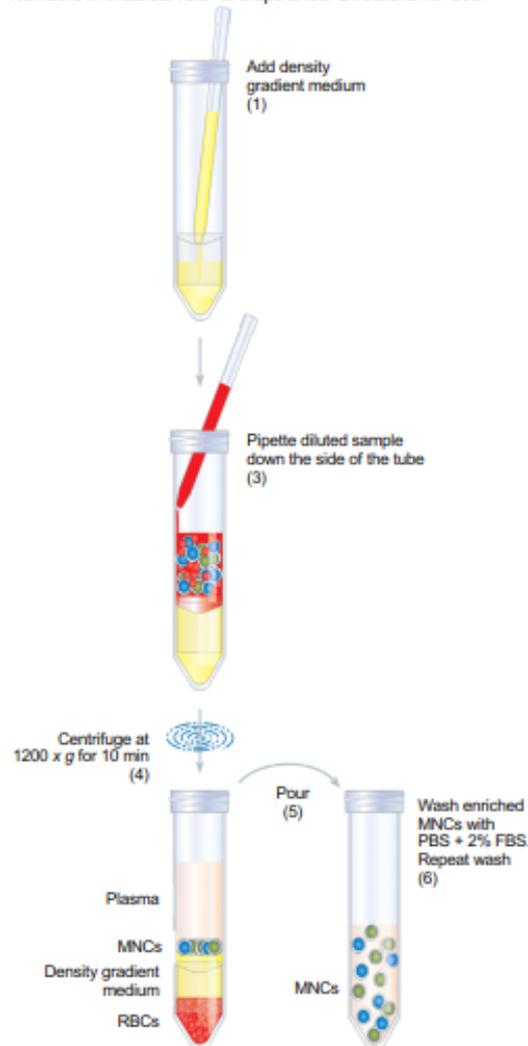


Table 1: Density Gradient Medium Volumes

SEPMATE™ TUBE	INITIAL BLOOD SAMPLE (mL)	DENSITY GRADIENT MEDIUM (mL)
15	0.5 - 4.0	4.5
15	> 4 - 5	3.5
50	4 - 17	15

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT INTENDED FOR HUMAN OR ANIMAL DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USES.



TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713

INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM • FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT WWW.STEMCELL.COM

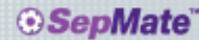
VERSION 2.0.0

DOCUMENT #29251

NAPKON-PÄD-SOP-01_Anlage 3: Herstelleranleitung SepMate™

CATALOG #15450
CATALOG #15460
CATALOG #15415
CATALOG #15420

50 mL tubes, 20 tubes/bag
50 mL tubes, 5 x 20 tubes/bag
15 mL tubes, 20 tubes/bag
15 mL tubes, 5 x 20 tubes/bag

SepMate™

PRODUCT INFORMATION SHEET

NOTES

Samples

SepMate™ can be used with human whole peripheral blood and cord blood samples. It has not been tested with samples older than 48 hours. For use of SepMate™ with samples other than human whole peripheral blood or cord blood please contact STEMCELL Technologies' Technical Support at techsupport@stemcell.com.

SepMate™-15

SepMate™-15 is designed to process 0.5 - 5 mL of initial sample.

A minimum packed RBC volume of 0.25 mL is required. For patient samples with low hematocrits, the minimum sample volume may therefore be greater than 0.5 mL.

There is a maximum packed RBC volume of 3 mL. For patient samples with very high hematocrits, the maximum sample volume may therefore be less than 5 mL.

SepMate™-50

SepMate™-50 is designed to process 4 - 17 mL of initial sample.

A minimum packed RBC volume of 2 mL is required. For patient samples with low hematocrits, the minimum sample volume may therefore be greater than 4 mL.

There is a maximum packed RBC volume of 12 mL. For patient samples with very high hematocrits, the maximum sample volume may therefore be less than 17 mL.

Density Gradient Medium

Density gradient medium refers to Lymphoprep™ (Catalog #07801), Ficoll-Paque™ PLUS or other similar density gradient media.

Recommended Medium

The recommended medium is phosphate-buffered saline with 2% fetal bovine serum (PBS + 2% FBS, Catalog #07905).

Conversion of g to RPM

To convert g to rpm, use the following formula:

$$\text{RPM} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{(1.118 \times 10^{-5}) \times (\text{Radius})}}$$

Where: RPM = centrifuge speed in revolutions per minute
RCF = relative centrifugal force (g)
Radius = radius of centrifuge rotor in centimeters (cm)

Troubleshooting

If the density gradient medium above the SepMate™ insert appears red after centrifugation (i.e. some RBCs have not pelleted), the SepMate™ tube can be spun at 1200 x g for another 10 minutes with the brake on. This situation may occur with samples that are older than 24 hours.

Platelet Removal (optional)

Platelets present in the plasma layer may be removed from the enriched MNCs in one of the following ways:

- In step 5, pipette off the supernatant above the MNC layer before pouring
- In step 6, perform one of the washes at 120 x g for 10 minutes at room temperature, with the brake off

SUPPLEMENTARY PROCEDURE

Use of SepMate™ with RosetteSep™ Cocktails

SepMate™ tubes can be used with RosetteSep™ cell enrichment cocktails to isolate specific cell types from human whole blood. For available RosetteSep™ cocktails please refer to www.rosettesep.com.

To use SepMate™ with RosetteSep™ cocktails:

1. Add RosetteSep™ cocktail to the whole blood sample using volumes recommended in the RosetteSep™ cocktail Product Information Sheet.
2. Incubate for **10 minutes** at room temperature (15 - 25°C).
Note: The 10-minute incubation time is specific to this procedure. It will have minimal effect on performance.
3. Follow the steps under SepMate™ Directions for Use, on reverse page.

Note: Use density gradient medium recommended in the RosetteSep™ cocktail Product Information Sheet.

Copyright © 2013 by STEMCELL Technologies Inc. All rights reserved including graphics and images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, SepMate, and RosetteSep are trademarks of STEMCELL Technologies Inc. Lymphoprep is a trademark of AXS-SHIELD. Ficoll-Paque PLUS is a trademark of GE Healthcare Limited. All other trademarks are the property of their respective holders.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT INTENDED FOR HUMAN OR ANIMAL DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USES.



TOLL FREE PHONE 1 800 667 0322 • PHONE +1 604 877 0713

INFO@STEMCELL.COM • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM • FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT WWW.STEMCELL.COM

VERSION 2.0.0

DOCUMENT #29251

Anleitung zur Gewinnung von Mittelstrahlurin in der Toilette

1. Den Urinsammelbecher öffnen, ohne das Innere des Gefäßes oder des Verschlussdeckels zu berühren!
2. Urin erst eine Sekunde nach Beginn des Wasserlassens sammeln durch Halten des offenen Urinbechers in den laufenden Harnstrahl.
3. Den Urinbecher möglichst zu 1/2 - 2/3 füllen!
4. Danach den restlichen, nicht gesammelten Harn bitte in die Toilette ablassen.
5. Den Urinbecher verschließen ohne das Innere des Bechers oder des Deckels zu berühren.
6. Mittels Papiertuch den Urinbecher von außen trocknen, falls notwendig. Hände mit Seife waschen.
7. Den verschlossenen Urinbecher bei der Studienassistentin oder Krankenpfleger*in abgeben.
8. [Studienassistentin] Sofern keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist, bitte auf diesem Formular notieren:
 - Datum und Uhrzeit der Uringewinnung: _____
 - Besondere Auffälligkeiten (Trübungen, Blutbeimengungen, etc.):

Anleitung zur Gewinnung einer Stuhlprobe in der Toilette

Bitte die Stuhlprobe möglichst am Tag der Nachsorgeuntersuchung vom ersten Stuhlgang entnehmen.

Vorbereitung:

- Bitte hängen Sie den beigelegten „Stuhlfänger“ in die Toilette (Abb. 1a) und nutzen Sie ihn für die Stuhlgewinnung (er kann nachher problemlos weggespült werden).
- Stellen Sie das erhaltene Stuhlsammelgefäß mit DNA-Stabilisator, an dessen Verschluss ein Plastiklöffel angebracht ist (Abb. 1b), parat.
- Ziehen Sie die mitgeschickten Einmalhandschuhe an und **vermeiden Sie Hautkontakt mit der Lösung im Stuhlsammelgefäß**. Im Falle eines Kontaktes mit der Lösung auf der Haut, betroffene Stelle gut mit Wasser spülen.

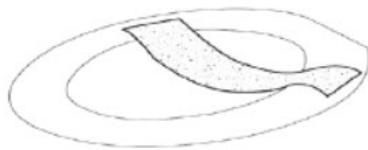


Abb. 1a.
Stuhlfänger



Abb. 1b.
Stuhlsammelgefäß mit
integriertem Löffel

Durchführung der Stuhlentnahme:

Röhrchen füllen:

- Mit dem Löffel des Stuhlsammelgefäßes an mindestens zwei verschiedenen Stellen des Stuhls **jeweils einen Löffel** voll Stuhl entnehmen und ins Röhrchen überführen. Das Stuhlsammelgefäß bitte nur mit maximal zwei Löffeln voll Stuhl, nicht komplett befüllen.
- Das Stuhlsammelgefäß gut und fest verschließen und kurz kräftig schütteln.

Weitere Schritte:

- Das Stuhlsammelgefäß, wenn nötig, äußerlich säubern und dann in den Schutzbeutel (Abb. 1c) stecken.
- Einmalhandschuhe werfen und Hände mit Seife waschen



Abb. 1c. Schutzbeutel für
Stuhlsammelgefäß

Fragebogen zur Stuhlentnahme ausfüllen:

- Nach der Stuhlentnahme bitte den Fragebogen zur Stuhlentnahme ausfüllen und diesen 2x falten.

Vorbereitung der Transport-Box:

- Den gefalteten Fragebogen zur Stuhlentnahme in die Transport-Box legen
und
- den Schutzbeutel mit dem gefüllten Stuhlsammelgefäß in die Transport-Box (Abb. 1d) stecken.
- Bis zum Transport ins verarbeitende Labor/Biobank bei Raumtemperatur (15-30°C) lagern.



