

SOP-Manual

NAPKON **Nationales Pandemie Kohorten Netz**

Bioprobensammlung für die NAPKON-Studie

Gültigkeit ab:	Freigabe		
Version:	4.0		
Ersetzte Version:	3.0 mit Freigabe vom 16.04.2022		
Änderungshinweis:	<p>Gesamtes SOP-Manual: Anpassung Versionierung, Inhaltsangabe. S. 2: Ergänzung des Erstellers, Änderung des Prüfers. S. 7: Ergänzung der Tabelle 3 um Liquor-Bioproben S. 77ff: Erstellung Liquor SOP S. 82: Aktualisierung der Links [1], [9] PBB 1S und 2S, PBB 8S und 8S: Erstellung PBB Liquor Flow Charts S. 16: Erstellung Flow Chart zur Probenverarbeitung von Liquor</p>		
Verteiler:	Teilnehmende Studienzentren der NAPKON-Studie		
Erstellt von: Dr. Maike Tauchert	Angepasst von: Inga Bernemann	Geprüft von: Dr. Andrea Kühn-Steven Dr. Bärbel Fösel	Freigegeben von: Dr. Gabriele Anton Prof. Dr. Thomas Illig
Datum: 07.09.2020	Datum: 02.05.2022	Datum: 03.05.2022	Datum: 24.08.2022
Koordination NAPKON Bioprobenkern:	Prof. Dr. Thomas Illig Hannover Unified Biobank (HUB) Medizinische Hochschule Hannover (MHH) Feodor-Lynen-Straße 15 30625 Hannover		
Kontakt für Support:	napkon_bioproben@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	8
5.	Vorbereitung Entnahme-Kits NAPKON-Studie.....	10
6.	Standardarbeitsanweisungen (SOPs).....	14
7.	Abbildungsverzeichnis.....	83
8.	Anlagen.....	85

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 SARS-CoV-2 infizierten Patient*innen und entsprechenden Kontrollen im Rahmen der NAPKON-Studie.

3. ÜBERSICHT BIOPROBENSAMMLUNG

Entnahme von Bioproben + Dokumentation von assoziierten Daten im Labor-Informations-Management-System (LIMS)

Hinweis zur Ethik: Jegliche Entnahme von Bioproben im Rahmen der NAPKON-Studie ist nur zulässig sofern eine unterschriebene Patient*innen-Einwilligung hierfür vorliegt.

a) Blut

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 Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)
Citrat-Blut Auf vollständige Befüllung achten!	4,3 ml	Zentrifugation Gewinnung von Plasma	<ul style="list-style-type: none"> Plasma: max. 7 x 0,3 ml 	
Heparin-Blut Alternativ: 2. Röhrchen EDTA-Blut 9 ml oder BD CPT™-Heparin 8 ml	9 ml ^A	Isolierung von PBMCs, Gewinnung von Plasma (nur bei Heparin- oder EDTA-Blut)	<ul style="list-style-type: none"> Plasma: max. 16 x 0,3 ml (nur bei Heparin- oder EDTA-Blut) PBMCs isolieren und Zellzahl einstellen auf 10x10⁶ Zellen/ml → Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 4 x 0,5 ml 	
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 Auf vollständige Befüllung achten!	2,5 ml	Keine	<ul style="list-style-type: none"> Direktes Einfrieren der Röhrchen nach Lagerung von mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) 	

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

△ 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.

b) Sonstige Bioproben

Probenart	Volumen	Verarbeitung	Aliquotierung/Lagerung bei -80°C bzw. in Stickstoff in 2D-codierten Cryoröhrchen	Sicherheitshinweise (s. auch Kapitel 4)
Oropharyngealabstrich oder Nasopharyngealabstrich [°] oder Speichel (s. unten) [bei Intensivpatient*innen 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 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)	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)	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

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)
Liquor ^π	10 ml	Zentrifugation Gewinnung von <ul style="list-style-type: none"> • Überstand • Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Überstand: max. 20 x 0,5 ml • Liquorzellen: Zellzahl einstellen auf 1x10⁵ Zellen/ml → Aliquotanzahl variiert je nach Zellzahl; max. 4 x 0,5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Klasse 2 empfohlen • Aerosolbildung vermeiden (z. B. bei Zentrifugation)

[°] wird max. 1x pro Woche abgenommen

^π Abnahme nur bei Patient*innen und Kontrollen ab 18 Jahren im Rahmen medizinisch indizierter Lumbalpunktionen oder nach separater Aufklärung für wissenschaftliche Untersuchungen.

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>

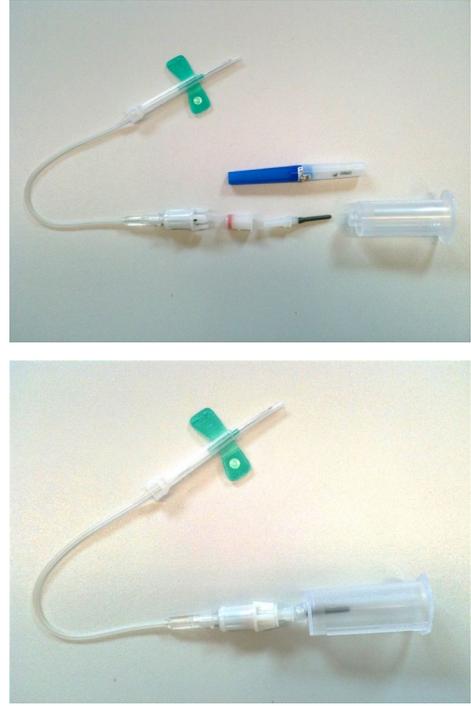
5. VORBEREITUNG ENTNAHME-KITS NAPKON-STUDIE

Sofern am jeweiligen Standort Entnahme-Kits für die NAPKON-Studie vorab zusammengestellt werden sollen, kann dies anhand folgender Übersicht erfolgen.

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.

a) Zusammenstellen der benötigten Verbrauchsmaterialien (ausführliche Informationen siehe aktuelle Version der Bestellübersicht)

Verbrauchsmaterial	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
Folientüte für alle benötigten Verbrauchsmaterialien und ggf. Unterlagen	Beschriften: „NAPKON-Studie“ (ggf. Ergänzung der jeweiligen Plattform)
1x Serum-Monovette 4,9 ml (Verschluss weiß, EU Farbcode; Bestellnr. 04.1934, Sarstedt)	 Bildquelle: [1]
1x Citrat-Monovette 4,3 ml (Verschluss grün, EU Farbcode; Bestellnr. 04.1922, Sarstedt)	 Bildquelle: [2]
1x Heparin-Monovette 9 ml (Verschluss orange, EU Farbcode; Bestellnr. 02.1065, Sarstedt) ^Δ Hinweis: Sollten für die Aufreinigung der PBMCs andere Röhrchen verwendet werden (z. B. EDTA-Monovette 9 ml, CPT™ 8 ml, s. unten), entfällt diese Monovette!	 Bildquelle: [3]
^Δ Empfehlung: Entnahme von zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs (zusätzliche Blutmenge muss über lokales Ethikvotum abgedeckt sein!) 1x EDTA-Monovette 4,9 ml (Verschluss rot, EU Farbcode; Bestellnr. 04.1931, Sarstedt)	 Bildquelle: [4]
1x BD Vacutainer™ CPT™ Preparation Tubes with Sodium Heparin 8 ml (Bestellnr. 362780, Becton Dickinson) ^Δ Hinweis: Sollten für die Aufreinigung der PBMCs andere Röhrchen verwendet werden (z. B. Heparin- oder EDTA-Monovette 9 ml, s. oben), entfällt dieses Röhrchen!	 Bildquelle: [5]

Verbrauchsmaterial	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
<p>^Δ Empfehlung: Entnahme von zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs (zusätzliche Blutmenge muss über lokales Ethikvotum abgedeckt sein!)</p>	
<p>1x BD PAXgene®-Röhrchen 2,5 ml (Bestellnr. 762165, Becton Dickinson)</p>	 <p>Bildquelle: [6]</p>
<p>1x Luer-Adapter[§] (Bestellnr. 367300, Becton Dickinson)</p>	 <p>Bildquelle: [7]</p>
<p>1x Membran-Adapter[§] (Bestellnr. 14.1112, Sarstedt)</p>	 <p>Bildquelle: [8]</p>
<p>1x Vacutainer Einmalhalter[§] (Bestellnr. 364815, Becton Dickinson)</p>	 <p>Bildquelle: [9]</p>
<p>Luer-Adapter + Membran-Adapter + Vacutainer Einmalhalter[§]</p> <p>[§] sofern Monovetten (Sarstedt) zur Blutentnahme verwendet werden, sind die Adapter für BD-Röhrchen (PAXgene®, CPT™) zu verwenden</p>	 <p>Bildquelle: [10]</p>
<p>Blutkultur-Adapter LongNeck mit montiertem Membran-Adapter (Bestellnr. 14.1207, Sarstedt); alternativ zulässig zur Kombination aus Luer-Adapter + Membran-Adapter + Vacutainer Einmalhalter</p>	 <p>Bildquelle: [11]</p>