Abb. 1d.
Transport-Box

Fragebogen zur Stuhlentnahme

Name, Vorname:

Angaben zur Stuhlentnahme

Datum der Stuhlentnahme: |__|__| |__|__| |__|__|__|__|
Tag Monat Jahr

Uhrzeit der Stuhlentnahme: |__|__| . |__|__|
Std Min

Stuhlentnahme aus:

Windel Töpfchen Stuhlfänger WC

Sonstiges, bitte spezifizieren:

Haben Sie ein Abführmittel verwendet? ja nein

Durchfall zum Zeitpunkt der Abnahme (> 3x Stuhlgang/Tag)? ja nein

Obstipation (Verstopfung) zum Zeitpunkt der Abnahme (< 3x Stuhlgang/Woche)?

ja nein

Stuhlfarbe:

braun schwarz grau gelb grün rötlich

Sonstiges, bitte spezifizieren:

NAPKON-PÄD-SOP-09_Anlage 2: Gebrauchsanweisung Stool Collection Tube with DNA Stabilizer

INVITEK
Molecular

Stool Collection Tube with DNA Stabilizer



Versionsnummer: 1E7f15/02/2020

DEUTSCH

Stool Collection Tube with DNA Stabilizer Gebrauchsanweisung

Bitte lesen Sie diese Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.

VERWENDUNGSZWECK:

Das Produkt dient zur Sammlung von Stuhlproben für die DNA-Stabilisierung, -Lagerung und -Extraktion (PSP® Spin Stool DNA Plus Kit / PSP® Spin Stool DNA Basic Kit). Die DNA ist in der DNA-Stabilisierungslösung für drei Monate bei Raumtemperatur stabil.

Das Produkt ist unter Aufsicht von Sachkundigen, wie z.B. technischen Angestellten oder Ärzten, die in der Anwendung molekularbiologischer Methoden geschult sind, zu verwenden.

INHALT:

Stool Collection Tube mit Löffel im Deckel, Etikett zur Probenbeschriftung. Das Röhrchen enthält ungefähr 8 ml DNA-Stabilisierungsfüssigkeit.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS:

Leeren Sie Ihre Blase bevor Sie mit der Probensammlung beginnen. Die Probengröße sollte NICHT die Größe des Löffels überschreiten. Die optimale Probengröße entspricht die einer kleinen Bohne. Falls die Stuhlprobe flüssig sein sollte, dann geben Sie 4 – 5 Löffel von der Probe in das Röhrchen.

WICHTIG:

Vor Gebrauch sollte das Stool Collection Tube Raumtemperatur haben.

1. Sammeln Sie die Stuhlprobe ohne Urin oder Toilettenwasser. Toilettenpapier oder Tücher können erforderlich sein.

2. Schrauben Sie den Deckel von dem Röhrchen ab. Lagern Sie das Röhrchen aufrecht. Verschütten Sie NICHT die Stabilisierungsfüssigkeit.

3. Benutzen Sie den integrierten Löffel im Deckel, um eine kleine Stuhlprobe zu nehmen. Sammeln Sie NICHT zu viel Probe.

4. Geben Sie den Löffel mit der Probe vorsichtig in das Röhrchen mit der Stabilisierungsfüssigkeit.

5. Schrauben Sie den Deckel mit dem Löffel wieder fest auf das Röhrchen.

6. Schütteln Sie das verschlossene Röhrchen für 15 Sekunden, um die Stuhlprobe mit der Stabilisierungsfüssigkeit zu mischen.

7. Beschriften Sie das Röhrchen mit Name, Geburtstag und Datum.

LAGERUNG:

Bei Raumtemperatur (15–30 °C) lagern.

VERSAND:

Versenden Sie die Stuhlprobe entsprechend der Angaben des Anbieters des Stool Collection Tubes. Versenden Sie entsprechend der lokal zutreffenden Richtlinien und Regularien wie UN 3373 (biologische Substanz, Kategorie B).

SICHERHEITSMASSNAHMEN:

Benutzen Sie das Stool Collection Tube NICHT, wenn der Inhalt des Röhrchens verschüttet ist.

Entfernen Sie NICHT die DNA-Stabilisierungsfüssigkeit aus dem Röhrchen. Inhalt des Röhrchens NICHT einnehmen.

Von Kindern fernhalten. Falls die Stabilisierungsfüssigkeit mit Haut oder Augen in Berührung kommt, spülen Sie die betroffene Stelle mit Wasser. Das Röhrchen vor Erwärmung und direktem Sonnenlicht schützen. Flüssigkeit nur im Originalröhrchen aufbewahren.

ETIKETTENSYMBOLLE:

Packungsbeilage beachten

Bei Raumtemperatur (15 – 30 °C) lagern.

Nicht wiederverwenden

Verfallsdatum

Lotnummer

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin, Deutschland
+49 30 9489 2901
info@invitek-molecular.com
www.invitek-molecular.com

ENGLISH

Stool Collection Tube with DNA Stabilizer Instructions

Please read these instructions carefully before using the product.

INTENDED USE:

Collection of human stool samples for DNA stabilization, storage and extraction (PSP® Spin Stool DNA Plus Kit / PSP® Spin Stool DNA Basic Kit). The DNA is protected from degradation for up to 3 month at room temperature in the DNA Stabilizer.

The product is intended for use under supervision of professionals only, such as technicians, physicians and biologist trained in molecular biological techniques.

CONTENTS:

Stool Collection Tube with integrated spoon in lid, label for donor description, each tube contains 8 ml of DNA Stabilizer reagent.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE:

Empty your bladder before beginning the collection. The sample size should NOT exceed the size of the spoon. Optimal is a sample size comparable to a small bean. When collecting liquid fecal sample transfer about 4 - 5 spoons of sample into the Stool Collection Tube.

IMPORTANT:

Before use make sure that the Stool Collection Tube has room temperature.

1. Collect fecal sample free of urine or toilet water. Toilet paper or tissues may be required.

2. Unscrew the lid of the Stool Collection Tube. Store the tube upright. Do NOT spill the stabilizing liquid in the tube.

3. Use the integrated spoon in the lid to collect a small stool sample. Do NOT collect too much sample.

4. Carefully transfer the spoon with the sample into the Stool Collection Tube with DNA Stabilizer.

5. Screw lid tightly onto the tube again.

6. Shake tube for 15 sec to mix fecal sample with DNA Stabilizer reagent.

7. Label the tube with donor name, birth date and collection date using provided label.

STORAGE:

Store at room temperature 15 – 30°C (59 – 86°F).

SHIPMENT:

Ship collected stool samples according to the instructions of Stool Collection Tube provider. Ship according to locally applicable guidelines and regulations such as UN 3373 (Biological Substance, Category B).

SAFETY PRECAUTIONS:

Do NOT use the Stool Collection Tube if liquid content of the tube is spilled. Do NOT remove DNA Stabilizer reagent from the tube.

Do NOT ingest the contents of the tube.

Keep out of the reach of children. Wash with water if DNA Stabilizer reagent comes in contact with skin or eyes. Protect container from warming up and direct sunlight. Keep only in the original container.

LABEL:

Consult operating instructions

Store at room temperature 15 – 30°C

Do not reuse

Expiry date

Lot number

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin, Deutschland
+49 30 9489 2901
info@invitek-molecular.com
www.invitek-molecular.com

Entnahmeprotokoll Blut (1/2):

(wird auf der Station/in der Ambulanz ausgefüllt)

Patient*innen-ID

Pro Probe 4 gleiche Etiketten der Proben-ID verwenden!

1. Etikett: Auf das Probenbehältnis kleben
2. - 4. Etikett: In vorgesehene Felder auf Probenbegleitbögen kleben

Kit-ID

Identifikation der Proben:

1. Monovette für Serum

Proben-ID
Monovette für Serum

2. Citrat-Monovette für Plasma

Proben-ID
Citrat-Monovette für Plasma

3. Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette für Plasma + PBMCs (entfällt bei Verwendung von CPT™, siehe 5.)

Proben-ID
Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette für Plasma + PBMCs

4. EDTA-Monovette für Plasma + zelluläre Bestandteile (*Buffy coat*)

Proben-ID
EDTA-Monovette für Plasma + Zellen

5. CPT™ für Plasma + PBMCs (entfällt bei Verwendung von Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette, siehe 3.)

Proben-ID
CPT™ für Plasma + PBMCs

6. RNA-Blut (PAXgene®)

Proben-ID
RNA-Blut

Abnahmereihenfolge (ggf. abweichend bei notwendiger Priorisierung)

Dieses Dokument per Hauspost an die Studienassistentz senden

Entnahmeprotokoll Blut (2/2):

(wird auf der Station/in der Ambulanz ausgefüllt)

Patient*innen-ID

- Visiten-Nr.: BL (Baseline)
 SV (reguläre Studiervisite)
 CSV (Studiervisite bei Verschlechterung)
 EV (Entlassvisite)
 3M FU (Follow-Up)
 6M FU
 12M FU
 24M FU

Datum der Blutentnahme -- (DD-MM-YYYY)

Zeitpunkt der Blutentnahme (Beginn) Uhrzeit : (hh:mm)

Art der Blutentnahme venös arteriell ZVK PVK
 Gefäßpunktion und Blut ins Gefäß getropft

Wie lange war der/die Patient*in bzw. Kontrolle nüchtern vor der Blutentnahme?
 (hh)

Ernährung parenteral? ja nein

Position bei Blutentnahme sitzend liegend

Dauer der Position Patient*in bzw. Kontrolle vor Blutentnahme: (min)

Besonderheiten bei der Blutentnahme (z. B. Wärmeanwendung, Pumpen, längere Stauung, forciertes Aspirieren, Schwäche von Patient*in bzw. Kontrolle, etc.):

Dokumentation der Probenentnahme-Zeiten auf allen Bögen!

Dieses Dokument per Hauspost an die Studienassistentz senden

Probenverarbeitung Blut

ID-Übersicht für verarbeitendes Labor

(wird auf der Station/in der Ambulanz ausgefüllt)

1. Monovette für Serum

Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Kit-ID

Proben-ID
Monovette für Serum

2. Citrat-Monovette für Plasma

Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
Citrat-Monovette für Plasma

3. Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette für Plasma + PBMCs

(entfällt bei Verwendung von CPT™, siehe 5.)

Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
Heparin-Monovette oder
EDTA-Monovette für
Plasma + PBMCs

4. EDTA-Monovette für Plasma + zelluläre Bestandteile (*Buffy coat*)

Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
EDTA-Monovette für
Plasma + Zellen

5. CPT™ für Plasma + PBMCs

(entfällt bei Verwendung von Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette, siehe 3.)

Restmaterial /Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
CPT™ für Plasma + PBMCs

6. RNA-Blut (PAXgene®)

Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
RNA-Blut

**Dokument zusammen mit den vorhandenen Proben
an das verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Blut

Uhrzeit Beginn Blutentnahme: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Proben-ID
Monovette für Serum

|_| Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Probe: Monovette für Serum

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Gewinnung Überstand Serum, Aliquotierung

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Auffälligkeiten Probe: |_| Lipämisch |_| Ikterisch |_| Hämolytisch

Unvollständige Befüllung? (ca. Angabe in %): |_|_|_|

Zeitpunkt Aliquotierung:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Anzahl Aliquote Überstand (= Serum): |_|_| à 0,3 ml

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Eingefroren in:

|_| -80°C

|_| N₂ Gasphase|_| N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung BlutUhrzeit Beginn Blutentnahme: ||||| (hh:mm)Proben-ID
Citrat-Monovette für Plasma Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden**Probe: Citrat-Monovette für Plasma**

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Gewinnung Überstand Plasma, Aliquotierung

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: ||-|||-||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)Auffälligkeiten Probe: Lipämisch Ikterisch HämolytischUnvollständige Befüllung? (ca. Angabe in %):

Zeitpunkt Aliquotierung:

Datum: ||-|||-||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)Anzahl Aliquote Überstand (= Plasma): || à 0,3 ml

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: ||-|||-||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Eingefroren in:

 -80°C N₂ Gasphase N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Blut

Uhrzeit Beginn Blutentnahme: ||||| (hh:mm)

Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
Heparin oder EDTA oder
CPT™ für Plasma + PBMCs

Probe: Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette oder CPT™ für Plasma + PBMCs (1/2)

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ **Gewinnung Überstand Plasma, Aliquotierung**

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: ||-|||-||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Auffälligkeiten Probe: Lipämisch Ikterisch Hämolytisch

Unvollständige Befüllung? (ca. Angabe in %):

Zeitpunkt Aliquotierung:

Datum: ||-|||-||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Anzahl Aliquote Überstand (= Plasma): || à 0,3 ml

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: ||-|||-||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Eingefroren in:

-80°C

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

Probe: Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette oder CPT™ für Plasma + PBMCs (2/2)

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Isolierung PBMCs, Aliquotierung

Verwendete Methode:

Ficoll-Gradient Leucosep™ SepMate™ CPT™

Zeitpunkt Beginn Aufarbeitung/Zentrifugation:

Datum: -- (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: : (hh:mm)

Zeitpunkt Aliquotierung:

Datum: -- (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: : (hh:mm)

Anzahl Aliquote PBMCs: à 0,5 ml

Anzahl Zellen/ml: _____

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: -- (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: : (hh:mm)

Eingefroren in:

-80°C (Zwischenlagerung für max. 14 Tage möglich)

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Blut

Uhrzeit Beginn Blutentnahme: ||||| (hh:mm)

Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
EDTA-Monovette für
Plasma + Zellen

Probe: EDTA-Monovette für Plasma + Zellen

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Gewinnung Überstand Plasma, Aliquotierung

→ Gewinnung *Buffy coat* (Zellen nach Zentrifugation); Überführen in 2 eigene Aliquote nach Resuspension

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: ||-||-|||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Auffälligkeiten Probe: Lipämisch Ikterisch Hämolytisch

Unvollständige Befüllung? (ca. Angabe in %):

Zeitpunkt Aliquotierung:

Datum: ||-||-|||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Anzahl Aliquote Überstand (= Plasma): || à 0,3 ml

Anzahl Aliquote *Buffy coat*: || à 0,5 ml

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: ||-||-|||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Eingefroren in:

-80°C

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Blut**Uhrzeit Beginn Blutentnahme:** |_|_|:|_|_| (hh:mm)

|_| Restmaterial/Rückstellprobe vorhanden

Proben-ID
RNA-Blut**Probe: RNA-Blut**

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Einfrieren des Röhrchens ohne Verarbeitung

Unvollständige Befüllung? (ca. Angabe in %): |____|

Zeitpunkt Einfrieren -20°C:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Zeitpunkt Einfrieren -80°C:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Entnahmeprotokoll Bioprobe (1/4) (außer Blut)

(wird auf der Station/in der Ambulanz ausgefüllt)

**Pro Probe/Material 3 Etiketten derselben
Proben-ID verwenden!**

1. Etikett: Auf das Probenbehältnis kleben
2. + 3. Etikett: In vorgesehene Felder auf Probenbegleitbögen kleben

Patient*innen-ID

Kit-ID

Identifikation der Proben:

**1. Oropharyngealabstrich oder
Nasopharyngealabstrich**

Proben-ID
Oropharyngealabstrich oder
Nasopharyngealabstrich

2. Wangenabstrich

Proben-ID
Wangenabstrich

3. Speichel

Proben-ID
Speichel

4. Urin

- Anurie (wenn kein Urin verfügbar)

Proben-ID
Urin

5. Haare

Proben-ID
Haare

Dieses Dokument per Hauspost an die Studienassistentz senden

Entnahmeprotokoll Bioprobe (2/4) (außer Blut)

(wird auf der Station/in der Ambulanz ausgefüllt)

**Pro Probe/Material 3 Etiketten derselben
Proben-ID verwenden!**

1. Etikett: Auf das Probenbehältnis kleben
2. + 3. Etikett: In vorgesehene Felder auf Probenbegleitbögen kleben

Patient*innen-ID

Kit-ID

Identifikation der Proben:

6. Stuhl

Proben-ID
Stuhl

7. Liquor

Proben-ID
Liquor

**8. Sofern Intensivpatient*in, statt 1.:
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)
oder Trachealsekret (ENTA)**

Proben-ID
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)
oder Trachealsekret (ENTA)

Dieses Dokument per Hauspost an die Studienassistentz senden

Entnahmeprotokoll Bioprobe (3/4) (außer Blut)

(wird auf der Station / in der Ambulanz ausgefüllt)

Patient*innen-ID

Datum der Probenahme (Bioprobe je nach Auswahl)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Oropharyngealabstrich)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Nasopharyngealabstrich)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Wangenabstrich)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Speichel)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Urin)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Haare)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Stuhl)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Liquor)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Bronchoalveoläre Lavage)

|-|-|-|-|-|-|-|-|-|-| (DD-MM-YYYY) (Trachealsekret)

Uhrzeit der Probenahme (Bioprobe je nach Auswahl)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Oropharyngealabstrich)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Nasopharyngealabstrich)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Wangenabstrich)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Speichel)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Urin)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Haare)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Stuhl)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Liquor)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Bronchoalveoläre Lavage)

|-|-|:|-|-| (hh:mm) (Trachealsekret)

Dieses Dokument per Hauspost an die Studienassistentz senden

Entnahmeprotokoll Bioprobe (4/4) (außer Blut)

(wird auf der Station / in der Ambulanz ausgefüllt)

Patient*innen-ID

Nur relevant bei Uringewinnung:

Blutbeimengungen	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Menstruationsblutung	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Trübungen	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

Art der Uringewinnung:

Urinbeutel Töpfchen Mittelstrahlurin Katheter Clean-Catch

Nur relevant bei Stuhlgewinnung:

Stuhlentnahme aus:

Windel Töpfchen Stuhlfänger WC

Sonstiges, bitte spezifizieren: _____

Wurde ein Abführmittel verwendet? ja nein

Durchfall zum Zeitpunkt der Abnahme (> 3x Stuhlgang/Tag)? ja nein

Obstipation zum Zeitpunkt der Abnahme (< 3x Stuhlgang/Woche)? ja nein

Stuhlfarbe:

braun schwarz grau gelb grün rötlich

Sonstiges, bitte spezifizieren: _____

Nur relevant bei Liquorgewinnung:

Position bei Liquorentnahme sitzend liegend

Patient*in bzw. Kontrolle sediert? ja nein

Dokumentation der Probenentnahme-Zeiten auf allen Bögen!

Dieses Dokument per Hauspost an die Studienassistentz senden

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):Uhrzeit Probengewinnung: ||||| (hh:mm)Proben-ID
Oropharyngealabstrich oder
Nasopharyngealabstrich

Kit-ID

Probe: Oropharyngealabstrich oder Nasopharyngealabstrich

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Oro- oder Nasopharyngealabstrich: Einfrieren ohne Verarbeitung

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: ||-||-||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Eingefroren in:

 -80°C N₂ Gasphase N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):Uhrzeit Probengewinnung: ||||| (hh:mm)Proben-ID
Wangenabstrich

Kit-ID

Probe: Wangenabstrich

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Wangenabstrich: Einfrieren ohne Verarbeitung

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: ||-||-||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Eingefroren in:

 -80°C N₂ Gasphase N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):**Uhrzeit Probengewinnung:** ||||| (hh:mm)Proben-ID
Speichel

Kit-ID

Probe: Speichel

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Speichel: Einfrieren ohne Verarbeitung

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: ||-|||-|||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Eingefroren in:

 -80°C N₂ Gasphase N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):**Uhrzeit Probengewinnung:** |_|_|:|_|_| (hh:mm)Proben-ID
Urin

Kit-ID

Probe: Urin

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ **Gewinnung Überstand, Aliquotierung**→ **Lagerung Sediment in eigenen Aliquoten nach Resuspension**

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Zeitpunkt Aliquotierung:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Anzahl Aliquote Überstand: |_|_| à 0,5 ml

Anzahl Aliquote Sediment: |_|_| à 0,5 ml

Zeitpunkt Einfrieren (Überstand/Sediment):

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Eingefroren in:

 -80°C N₂ Gasphase N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):**Uhrzeit Probengewinnung:** |_|_|_|:|_|_|_| (hh:mm)Proben-ID
Haare