Verbrauchsmaterial	Hinweis/Abbildung (kann abweichen!)
1x Urin-Monovette 10 ml (Bestellnr. 10.252, Sarstedt)	 Bildquelle: [12]
1x Urinbecher (Bestellnr. 75.562.105, Sarstedt)	 Bildquelle: [13]
Salivette® (entfällt bei Entnahme eines Oro- oder Nasopharyngealabstrichs) (Bestellnr. 51.1534, Sarstedt)	 Bildquelle: [14]
Sterile Nylon-Flockfaser Abstrichtupfer in Blistern ohne Medium für Oro- oder Nasopharyngealabstrich (Bestellnr. 502CS01, Hain Lifescience)	 Bildquelle: [15]
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
Für Intensivpatient*innen zusätzlich: 15 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt mit 6 ml DNA/RNA Shield™ (entfällt bei Entnahme von Bronchoalveolärer Lavage)	Für Gewinnung von Trachealsekret

b) 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 9 ml-/CPT™-Röhrchen mit Etikett „Heparin für PBMC“/„EDTA für PBMC“/„CPT für PBMC“^Δ
- 1x EDTA-Röhrchen 4,9 ml 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“ (entfällt bei Entnahme eines Oro- oder Nasopharyngealabstrichs)

^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.

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)

c) Sofern aus z. B. technischen Gründen 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 der NAPKON-Studie erforderlichen SOPs aufgeführt:

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



NAPKON-SOP-01: Blutentnahme und -verarbeitung

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

S. 20: Ergänzung Empfehlung zur Entnahme von zwei Röhrchen Blut zur Isolierung von PBMCs
S. 21: Anpassung Hinweis Arterielle Blutentnahme
S. 22: Ergänzung Begründung für vollständige Befüllung der Entnahmeröhrchen und Hinweis auf Alternative Blutkultur-Adapter LongNeck
S. 22, 37: Anpassung Häufigkeit Schwenken an Herstellerangaben
S. 24ff., 30, 34, Flow Charts S. 4-7: Ergänzung Hinweis „(Homogenisierung des Überstandes entfällt bei automatisierter Aliquotierung)“
S. 25f., 30, 34, Flow Charts S. 4-7: Ergänzung Hinweis „(nicht schütteln!)“
S. 27: Ergänzung „der Zellen“ beim kontrollierten Einfrieren, Ergänzung Vorgehen Bestimmung der Zellzahl
S. 29, 33, 37: Ergänzung alternative Einfriermedien, Korrektur Artikelnummer Trypan Blue, Ersatzprodukt FCS
S. 29, 33, 37, Flow Charts S. 5-7: Ergänzung Lagerung: stehend
S. 31, 35, 39: Ergänzung „Zellen“, „pro Aliquot“ gestrichen
S. 31, 36, 39: Ergänzung Angabe Minimalvolumen pro Aliquot und Vorgehen bei geringem Gesamtvolumen bzw. Gesamtausbeute
S. 32, 36, 39: Ergänzung „Schnellstmöglich mit dem Einfrierprozess beginnen.“, Ergänzung „kontrolliertes“
S. 37: Ergänzung Hinweis Ausschwingrotor, Anpassung Entnahme von Plasma an Herstellerangaben
S. 38: Ergänzung Invertieren, Anpassung Zentrifugationsdauer und Ergänzung Vergleichswert durchschnittliche Ausbeute laut Hersteller
Aktualisierung Anlage A1 Handbuch CPT™
PBB 2B: Ergänzung Abfrage Art der Blutentnahme – separate Abfrage ZVK hier inkludiert
Flow Charts S. 2, 9: Anpassung ans aktualisierte Protokoll



Anlagen:

A1: Handbuch CPT™

A2: Handbuch Leucosep™

A3: Vorgehen Blutentnahme im Rahmen der NAPKON-Studie

A4: Herstelleranleitung SepMate™

PBB 1B-9B „Blut“

Flow Chart zur Blutentnahme: Vorbereitung

Flow Chart zur Blutentnahme

Flow Chart zur Blutverarbeitung Serum

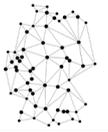
Flow Chart zur Blutverarbeitung Citrat-Plasma

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 PBMCs



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben.....	18
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen.....	18
3.	Geltungsbereich	19
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen.....	19
5.	Zuständigkeiten	19
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	20
6.1.	Benötigte Materialien	20
6.2.	Benötigte Dokumente	20
6.3.	Arbeitsanleitung.....	21
6.3.1.	Blutentnahme.....	21
6.3.2.	Anweisung zur Weiterverarbeitung der Blutproben	24
6.3.2.1.	Serum.....	24
6.3.2.2.	Citrat-Blut.....	25
6.3.2.3.	EDTA-Blut	25
6.3.2.4.	PBMC-Reinigung (Vollblut aus unterschiedlichen Röhrchentypen zulässig).....	27
6.3.2.5.	RNA-Blut (PAXgene®).....	40
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	40
8.	Anlagen.....	40

1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

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

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

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 teilnehmenden Studienzentren der NAPKON-Studie; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Lokale SOPs zur Blutentnahme

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Arzt/Studienassistenz
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar/Studienassistenz/Technische Assistenz

6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Blutentnahmeröhrchen (ggf. bereitgestellt im Entnahme-Kit)

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

^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 9 ml oder CPT™, EDTA 4,9 ml und PAXgene®)

Sofern aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Blut“ mit lokaler Patient*innen-ID und Probenidentifizierungsnummer (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!

1. Patient*innenvorbereitung

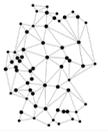
Parameter	NAPKON-Studie
Dauer von Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz (Nüchternheit)	Bitte im LIMS dokumentieren
Tageszeit der Blutentnahme	Bitte im LIMS dokumentieren
Ruhezeit in unveränderter Körperhaltung vor Blutentnahme	Falls möglich: 5-10 min Bitte im LIMS dokumentieren
Körperhaltung bei Blutentnahme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

2. Blutentnahme

Parameter	NAPKON-Studie
Dauer der Blutstauung vor Blutentnahme	Nach Möglichkeit maximal 1 Minute, öffnen sobald Nadel in Vene und Blut fließt!
Arterielle Blutentnahme	Zulässig Bitte im LIMS dokumentieren
Blutentnahme aus zentralem Venenkatheter (ZVK)	Zulässig Bitte im LIMS dokumentieren
Probenreihenfolge bei Blutentnahme	Reihenfolge: Serum → Citrat → Heparin (entfällt bei CPT™ oder 2. EDTA-Röhrchen 9 ml) → EDTA → CPT™ (entfällt bei Heparin- oder 2. EDTA-Röhrchen 9 ml) → RNA-Blut

Die Blutentnahme hat gemäß den lokalen gültigen Arbeitsanweisungen zu erfolgen. Liegt keine solche vor ist anhand von Dokument [NAPKON-SOP-01 Anlage 3](#) vorzugehen.

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!**

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. 8-10x über Kopf schwenken. Bei RT 2 h aufrechtstehend lagern bis zum Einfrieren bei -20°C und nach 24 h finale Lagerung bei -80°C.