Kit-ID

Probe: Haare

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Haare: Lichtgeschützte Lagerung ohne Verarbeitung

Zeitpunkt Einlagerung mit Lichtschutz bei RT:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|_|:|_|_|_| (hh:mm)

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):**Uhrzeit Probengewinnung:** |_|_|:|_|_| (hh:mm)Proben-ID
Stuhl

Kit-ID

Probe: Stuhl

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Stuhl: Einfrieren ohne Verarbeitung

Zeitpunkt Einfrieren

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):

Uhrzeit Probengewinnung: ||||| (hh:mm)

Proben-ID
Liquor

Kit-ID

Probe: Liquor (1/2)

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ **Liquor: Gewinnung Überstand, Aliquotierung**

Farbe des Ausgangsmaterials:

farblos/klar weißliche Trübung gelblich rötlich

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: ||-||-||||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Zeitpunkt Aliquotierung Überstand:

Datum: ||-||-||||||| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Anzahl Aliquote Überstand: || à 0,5 ml

Eingefroren in:

- 80°C
- N₂ Gasphase
- N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

Probe: Liquor (2/2)

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Lagerung Liquorzellen (Sediment) in eigenen Aliquoten nach Resuspension

Zeitpunkt Aliquotierung Liquorzellen:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Anzahl Aliquote Liquorzellen: |_|_| à 0,5 ml

Anzahl Zellen/ml: _____

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Eingefroren in:

-80°C (Zwischenlagerung für max. 14 Tage möglich)

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):Uhrzeit Probengewinnung: ||||| (hh:mm)Proben-ID
Bronchoalveoläre Lavage
(BAL)

Kit-ID

Probe: Bronchoalveoläre Lavage (BAL) (1/2)

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Gewinnung Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF), Aliquotierung

→ Gewinnung BAL-Zellen, Aliquotierung

Spülvolumen BAL (ml): _____

Besonderheiten beim Ausgangsmaterial:

 Flockig Eitrig Schleimig Blutig Trüb Schaumig

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: ||-||-|||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

Zeitpunkt Aliquotierung:

Datum: ||-||-|||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)Erythrozytenlyse durchgeführt? ja nein Anzahl Aliquote Überstand (= BALF): || à 1,6 mlAnzahl Aliquote BAL-Zellen: || à 0,3 ml

Anzahl Zellen/ml: _____

Probe: Bronchoalveoläre Lavage (BAL) (2/2)

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

Zeitpunkt Einfrieren BALF:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Eingefroren in:

-80°C

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Zeitpunkt Einfrieren BAL-Zellen:

Datum: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: |_|_|:|_|_| (hh:mm)

Eingefroren in:

-80°C

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):Uhrzeit Probengewinnung: ||||| (hh:mm)Proben-ID
Trachealsekret (ENTA)

Kit-ID

Probe: Trachealsekret (ENTA)

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Gewinnung Trachealsekret, Aliquotierung

Besonderheiten beim Ausgangsmaterial:

Anzahl Aliquote: || à 1,6 ml

Zeitpunkt Einfrieren:

Datum: ||-||-|||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)

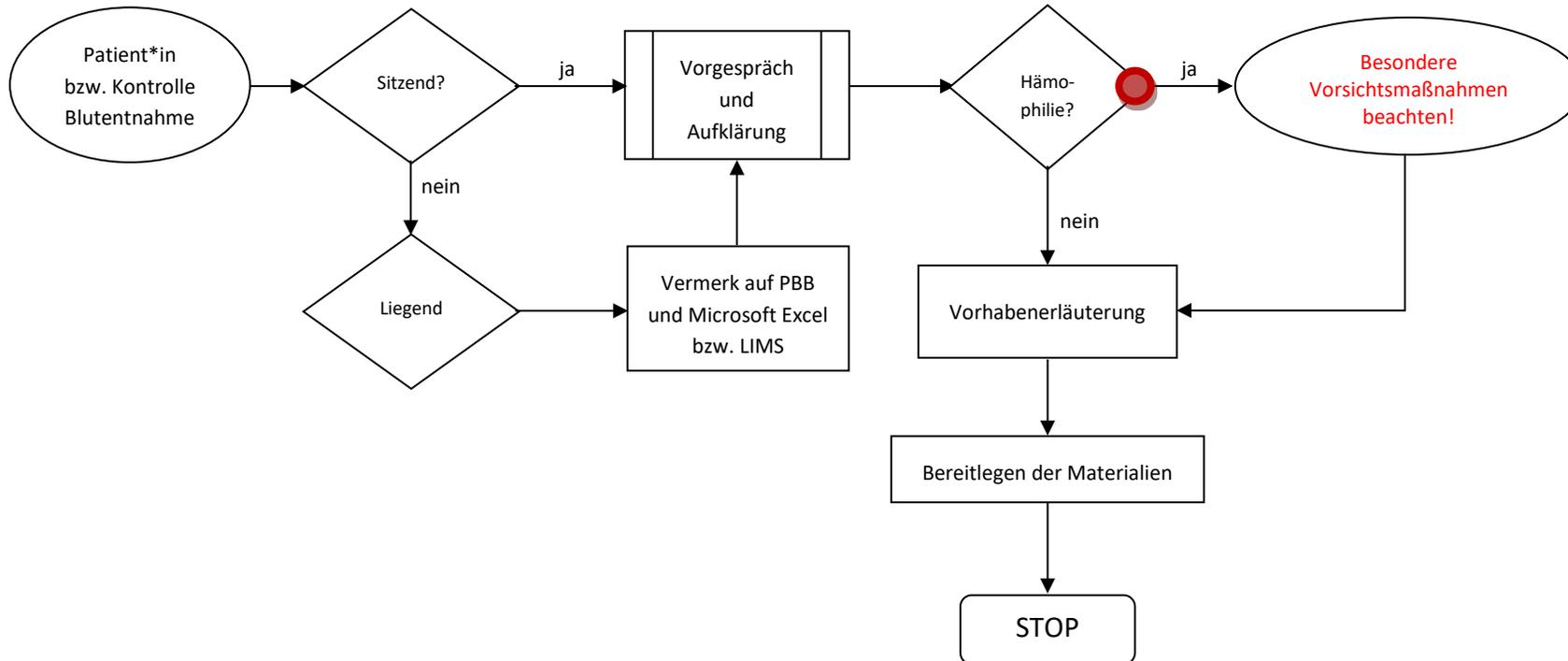
Eingefroren in:

 -80°C N₂ Gasphase N₂ Flüssigphase

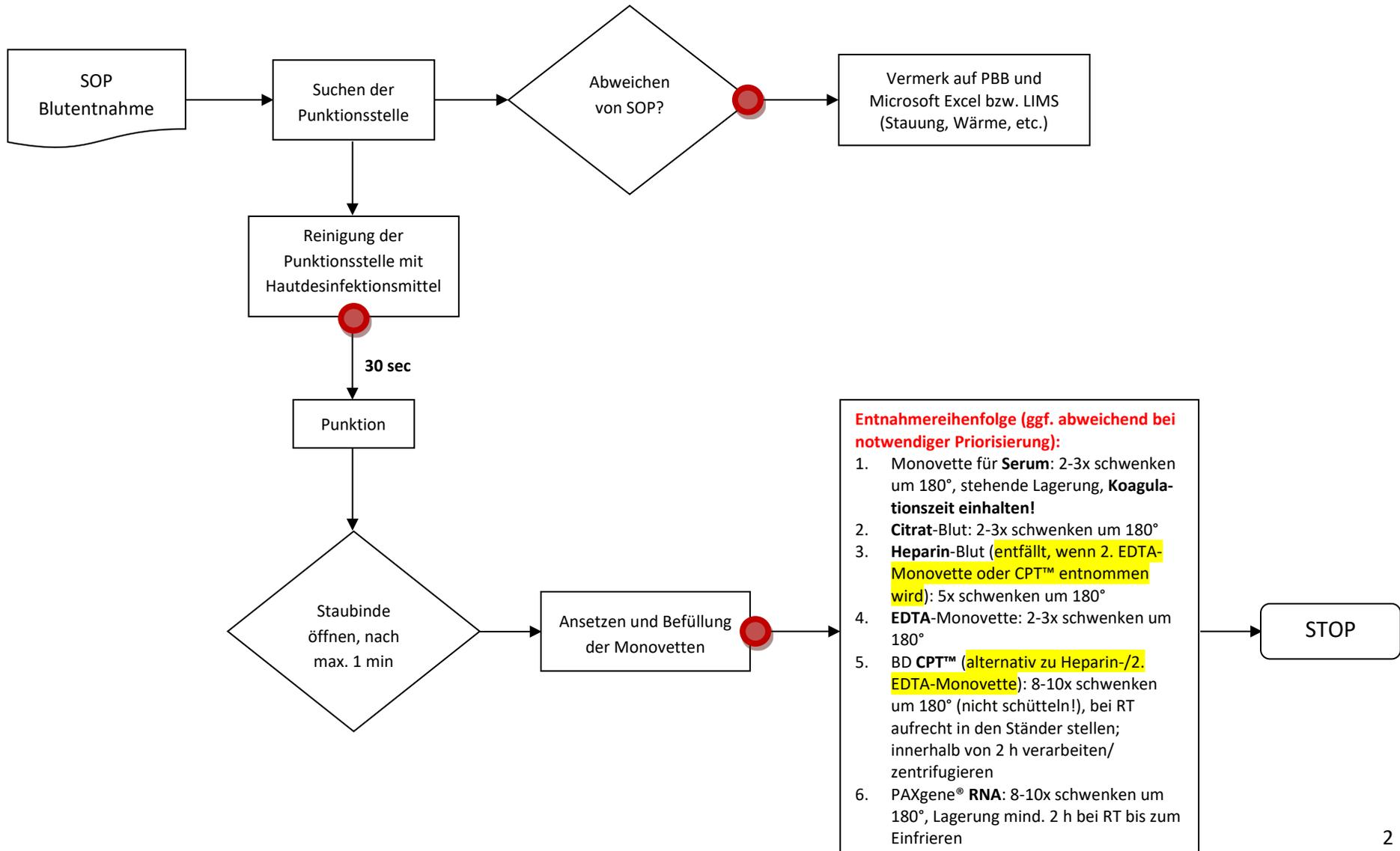
Bemerkungen (Freitext):