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

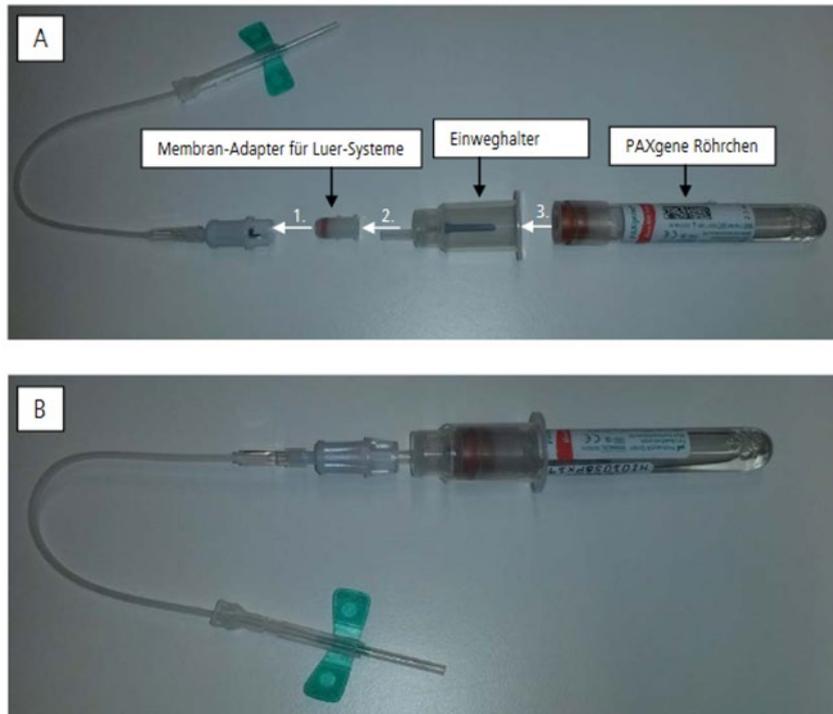


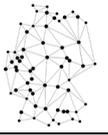
Abb. A und B:

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: [16])



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 im 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 im 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 im 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

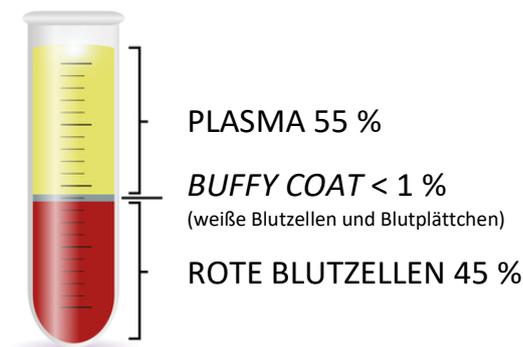


Abbildung 2: EDTA-Plasma nach Zentrifugation
(Bildquelle: [17])

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 (ca. 1-1,5 ml) 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 im 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 A4](#) 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 die zusätzliche Generierung von Plasma-Aliquoten.

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):

- 9 ml 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 im 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**

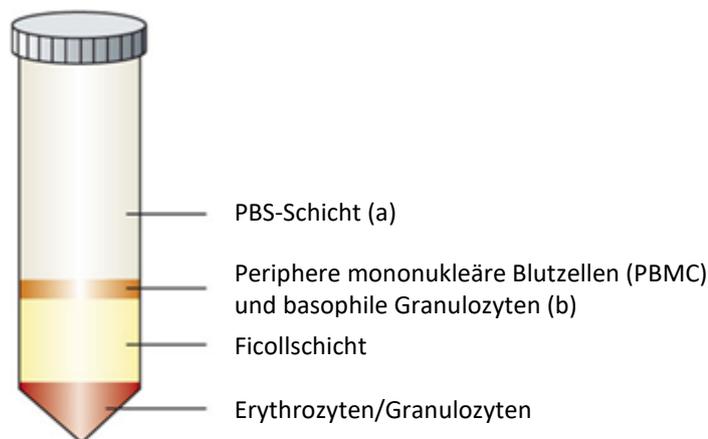
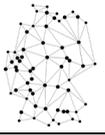


Abbildung 3: 50 ml Zentrifugen-Röhrchen nach Zentrifugation (Bildquelle: [17])



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 27)
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 im 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 im LIMS.
27. Dokumentation im LIMS durch scannen der Aliquot-ID und verknüpfen mit Primärproben-ID



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):

- 9 ml 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 im 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. 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
18. Auffüllen mit PBS auf 45 ml
19. Zentrifugation bei 300 x g, 10 min, RT
20. Überstand verwerfen



Arbeitsablauf

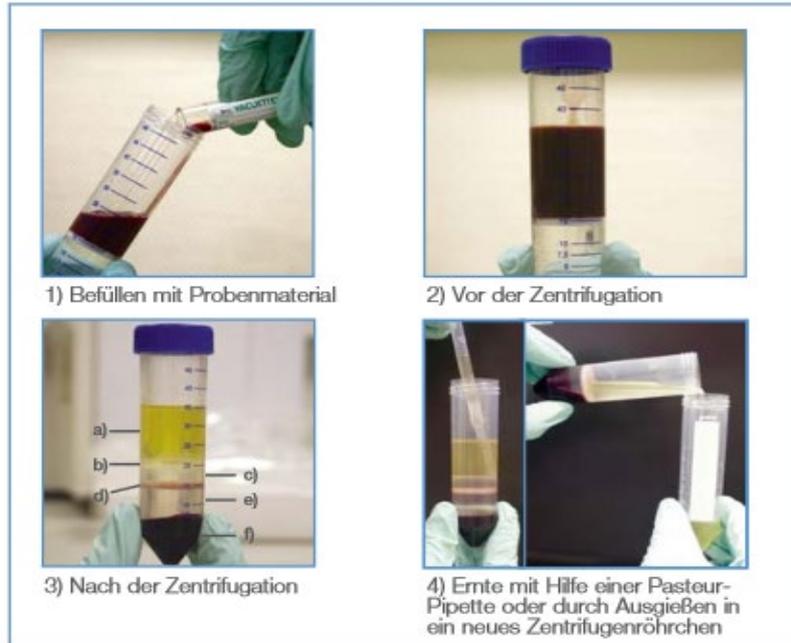


Abbildung 4: Arbeitsablauf Leucosep™-Röhrchen vor (2) und nach (3) Zentrifugation (Bildquelle: [18])

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 27)
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 im 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 μ l)! Beträgt das Gesamtvolumen ≤ 500 μ l 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 μ l Einfriermedium aufnehmen und in **ein** 0,5 ml Cryoröhrchen überführen. Dokumentation des abweichenden Volumens und der entsprechenden Zellzahl im LIMS.

28. Dokumentation im 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 N₂ 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)
5. Etwa die Hälfte der Plasmaschicht (Abbildung 5, (3) Plasma) abnehmen ohne die Zellschicht zu zerstören und verwerfen

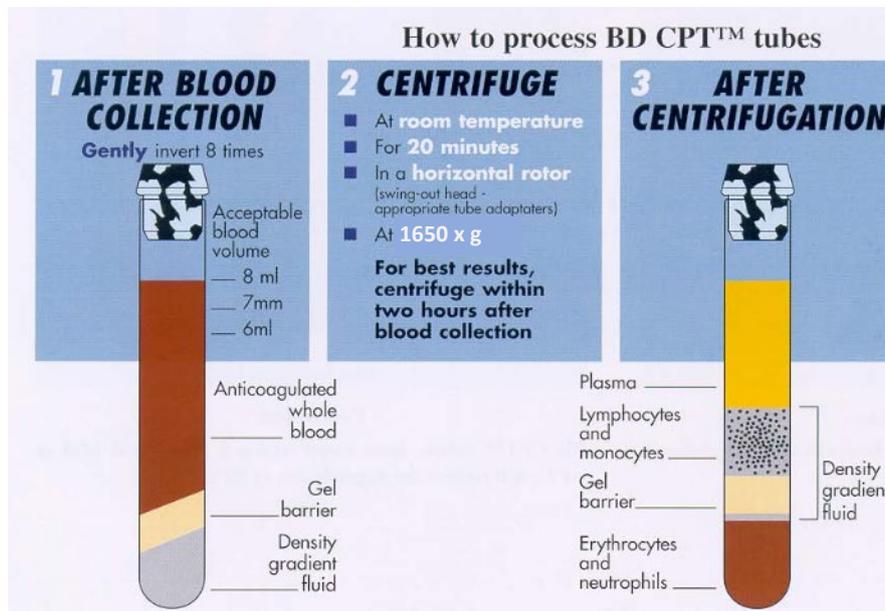
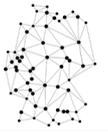
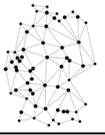


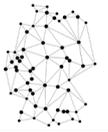
Abbildung 5: Arbeitsablauf CPT™-Röhrchen vor (1) und nach (3) Zentrifugation (Bildquelle: [17])

6. 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).
7. Auffüllen mit PBS auf 50 ml. Zellen durch 5-maliges Invertieren des Zentrifugen-Röhrchens mischen.
8. Zentrifugation bei 300 x g, 15 Minuten, RT
9. Überstand verwerfen
10. Resuspendieren des Pellets mit 10 ml PBS. Zellen durch 5-maliges Invertieren des Zentrifugen-Röhrchens mischen.
11. Zentrifugation bei 300 x g, 10 Minuten, RT
12. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Medium zur Zellzahlbestimmung
13. Bestimmung der Zellzahl (s. Seite 27; zum Vergleich: laut Hersteller beträgt die durchschnittliche Ausbeute bei gesunden Proband*innen $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml Blut)
14. Zentrifugation bei 300 x g, 10 Minuten, RT



15. Überstand verwerfen, erneutes resuspendieren in Einfriermedium auf eine Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml. Wichtig ist die Dokumentation der tatsächlichen Zellzahl im LIMS.
16. 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 im LIMS.
17. Dokumentation im LIMS durch scannen der Aliquot-IDs und verknüpfen mit Primärproben-ID
18. 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®)

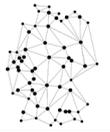
- a. Sofort nach der Blutentnahme das PAXgene® Blood RNA-Röhrchen 8-10-mal leicht schwenken.
- b. Das PAXgene® Blood RNA-Röhrchen für mindestens 2 Stunden aufrecht bei RT stehen lassen.
- c. Das PAXgene® Blood RNA-Röhrchen aufrecht lagern.
- d. Röhrchen **niemals** in einem Styropor-Ständer einfrieren,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

7. Verhalten bei Abweichungen

Alle Abweichungen von der SOP werden an den geeigneten Stellen im LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [A1: Handbuch CPT™](#)
- [A2: Handbuch Leucosep™](#)
- [A3: Vorgehen Blutentnahme im Rahmen der NAPKON-Studie](#)
- [A4: 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](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON-Studie

Standardarbeitsanweisung

04.2021/V3.0

Blutentnahme und -verarbeitung

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



NAPKON-SOP-02: Oropharyngealabstrich

Dokumentenategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

S. 43: Ergänzung Hinweis FFP2
S. 43f., Flow Chart S. 10: Ergänzung Hinweis Lagerung in 2D-codierten Cryoröhrchen
S. 45, Flow Chart S. 10: Ergänzung Vorgehen bei Abstrichtupfern ohne Sollbruchstelle
S. 45: Ergänzung Dokumentation im LIMS
S. 45, Flow Chart S. 10: Ergänzung maximal erlaubter Zeitraum bis zum Einfrieren

Anlagen:

PBB 1S-3S „Sonstige Bioproben“
Flow Chart zur Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	44
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	44
3.	Geltungsbereich	44
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	44
5.	Zuständigkeiten.....	44
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	45
6.1.	Benötigte Materialien	45
6.2.	Benötigte Dokumente.....	45
6.3.	Arbeitsanleitung.....	45
6.3.1.	Vorbereitung.....	45
6.3.2.	Durchführung.....	46
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	47
8.	Anlagen	48



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu die Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs unter standardisierten Bedingungen innerhalb der NAPKON-Studie 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 teilnehmenden Studienzentren der NAPKON-Studie; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Arzt/Studienassistentz
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar/Studienassistentz/Technische Assistenz



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

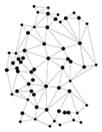
Sofern aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

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

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

- Pro Patient*in 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 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.

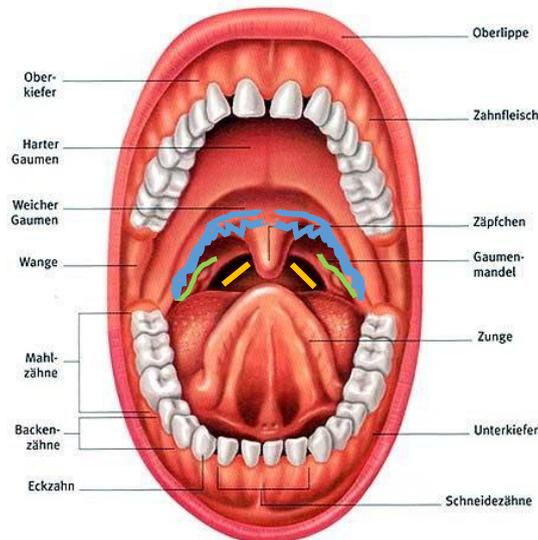


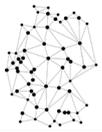
Abbildung 6: Vorgehen bei einem Oropharyngealabstrich (Bildquelle: [19])

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 im 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 im LIMS. Mit Einverständnis des/der Studienteilnehmers*Studienteilnehmerin ist ein weiterer Versuch gestattet.



Verweigerung des/der Patienten*Patientin:

NAPKON-SOP-03: Nasopharyngealabstrich	
Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	S. 50: Ergänzung Hinweis FFP2 S. 50f., Flow Chart S. 11: Ergänzung Hinweis

Vermerk im LIMS

8. Anlagen

- [PBB 1S-3S „Sonstige Bioproben“](#)

[Flow Chart zur Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON-Studie

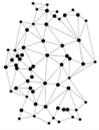
Standardarbeitsanweisung 10.2020/V2.0	Nasopharyngealabstrich
--	-------------------------------

	Lagerung in 2D-codierten Cryoröhrchen S. 52: Ergänzung Dokumentation im LIMS S. 52, Flow Chart S. 11: Ergänzung Vorgehen bei Abstrichtupfern ohne Sollbruchstelle S. 52, Flow Chart S. 11: Ergänzung maximal erlaubter Zeitraum bis zum Einfrieren
Anlagen:	PBB 1S-3S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Gewinnung eines Nasopharyngealabstrichs



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	51
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	51
3.	Geltungsbereich	51
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	51
5.	Zuständigkeiten.....	51
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	52
6.1.	Benötigte Materialien	52
6.2.	Benötigte Dokumente.....	52
6.3.	Arbeitsanleitung.....	52
6.3.1.	Vorbereitung	52
6.3.2.	Durchführung.....	53
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	54
8.	Anlagen	54



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Gewinnung und Aufarbeitung eines tiefen Nasopharyngealabstrichs unter standardisierten Bedingungen innerhalb der NAPKON-Studie 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 teilnehmenden Studienzentren der NAPKON-Studie; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Arzt/Studienassistentz
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar/Studienassistentz/Technische Assistenz



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

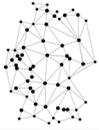
Sofern aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

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

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

- Pro Patient*in 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 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 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 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: [20])

7. 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.
8. Dokumentation im 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 im LIMS dokumentiert.

Verweigerung des/der Patienten*Patientin:

Vermerk im LIMS

8. Anlagen

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



Standardarbeitsanweisung

10.2020/V2.0

Speichelgewinnung

NAPKON-SOP-04: Speichelgewinnung

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

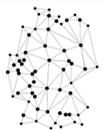
ab Freigabe

Änderungshinweis:

S. 56: Schritt 2 Ergänzung „ohne Zuhilfenahme der Finger“
S. 57, Flow Chart S. 12: Ergänzung äußerliche Desinfektion der Salivette® und maximal erlaubter Zeitraum bis zum Einfrieren

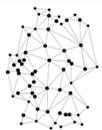
Anlagen:

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



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	57
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	57
3.	Geltungsbereich	57
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	57
5.	Zuständigkeiten.....	57
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	57
6.1.	Benötigte Materialien	58
6.2.	Benötigte Dokumente.....	58
6.3.	Arbeitsanleitung.....	58
6.3.1.	Vorbereitung.....	58
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 von Speichel unter standardisierten Bedingungen innerhalb der NAPKON-Studie zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

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

3. Geltungsbereich

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

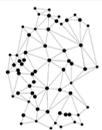
4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Arzt/Studienassistentz
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar/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 aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

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

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

Der/die Patient*in 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 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 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 soll die Saugrolle so lange im Mund behalten bis diese komplett mit



Speichel durchtränkt ist (mind. 1 min).