**Dokument zusammen mit der Probe an das
verarbeitende Labor schicken!**

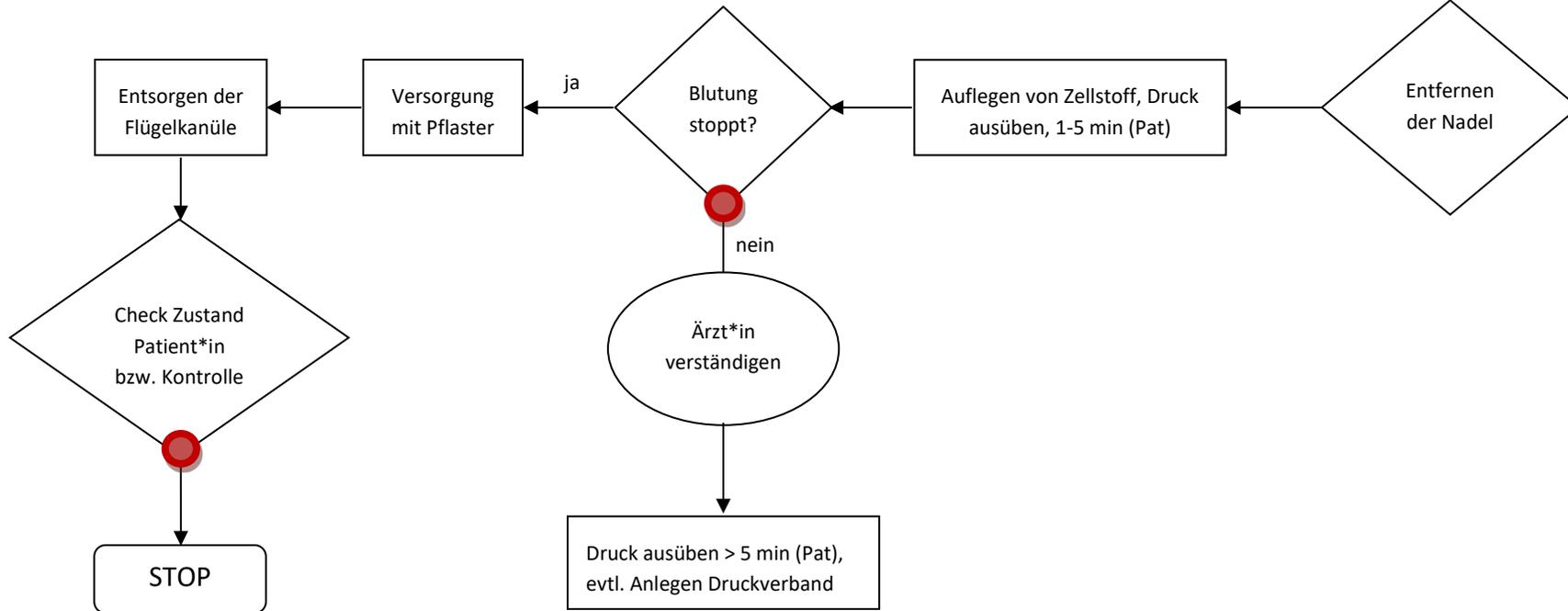
Flow Chart zur Blutentnahme: Vorbereitung



Flow Chart zur Blutentnahme

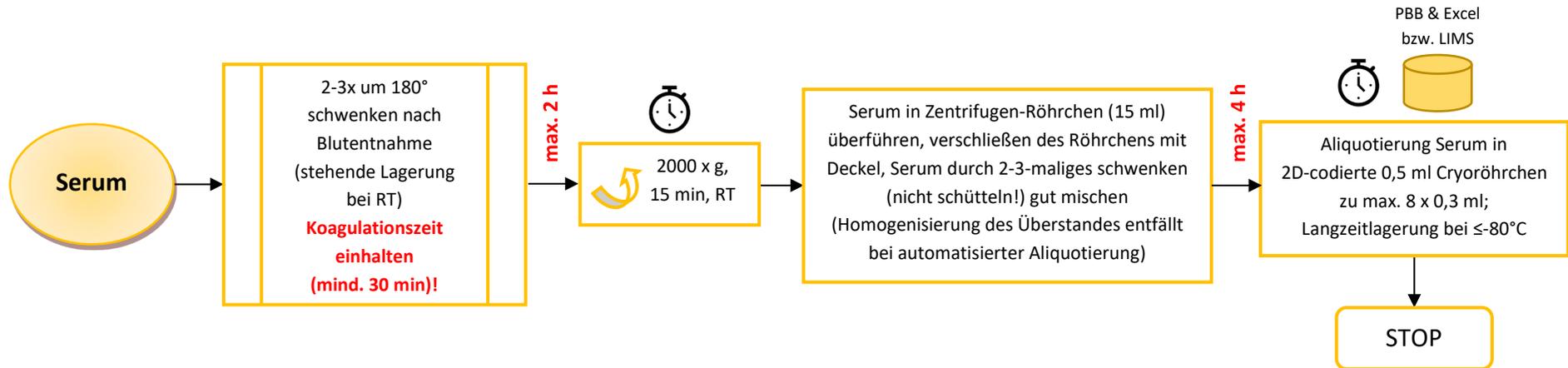


Flow Chart zur Blutentnahme Fortsetzung



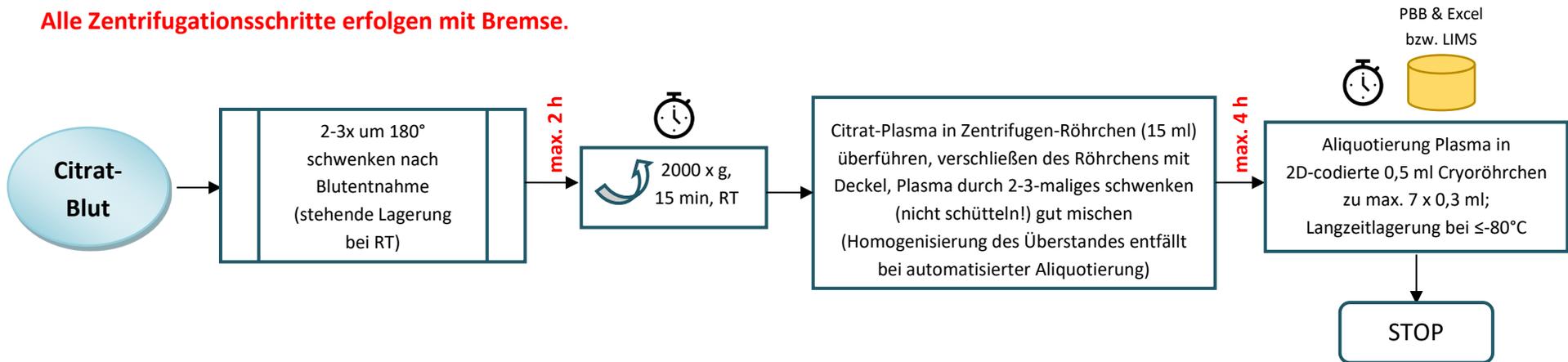
Flow Chart zur Blutverarbeitung Serum

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



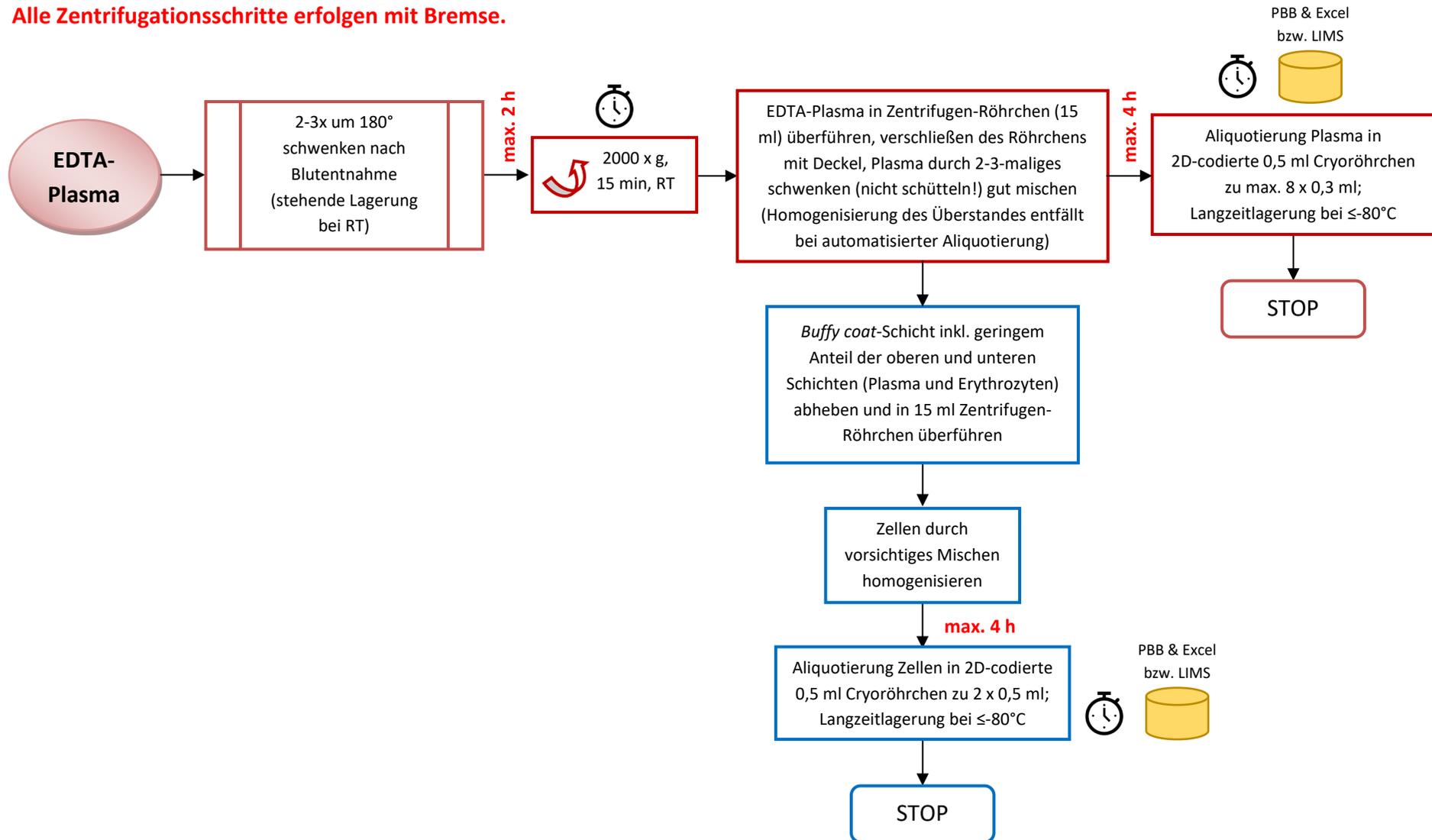
Flow Chart zur Blutverarbeitung Citrat-Plasma