4. Die speichelgetränkte Saugrolle in das Einhängengefäß der Salivette® zurückgeben (Wattebausch dabei nicht mit den Fingern berühren) und die Salivette® mit dem Stopfen wieder fest verschließen. Die Salivette® äußerlich desinfizieren.
5. 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 im LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

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



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON-Studie

Standardarbeitsanweisung

10.2020/V2.0

Trachealsekret (ENTA)

NAPKON-SOP-05: Trachealsekret (ENTA)

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

S. 61f., Flow Chart S. 13: Ergänzung Hinweis
Lagerung in 2D-codierten Cryoröhrchen
S. 62, Flow Chart S. 13: Ergänzung maximal
erlaubter Zeitraum bis zum Einfrieren

Anlagen:

PBB 1S-2S + 6S „Sonstige Bioproben“
Flow Chart zur Probenverarbeitung von Trachealsekret
(ENTA)



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.	Weiterverarbeitung der Proben	64
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	64
8.	Anlagen	64



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Probenverarbeitung von Trachealsekret (ENTA) unter standardisierten Bedingungen innerhalb der NAPKON-Studie 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 teilnehmenden Studienzentren der NAPKON-Studie; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Lokale SOPs zur Gewinnung von Trachealsekret

5. Zuständigkeiten

Prozess	Bezeichnung
Probengewinnung	Arzt/Studienassistentz
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar/Studienassistentz/Technische Assistenz



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 aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

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

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Vorbereitung

- Pro Patient*in 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 im 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 im LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [PBB 1S-2S + 6S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Trachealsekret \(ENTA\)](#)



NAPKON-SOP-06: Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	S. 66ff., Flow Chart S. 14: Ergänzung Hinweis Lagerung in 2D-codierten Cryoröhrchen S. 66: Ersetzung Objektträger durch Einweg-Zählkammer S. 67, Flow Chart S. 14: Ergänzung Hinweis Einsatz der Bremse bei Zentrifugation S. 67f., Flow Chart S. 14: Ergänzung maximal erlaubter Zeitraum bis zum Einfrieren S. 68, PBB 5S, Flow Chart S. 14: Anpassung Einfrier-/Lagertemperatur BAL-Zellen
Anlagen:	PBB 1S-2S + 4S-5S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Probenverarbeitung von Bronchoalveolärer Lavage (BAL)



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.	Durchführung.....	68
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	70
8.	Anlagen	70



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Aufarbeitung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) unter standardisierten Bedingungen innerhalb der NAPKON-Studie 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 teilnehmenden Studienzentren der NAPKON-Studie; 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	Arzt/Studienassistentz
Probentransport	Transportunternehmen/Technische Assistenz/Rohrpost
Probenprozessierung	Technische Assistenz
Einlagerung	Technische Assistenz
Dokumentation	Med. Dokumentar/Studienassistentz/Technische Assistenz



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 aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

- Aktuellste Version des PBB „Sonstige Bioproben“ mit lokaler Patient*innen-ID und Probenidentifizierungsnummer (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 im 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 im 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 im 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 im LIMS dokumentiert.

„Klumpen“ im Zählnetz:

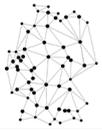
Mögliche Ursache: Zellpellet nicht homogen resuspendiert / Korrektur: homogen resuspendieren

Farbniederschläge in der Vitalfärbung

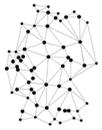
Mögliche Ursache: Trypanblau-Lösung zu alt / Korrektur: Färbelösung auswechseln

8. Anlagen

- [PBB 1S-2S + 4S-5S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Probenverarbeitung von Bronchoalveolärer Lavage \(BAL\)](#)



NAPKON-SOP-07: Uringewinnung und -verarbeitung	
Dokumentenkategorie:	Standardarbeitsanweisung
Gültigkeit:	ab Freigabe
Änderungshinweis:	S. 72: 2,0 ml Cryoröhrchen als benötigtes Material gestrichen S. 72, 74, Flow Chart S. 15: Ergänzung Hinweis Lagerung in 2D-codierten Cryoröhrchen S. 72: Proben-ID-Etikett für Urinbecher gestrichen S. 73: Ergänzung Beschriftung Auffangbehälter S. 73, Flow Chart S. 15: Ergänzung Hinweis Einsatz der Bremse bei Zentrifugation S. 73f.: Redundante Schritte gestrichen S. 73f., Flow Chart S. 15: Änderung maximal erlaubte Zeiträume von Uringewinnung bis Zentrifugation und Einfrieren S. 74, Flow Chart S. 15: Schritt d Ergänzung Überstand verwerfen und Anpassung Einfrier-/ Lagertemperatur PBB 2S: Ergänzung Abfrage Trübungen und Art der Uringewinnung
Anlagen:	A1: Anweisung für Patient*innen zur Gewinnung von Mittelstrahlurin PBB 1S-2S + 7S „Sonstige Bioproben“ Flow Chart zur Urinverarbeitung



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	73
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	73
3.	Geltungsbereich	73
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	73
5.	Zuständigkeiten.....	74
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	74
6.1.	Benötigte Materialien	74
6.2.	Benötigte Dokumente.....	74
6.3.	Arbeitsanleitung.....	75
6.3.1.	Uringewinnung.....	75
6.3.2.	Weiterverarbeitung der Urinproben	75
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	76
8.	Anlagen	76



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu den Ablauf der Uringewinnung und die Weiterverarbeitung der Urinproben unter standardisierten Bedingungen innerhalb der NAPKON-Studie 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 teilnehmenden Studienzentren der NAPKON-Studie; geltend für Klinik-/medizinisches Personal und Labor-/Biobankpersonal.

4. Beziehungen zu anderen Regelungen

- Keine



5. Zuständigkeiten

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

6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

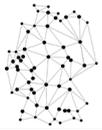
Probenart	Volumen	Verwendung für	Verarbeitung
Urin	10 ml	z. B. <i>Metabolomics</i>	Zentrifugation; Getrennte Aufbewahrung von Überstand und Sediment

z. B.

- 1 Sarstedt Urin-Monovette, 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. Kat. 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: Anweisung für Patient*innen zur Gewinnung von Mittelstrahlurin](#)



Sofern aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist:

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

6.3. Arbeitsanleitung

6.3.1. Uringewinnung

1. Auffangen von ca. 10 - 50 ml Mittelstrahlurin in eindeutig beschriftetem Auffangbehälter (Urinbecher) durch den/die Patienten*Patientin 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**

Sollte der/die Patient*in einen Dauerkatheter tragen, erfolgt die Uringewinnung direkt aus dem Katheter (Dokumentation im 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!

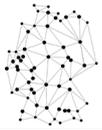
- b) Nach Zentrifugation manueller Transfer von 1 x 9 ml Überstand in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen (markiert als „Überstand“) durch z. B. eine einzige, sterile Einmaltransferpipette. Lagerung bei 4°C bis zur Aliquotierung.
- c) Aliquotieren des Überstandes in max. 10 x 0,5 ml-Portionen in 2D-codierte 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 im 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 im LIMS dokumentiert.

8. Anlagen

- [A1: Anweisung für Patient*innen zur Gewinnung von Mittelstrahlurin](#)
- [PBB 1S-2S + 7S „Sonstige Bioproben“](#)
- [Flow Chart zur Urinverarbeitung](#)



NAPKON

NATIONALES
PANDEMIE
KOHORTEN
NETZ

NAPKON-Studie

Standardarbeitsanweisung

08.2022/V1.0

Liquorgewinnung und -verarbeitung

NAPKON-SOP-8: Liquorgewinnung und -verarbeitung

Dokumentenkategorie:

Standardarbeitsanweisung

Gültigkeit:

ab Freigabe

Änderungshinweis:

Keiner, da Version 1.0

Anlagen:

PBB 2S-4S + 11S-12S „Sonstige Bioproben“
Flow Chart zur Probenverarbeitung von Liquor



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben	79
2.	Begriffe, Definitionen, Abkürzungen	79
3.	Geltungsbereich	79
4.	Beziehungen zu anderen Regelungen	79
5.	Zuständigkeiten.....	79
6.	Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes	80
6.1.	Benötigte Materialien	80
6.2.	Benötigte Dokumente.....	80
6.3.	Arbeitsanleitung.....	80
6.3.1.	Liquorgewinnung	80
6.3.2.	Liquorverarbeitung	81
7.	Verhalten bei Abweichungen.....	82
8.	Anlagen	82



1. Zielsetzung/Anwendungsbereich/Aufgaben

Diese Standardarbeitsanweisung dient dazu die Verarbeitung von Liquorproben unter standardisierten Bedingungen innerhalb des NAPKON (Erwachsene) zu gewährleisten.

2. Begriffe, Definitionen, Abkürzungen

PBB	Probenbegleitbogen
RT	Raumtemperatur
min	Minuten
ml	Milliliter

3. Geltungsbereich

Für die Anwendung in allen am NAPKON (Erwachsene) 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/Studienassistentz/Technische Assistenz



6. Durchführung und Beschreibung des Arbeitsablaufes

6.1. Benötigte Materialien

Probenart	Volumen	Verwendung für	Verarbeitung
Liquor	10 ml	Zellen und Biomarker	Zentrifugation; Getrennte Aufbewahrung von Überstand und Sediment

Reagenzien (Beispiele für geeignete Medien):

- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, cat. no. D4540)
- Fetales Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, cat. no. F7524)
- Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS, täglich 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))

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 18 Jahre nach separater Aufklärung für wissenschaftliche Untersuchungen. Die Gewinnung von Liquor findet nach der klinikinternen Methode statt. (Bei Patient*innen und Kontrollen unter 18 Jahre siehe NAPKON Manual – Pädiatrie Modul)



6.3.2. Liquorverarbeitung

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 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. 20 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, dass 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 5×10^4 Zellen liegen, dann alle gewonnenen Zellen in **100 μl Einfriermedium aufnehmen**. Dokumentation des abweichenden Volumens und der entsprechenden Zellzahl auf dem PBB und 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 N_2 -Gasphase**



7. Verhalten bei Abweichungen

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

8. Anlagen

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

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Alle nachfolgend aufgeführten Internetquellen wurden abgerufen am 13.04.2022

- [1] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/04.1934/>
- [2] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/04.1922/>
- [3] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/02.1065/>
- [4] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/s-monovetter/produkt/04.1931/>
- [5] <https://www.bdbiosciences.com/eu/applications/blood-collection/cell-biomarker-preservation/bd-vacutainerreg-cpttrade-mononuclear-cell-preparation-tube---sodium-heparin/p/362780>
- [6] <https://www.bdbiosciences.com/eu/applications/blood-collection/cell-biomarker-preservation/paxgenereg-blood-rna-tube/p/762165>
- [7] <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>
- [8] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/kanuelen-adapter/produkt/14.1112/>
- [9] <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>
- [10] Dr. Andrea Kühn-Steven / Helmholtz Zentrum München
- [11] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/kanuelen-adapter/produkt/14.1207/>
- [12] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/urin/urin-monovetter/produkt/10.252/>
- [13] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/urin/becher/produkt/75.562.105/>
- [14] <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/salivasputum/produkt/51.1534/>
- [15] <https://www.hain-lifescience.de/produkte/abstrich--und-transportsysteme/nylon-flockfaser-abstrichtupfer.html>
- [16] NaKo-Biomaterialhandbuch
- [17] Handbuch Biomaterialsammlung des DZIF Transplantations(Tx)-Kohorte e.V., Version 1.5 vom 16.05.2018; Abbildungen modifiziert

[18] Handbuch Leucosep™ (s. NAPKON-SOP-01_Anlage 2)

[19] SOP S4_BIOPROBEN I, Version 01 vom 08.11.2017, KORA Fit-Studie, Forschungsplattform Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA)

[20] Arbeitsanweisung DZL – AA – 0000 – Nasopharyngealabstrich, 04/2020, rev. 1.0, BioMaterialBank Nord, Forschungszentrum Borstel

8. ANLAGEN

- [Übersicht Visiten in den NAPKON Kohortenplattformen](#)
- [NAPKON-SOP-01 Anlage 1](#): Handbuch CPT™
- [NAPKON-SOP-01 Anlage 2](#): Handbuch Leucosep™
- [NAPKON-SOP-01 Anlage 3](#): Vorgehen Blutentnahme im Rahmen der NAPKON-Studie
- [NAPKON-SOP-01 Anlage 4](#): Herstelleranleitung SepMate™
- [NAPKON-SOP-07 Anlage 1](#): Anweisung für Patient*innen zur Gewinnung von Mittelstrahlurin
- [NAPKON Probenbegleitbogen Blut V3.0 04/2021](#)
- [NAPKON Probenbegleitbogen Sonstige Bioproben V4.0 06/2022](#)
- [NAPKON Flow Charts V4.0](#)

Übersicht Visiten in den NAPKON Kohortenplattformen

Visite	Baseline	Akute Phase			Entlassung	Nachsorge: Klinik				Nachsorge: zu Hause
Zeitpunkt	Zeitpunkt	Wochentage			Tag der Entlassung	Monate nach Diagnose				Berichte via App/Telefon
		Mo	Mi	Fr		3	6	12	24	
Sektorenübergreifende Plattform	Tag 0-3	X [‡]	-	-	X	X	-	X	-	Alle 6 Wochen bis Monat 12
Hochauflösende Plattform	Tag 0-3	X	X	X	X	X	X	X	X	-
Populationsbasierte Plattform	Monat 0-3	-	-	-	-	X	-	X	X	Monat 6 und Monat 18

[‡] zusätzliche Visite bei Auftreten von infektionsassoziierten Komplikationen oder klinischer Verschlechterung

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-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.

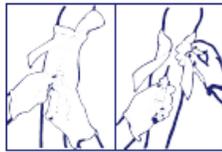


Figure 1

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

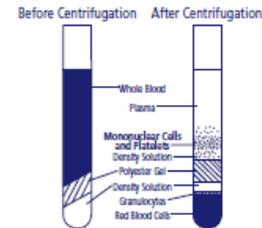


Figure 2

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-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-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. Mikrotub.
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™ Rörchen	9 3
50 ml Leucosep™ Rörchen	9 3
Gebrauchsanleitung Leucosep™	9 4
↳ OncoQuick®	9 5

14. Zubehör/ allg. Labbedarf
13. Reaktions-/ Analysengläser
12. Absorbier- systeme/Folien
11. Cytocentrif. Mikrotub.
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 monoklonärer 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-Installation

9 Separation

10 Biochemie/ Microfluidik

11 Cytometrie

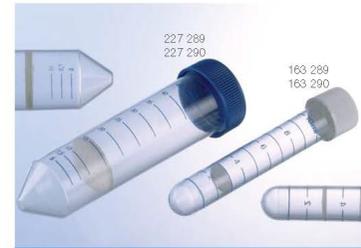
12 Abdecksysteme/Folien

13 Reaktions-/ Analysengefäße

14 Zubehör/ allg. Labbedarf

Leucosep™

12 ml und 50 ml Leucosep™ Röhren



Leucosep™

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

Eigenschaften:

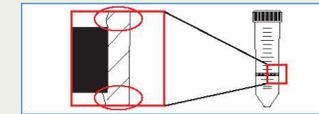
- Anreicherung direkt aus Vollblut
- Vereinfachtes Befüllen durch Trennscheibe
- Durchführung der Separation in 15 Minuten bei Raumtemperatur
- Keine zusätzlichen Laborgeräte notwendig
- Abtrennung von Erythrozyten und Granulozyten
- Keine Rekontamination mit Erythrozyten
- Kein Blockieren von Markermolekülen
- 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 monoklonalen 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 Blutnahmeröhrchen 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	3 – 8 ml Blut	15 – 30 ml Blut	15 – 30 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.

Leucosep™

Gebrauchsanleitung Leucosep™

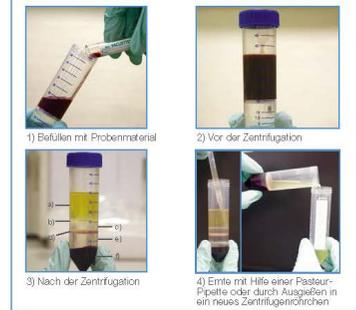
Das Verfahren

Leucosep™ wurde zur optimierten Separation von Lymphozyten und peripheren mononukleären Zellen (sog. PBMCs) aus humanem Vollblut und Knochenmark mit fests 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 vorbeüllt 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



- 1) 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.
- 2) 10 Minuten bei 1000 x g und RT oder 15 Minuten bei 800 x g und RT im Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugieren.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Wäsche der angereicherten Zellfraktion (Lymphozyten/PBMCs) mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), anschließend 10 Minuten bei 250 x g zentrifugieren.
- 6) Waschschrift 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®



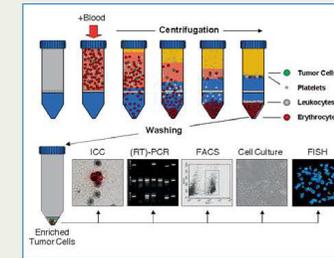
OncoQuick®

Anreicherung disseminierter, zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut

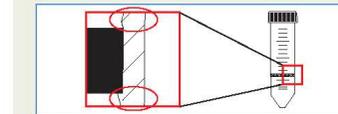
Eigenschaften:

- 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.

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

Vorgehen Blutentnahme im Rahmen der NAPKON-Studie

Die Blutentnahme hat gemäß den lokalen gültigen Arbeitsanweisungen zu erfolgen. Liegt keine solche vor, ist wie nachfolgend beschrieben vorzugehen (Quelle: NAKO Gesundheitsstudie, Pretest). Die Entnahme beschreibt den Vorgang mit Monovetten-Systemen von Sarstedt.

A) Blutentnahmeplatz

Ein geeigneter Blutentnahmeplatz steht zur Verfügung. Die Raumtemperatur sollte 20-24°C betragen. Bei Blutentnahme im Sitzen sollte ein Blutentnahmestuhl verwendet werden, der zur Liege umgeklappt werden kann, so dass der/die Patient*in bei Unwohlsein liegen bzw. bei Kollaps gelagert werden kann (Beinhochlage/Halbseitenlage).