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



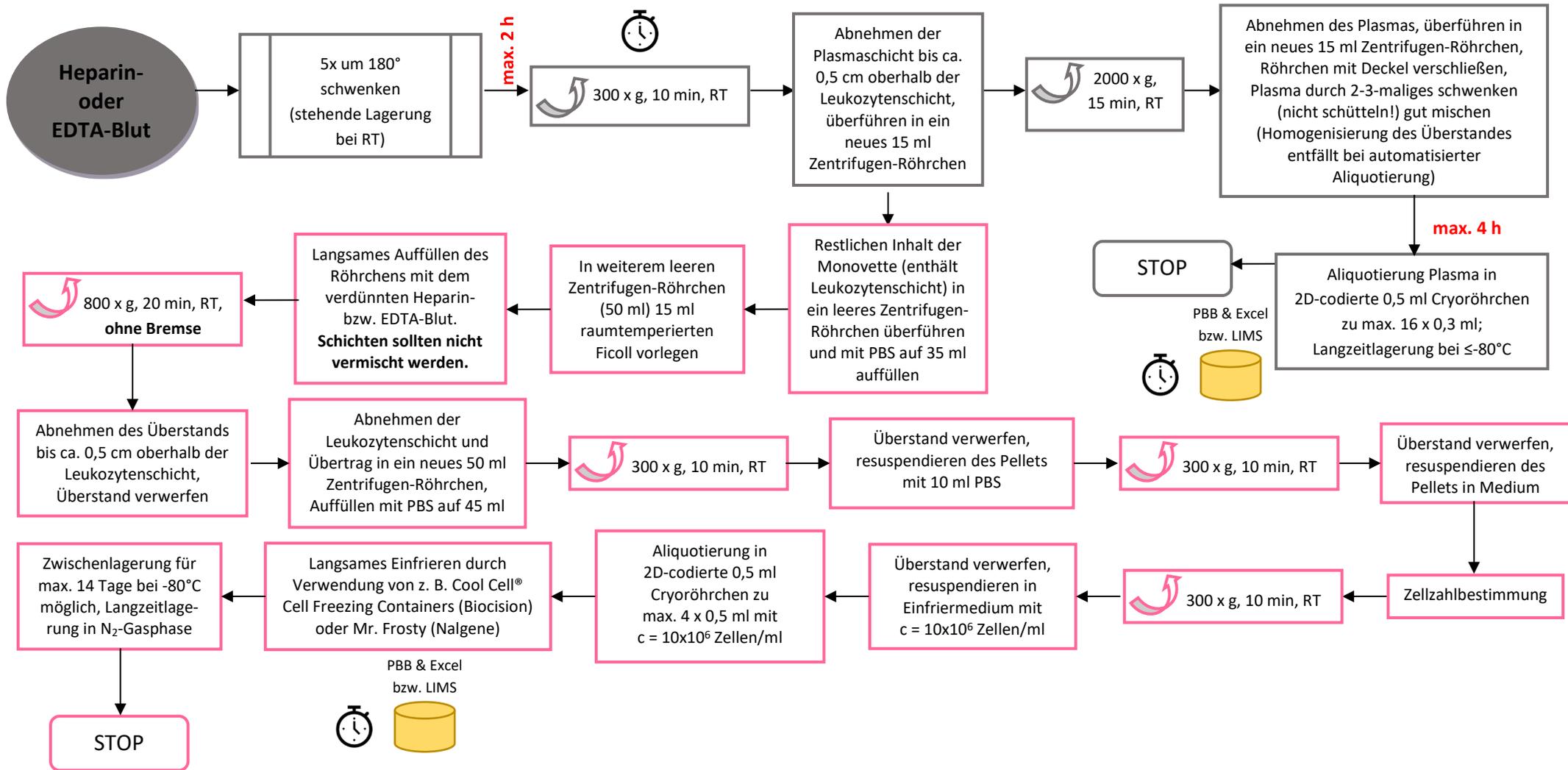
Flow Chart zur Blutverarbeitung EDTA-Plasma

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

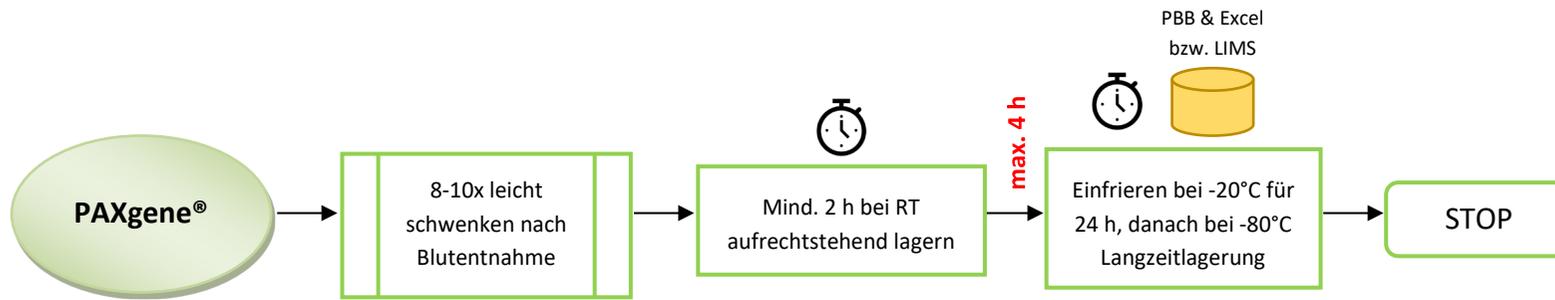


Flow Chart zur Probenverarbeitung von Heparin- oder EDTA-Blut zu Plasma und PBMCs

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse, sofern nicht anders angegeben.