Der Materialbestand an jedem Blutentnahmeplatz sollte täglich vor Beginn der Blutentnahmen kontrolliert werden.

Der Blutentnahmebereich muss immer sorgfältig sauber gehalten werden. Benutztes Material stets sofort in den entsprechenden Behältnissen entsorgen.

Reinigen Sie den Tisch, die Armauflage und bei Bedarf auch den Fußboden nach jeder Blutentnahme mit Pursept-A und Einwegtüchern/Zellstoff.

Vor und nach jeder Blutentnahme muss eine gründliche Handwäsche oder Händedesinfektion (z. B. mit Sterilium o. ä.) vorgenommen werden.

Die Blutentnahme wird von einem/einer technisch versierten Mitarbeiter*in (Studienassistent, Krankenpfleger*in, Ärzt*in) durchgeführt, die/der Erfahrung in der Blutentnahme besitzt. Ihre/seine Qualifikation muss in einer Schulung nachgewiesen und durch die Studien-/Schulungsleitung bzw. Ärzt*in/Stationsleitung bestätigt werden (Dokumentation der Schulung).

B) Vorbereitung der Blutentnahme

Generell muss ein/e Ärzt*in in angemessener Zeit persönlich den Blutentnahmeplatz erreichen können. Für die Blutentnahme trägt der/die Mitarbeiter*in einen weißen, sauberen Kittel.

1. Aufklärung und Einverständnis des/der Patienten*Patientin zur Teilnahme an der Studie durch Studienärzt*in.

Der/die Patient*in wird zum Blutentnahmeplatz begleitet. Nach Ablegen von Jacke/Pullover soll der/die Patient*in bereits in dieser Phase auf dem Blutentnahmestuhl mit Armlehne (oder auf der Untersuchungs liege) Platz nehmen, um neuerliches Aufstehen vor der eigentlichen Blutentnahme zu vermeiden. Im Probenbegleitbogen ist zu vermerken, ob die Blutentnahme im Liegen oder im Sitzen durchgeführt wird.

2. Erklären Sie dem/der Patienten*Patientin Ihr Vorhaben. Hierzu ein Beispiel: *"Ich möchte Ihnen Blut aus Ihrer Armvene entnehmen. Die Blutentnahme wird nur einige Minuten dauern und Sie nicht wesentlich belasten."*

Geben Sie dem/der Patienten*Patientin Gelegenheit, Fragen zu stellen. Vermitteln Sie ihm/ihr den Eindruck, dass seine/ihre Fragen ernst genommen und kompetent beantwortet werden.

Falls der/die Patient*in etwas ängstlich ist, nehmen Sie sich viel Zeit, versuchen Sie beruhigend auf ihn/sie einzuwirken und von der Wichtigkeit der Untersuchung zu überzeugen.

Versuchen Sie nicht unter allen Umständen, den/die Patienten*Patientin zur Blutentnahme zu bewegen.

Stimmt der/die Patient*in der Blutentnahme zu, vervollständigen Sie die Befragung entsprechend des Probenbegleitbogens.

C) Etikettieren Sie wie oben stehend beschrieben

Die Nummerierung der Blutentnahmeröhrchen soll der bei der Blutentnahme einzuhaltenden Reihenfolge entsprechen. Beachten Sie beim Aufkleben der Etiketten, dass die Röhrchenskala nicht überdeckt und damit ein Ablesen der Füllmenge während der Blutentnahme nicht behindert wird.

Legen Sie sich das weitere, für die Blutentnahme unmittelbar benötigte Material zurecht: 4 einzelne Tupfer (davon 1x für Trockenwischen der Injektionsstelle, 1x ggf. zum Unterlegen unter Flügelkanüle, 1x zur Blutstillung), Flügelkanüle, 1 Streifen Leukosilk für die Befestigung entweder der Flügelkanüle oder des Schlauches, Pflaster. Benutzen Sie keine Kanülen, bei denen die Verpackung beschädigt oder verschmutzt wurde!

D) Durchführung der Blutentnahme

Um direkten Kontakt mit Patient*innenblut zu vermeiden, darf die Blutentnahme grundsätzlich nur mit Einmalhandschuhen durchgeführt werden.

1. Suchen der Punktionsstelle:

Der Ärmel wird über die Ellenbeuge hochgerollt, wobei der hochgerollte Ärmel zu keinerlei Stauung führen darf. Achten Sie auf die durchgestreckte, zugleich aber entspannte Lage des Armes auf der Armunterlage.

Legen Sie die Staubbinde 7,5-10 cm oberhalb der Venenpunktionsstelle an. Betasten und verfolgen Sie mehrmals den Verlauf der Venen mit dem Zeigefinger. Bei verstopften Venen fehlt die Elastizität, sie fühlen sich schnurähnlich an und rollen sehr leicht. Wenn die oberflächlichen Venen kaum erkennbar sind, dann können Sie den/die Patienten*Patientin bitten, eine Faust zu machen. In der Regel sollte Faustschluss jedoch unterbleiben, insbesondere mehrmaliger Faustschluss ('Pumpen'). Ein leichtes, mehrmaliges Beklopfen der Vene mit dem Zeige-/Mittelfinger bewirkt ein Anschwellen der Vene. Durch ein Absenken des Armes wird bewirkt, dass sich die Venen verstärkt füllen. In schwierigen Ausnahmefällen kann auch feuchte Wärme das Hervortreten der Venen fördern: Halten Sie ein Handtuch unter heißes Wasser und legen Sie dieses mehrere Minuten lang auf die

NAPKON-SOP-01_Anlage 3

Ellenbeuge. Wärmeapplikation gehört zu den Regelabweichungen, die im Probenbegleitbogen dokumentiert werden müssen!

Sobald Sie eine geeignete Stelle für die Punktion gefunden haben – spätestens jedoch nach 1 min – lockern Sie die Staubinde!

2. Reinigung und Desinfektion der Punktionsstelle:

Besprühen Sie die von Ihnen gewählte Einstichstelle mit Desinfektionsmittel (z. B. Dibromol) und lassen Sie dieses 30 sec einwirken. Optional: Säubern Sie die Haut an der Einstichstelle durch einmaliges Abreiben mit einem Zellstofftupfer. Warten Sie, bis die Stelle trocken ist, um eine mögliche Hämolyse des Blutes durch das Desinfektionsmittel zu vermeiden, die zu Veränderungen verschiedener Blutwerte führt. Wenn die Venenpunktion schwierig erscheint, müssen Sie gegebenenfalls die Vene erneut betasten. In diesem Fall muss die betreffende Stelle erneut mit Desinfektionsmittel gesäubert werden.

3. Punktion:

Straffen Sie die Haut des/der Patienten*Patientin durch Zug nach distal (nach unten Richtung Hand), d. h. entgegengesetzt zur Einstichrichtung der Nadel mit dem Daumen allein oder mit Daumen und Zeigefinger. Die Flügelkanüle wird so gehalten, dass die Nadelöffnung nach oben zeigt. Fixieren Sie mit dem Auge denjenigen Bereich der Vene, in dem die Nadelspitze am Ende liegen soll, setzen die Nadelspitze ungefähr eine halbe Nadellänge distal (unterhalb) dieses Venenbereichs (und in gerader Verlängerung dieses Venenabschnitts) auf die Haut, durchstoßen bei steiler Nadelstellung mit einem kleinen Ruck die Haut und schieben dann die jetzt flach gehaltene Nadel ruhig und gleichmäßig unter der Haut vor bis in die Vene. Diese Führung der Nadel über eine gewisse Wegstrecke (mindestens halbe Nadellänge) im Unterhautgewebe schient und fixiert damit die Nadel.

Fließt Blut in den Schlauch ein, ist die Staubinde sofort zu öffnen!

Lassen Sie die Staubinde niemals länger als 1 min und auch dann nur mit geringem Staudruck angelegt! Zum einen ist eine längere Stauung für den/die Patienten*Patientin unangenehm, zum anderen führt sie zu einer artifiziellen Konzentrationserhöhung selektiv der großen Blutbestandteile (Zellen, große Proteine und daran gebundene kleinere Moleküle: 'Hämokonzentration' durch Auspressen von Wasser aus dem Gefäß).

Verwenden Sie die Entnahmeröhrchen gemäß den Angaben des Herstellers. Sollte kein Blut leicht nachfließen, so bedeutet dies in aller Regel, dass die Vene durchstoßen wurde. Zurückziehen der Nadel ist keine Abhilfe, weil die Venenwand an zwei Stellen verletzt und Aspirieren von paravenösem Blut strikt verboten ist. In aller Regel muss also erneut punktiert werden, distal am gleichen oder am anderen Arm.