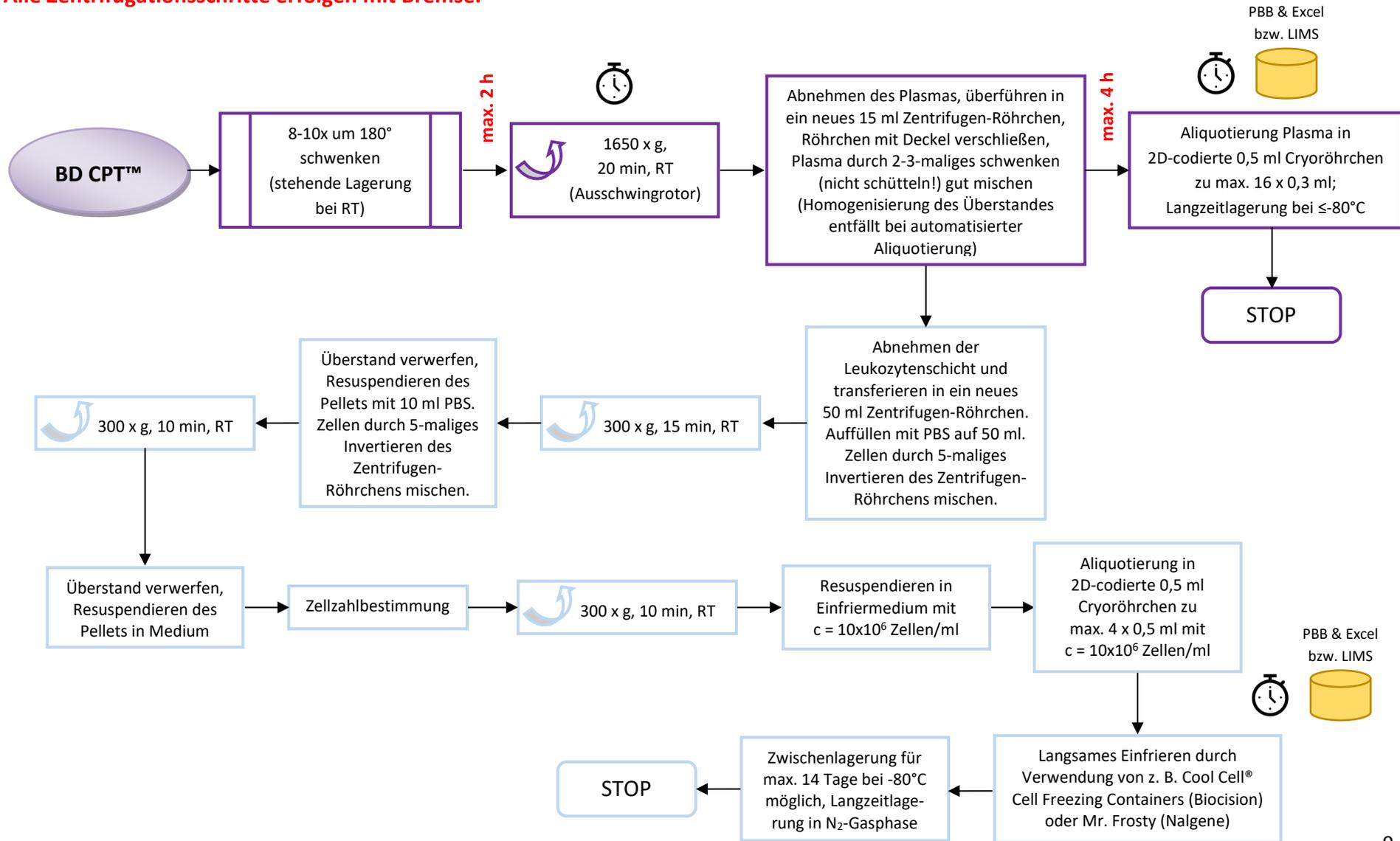


Flow Chart zur Probenverarbeitung RNA-Röhrchen PAXgene®

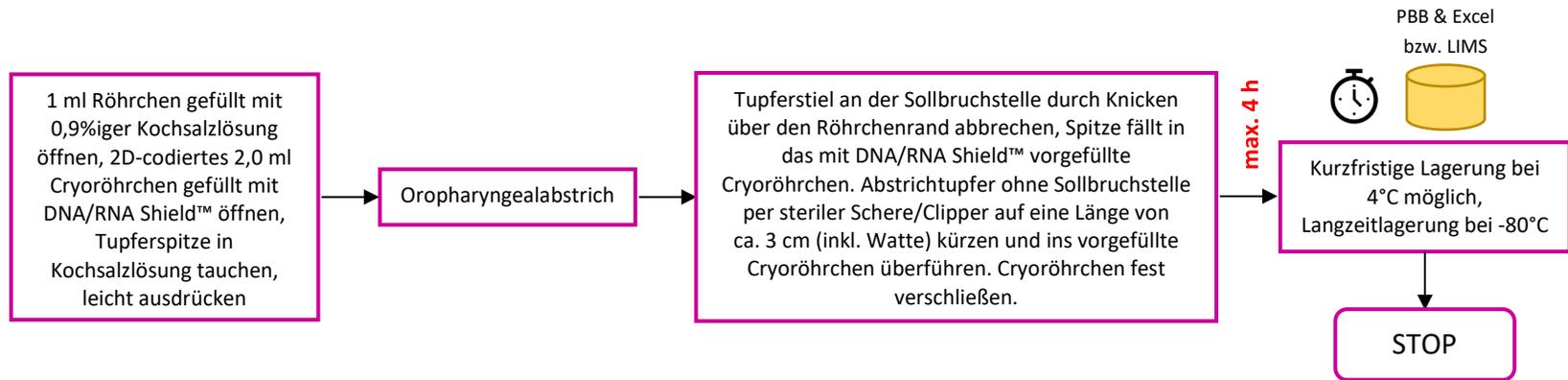


Flow Chart zur Probenverarbeitung von BD-CPT™ zu Plasma und PBMCs

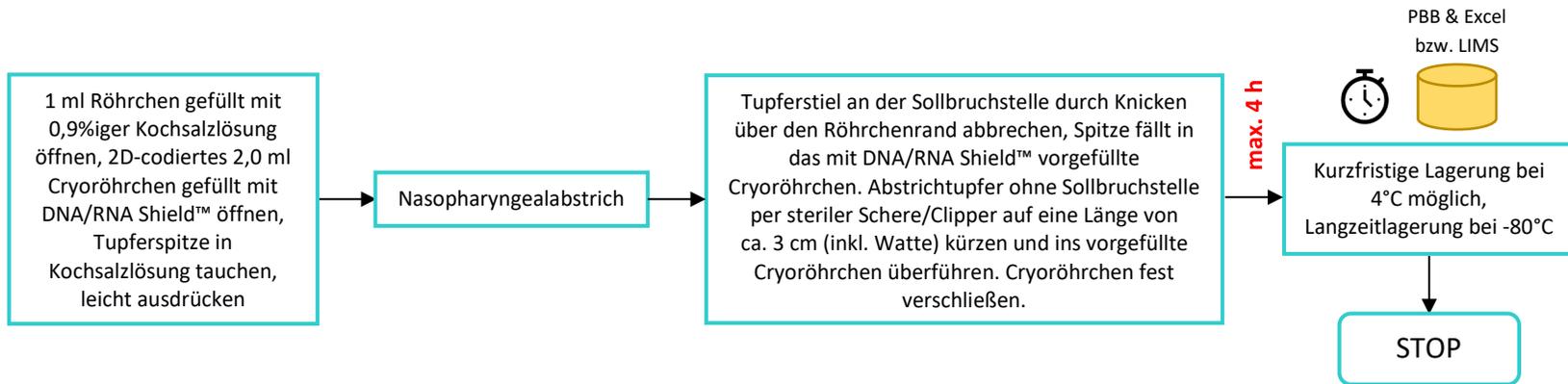
Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



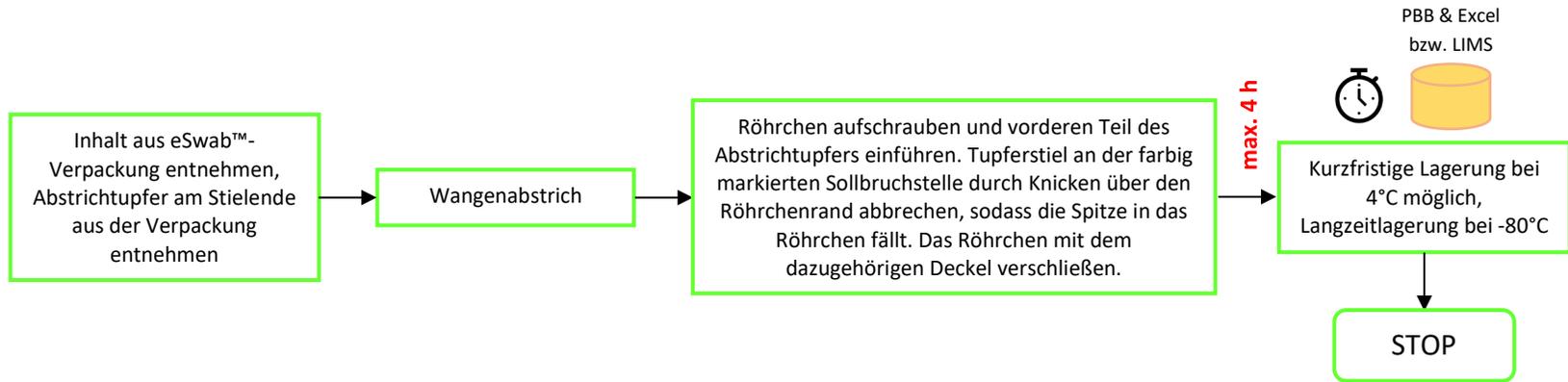
Flow Chart zur Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs



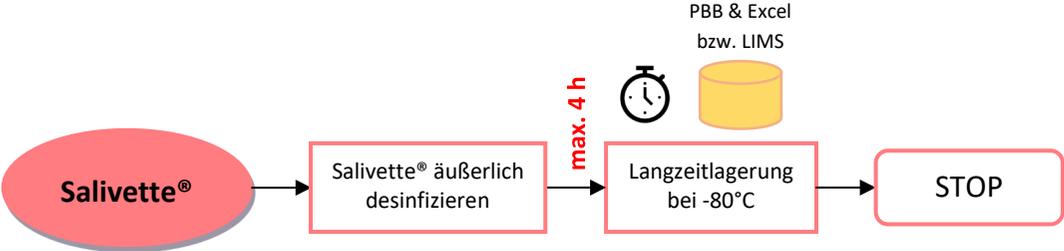
Flow Chart zur Gewinnung eines Nasopharyngealabstrichs



Flow Chart zur Gewinnung eines Wangenabstrichs



Flow Chart zur Probenverarbeitung von Speichel

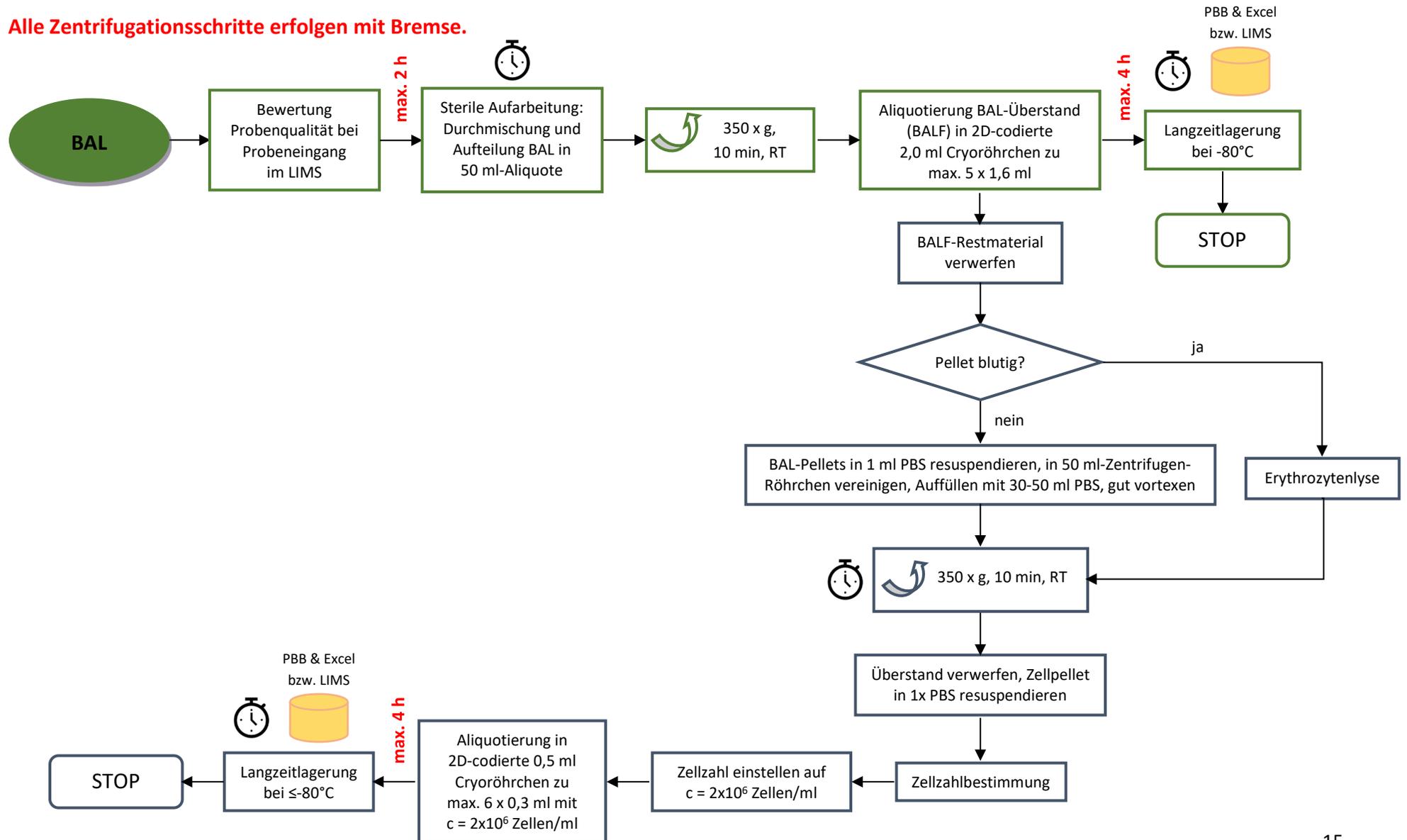


Flow Chart zur Probenverarbeitung von Trachealsekret (ENTA)



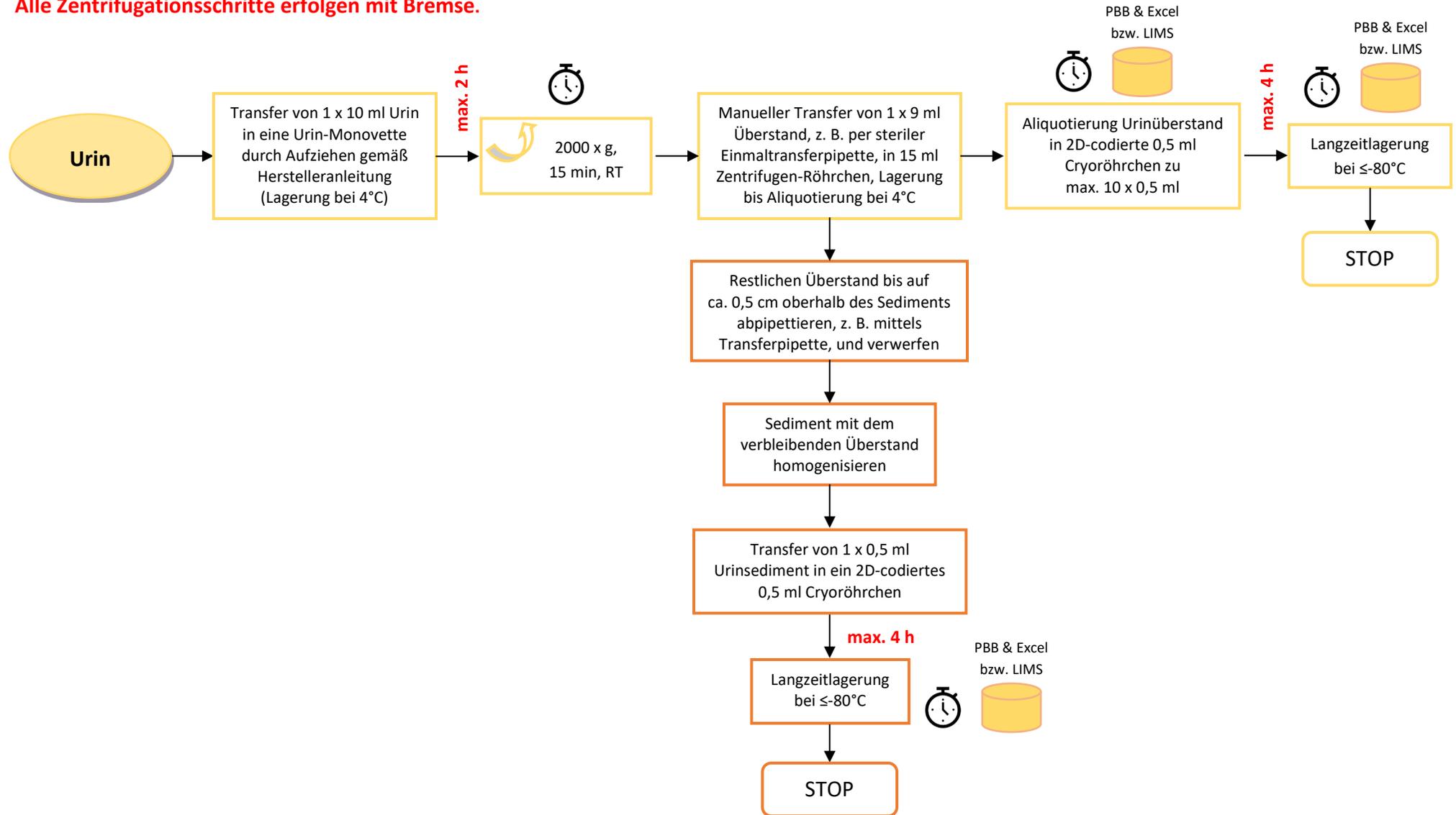
Flow Chart zur Probenverarbeitung von Bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

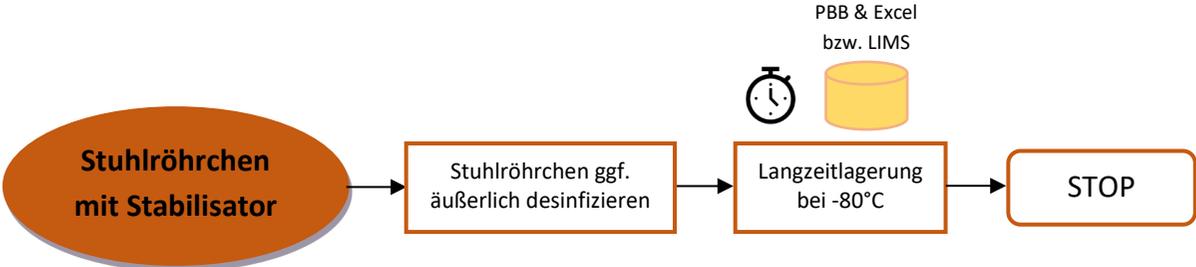


Flow Chart zur Urinverarbeitung

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

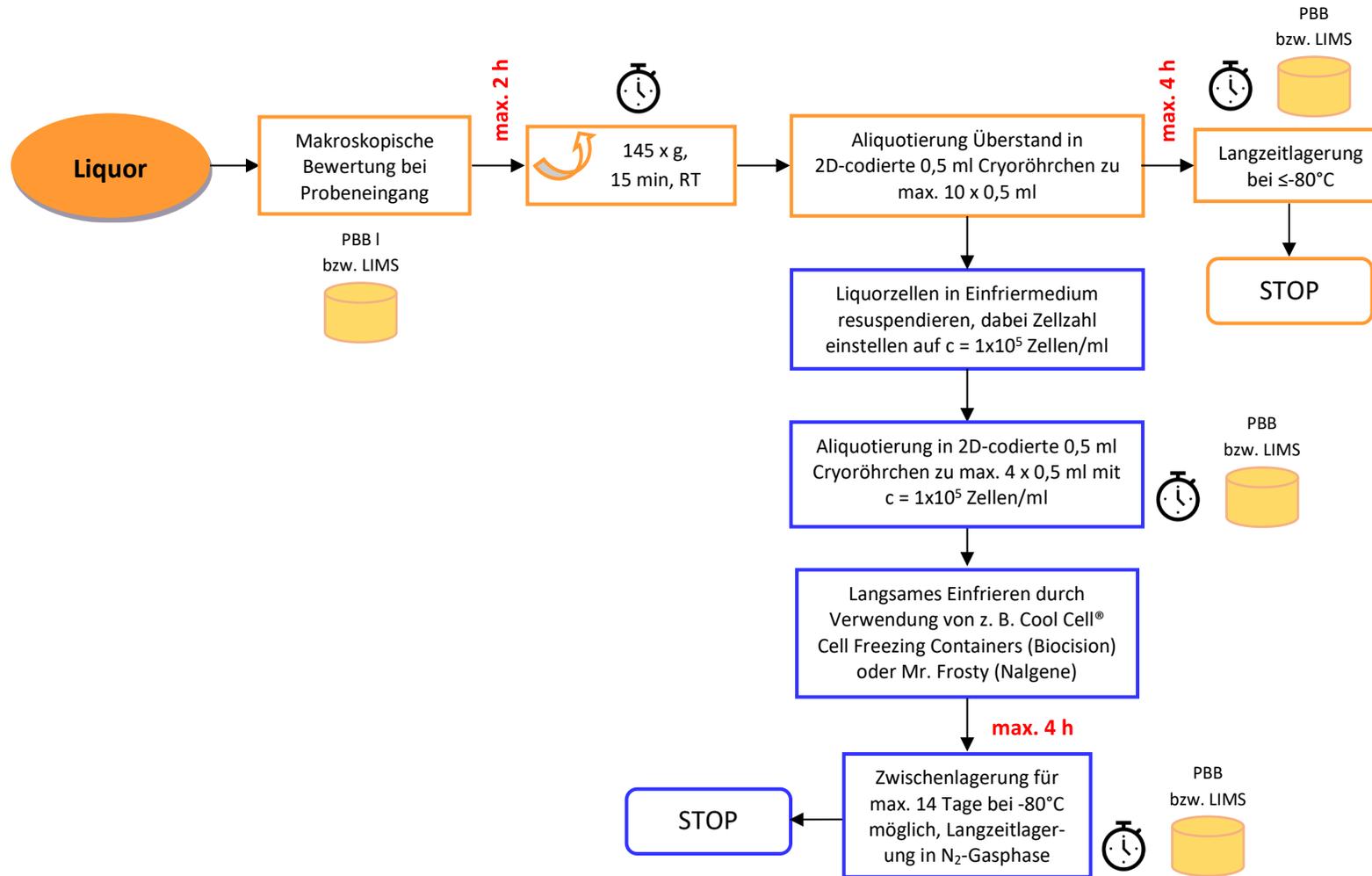


Flow Chart zur Probenverarbeitung von Stuhl



Flow Chart zur Probenverarbeitung von Liquor

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



Flow Chart zur Probenverarbeitung von Haaren