Sollten zwei Versuche der Venenpunktion fehlschlagen, so fragen Sie den/die Patienten*Patientin, ob er bereit wäre, sich von einem/einer anderen Mitarbeiter*in punktieren zu lassen!

Fixieren Sie den Schlauch optional am Unterarm mit Klebepflaster, und zwar so, dass sich die Stellung der Nadel nicht mehr verändern, zugleich eine Schlauchbewegung beim

Umsetzen der Blutentnahmeröhrchen nicht auf die Nadel übertragen kann. Sollte im Ausnahmefall die Nadel selbst fixiert werden, so muss ein Tupfer unter die Nadel/Flügel geschoben und das Klebeband nur über das schlauchnahe Ende der Nadel, nicht über die beiden Flügel gezogen werden. Der Tupfer soll dabei verhindern, dass durch den Zug nach unten die Nadelöffnung (die nach oben zeigt) gegen die Gefäßwand gedrückt wird, was den Blutfluss behindert.

4. Befüllung der Blutröhrchen:

Vorgegebene Reihenfolge der Befüllung einhalten. **Es ist sehr wichtig die Blutröhrchen vollständig zu befüllen, insbesondere bei Citrat-Röhrchen!**

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 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).

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 2-3-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. 8-10x über Kopf schwenken. Bei RT 2 h aufrecht stehend lagern bis zum Einfrieren bei -20°C und nach 24 h finale Lagerung bei -80°C.

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

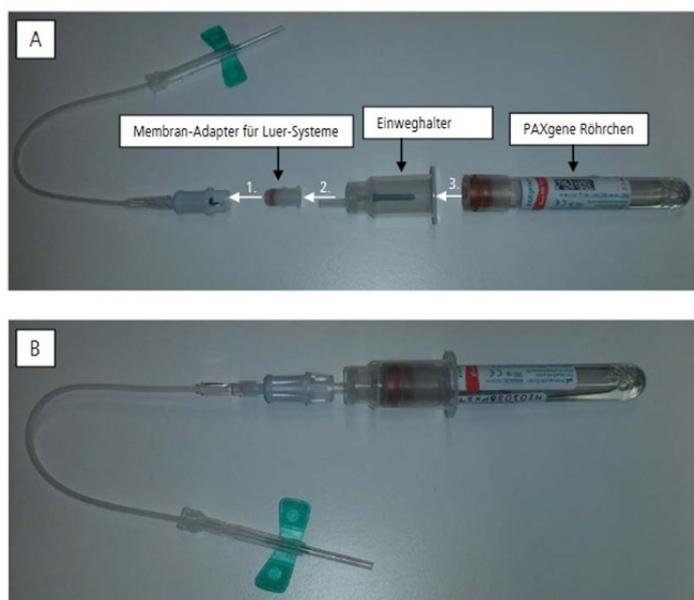


Abb. A und B:
Einzelne Komponenten (A), zusammengestecktes System (B):
Adaptersystem für die Abnahme von Blut in Kombination von Sarstedt und BD-System (Safety-Multifly-Set, Membran-Adapter Sarstedt, Einweghalter).

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: [16])

5. Entfernen der Nadel:

Legen Sie einen Zellstofftupfer über die Venenpunktionsstelle. Entfernen Sie die Nadel rasch und üben erst unmittelbar danach (d. h. noch nicht während des Herausziehens) mit Ihrem Daumen Druck auf die Punktionsstelle aus.

Fordern Sie den/die Patienten*Patientin auf, den Tupfer einige Minuten fest auf die Punktionsstelle zu drücken, der Arm darf dabei im Ellenbogen nicht abgewinkelt sein. Vergewissern Sie sich, dass der Blutfluss zum Stillstand gekommen ist und überkleben Sie dann die Punktionsstelle mit einem Pflaster.

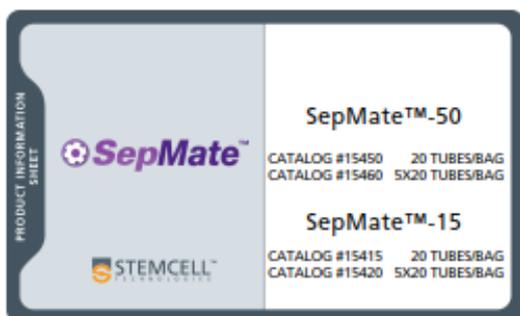
Wenn der/die Patient*in weiterhin blutet:

Unter Druck auf die Punktionsstelle muss der Arm so lange hochgehalten werden, bis die Blutung aufgehört hat. Dauert die Blutung länger als 5 min, sollte ein/e Ärzt*in informiert werden. Wickeln Sie gegebenenfalls über den Tupfer eine Mullbinde um den Arm und lassen die Binde mindestens 15 min angelegt. Notieren Sie die Komplikation im Probenbegleitbogen!

Sollte sich an der Punktionsstelle ein Hämatom entwickeln oder der/die Patient*in über Schmerzen klagen, kann ein Salbenverband mit Heparinsalbe Linderung bringen.

6. Entsorgen der Flügelkanüle:

Werfen Sie die Flügelkanüle (mit integrierter Kanülenschutzhülse) sofort in den dafür vorgesehenen gelben Behälter. Der Klappdeckel des Abwurfbehälters ist über Nacht zu verschließen. Sobald drei Viertel des Behälters gefüllt sind, wird der Klappdeckel mit Klebeband für die Entsorgung gesichert. Ein Umfüllen der Abwurfbehälter ist nicht gestattet!



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.

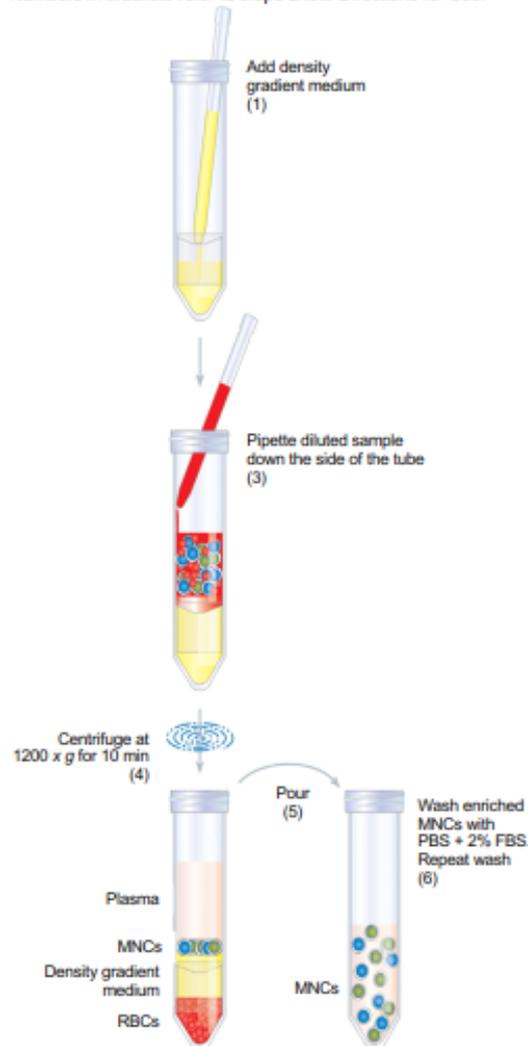


Table 1: Density Gradient Medium Volumes

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-SOP-01_Anlage 4: 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

Anweisung für Patient*innen zur Gewinnung von Mittelstrahlurin

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 Urinbeckers 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 aus z. B. technischen Gründen keine Dokumentation über ein LIMS möglich ist, bitte auf diesem Formular notieren:
 - Uhrzeit der Uringewinnung: _____
 - Besondere Auffälligkeiten (Trübungen, Blutbeimengungen, etc.):

Entnahmeprotokoll Blut (1/2):

(wird auf der Station/in der Ambulanz ausgefüllt)

Pro Probe 4 gleiche Etiketten der Proben-ID verwenden!

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

Identifikation der Proben:

1. Monovette für Serum

2. Citrat-Monovette für Plasma

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

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

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

6. RNA-Blut (PAXgene®)

Patient*innen-ID

Kit-ID

Proben-ID
Monovette für Serum

Proben-ID
Citrat-Monovette für Plasma

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

Proben-ID
EDTA-Monovette für
Plasma + Zellen

Proben-ID
CPT™ für PBMCs

Proben-ID
RNA-Blut

Abnahmereihenfolge

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

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

Ernährung parenteral? ja nein

Position bei Blutentnahme sitzend liegend

Dauer der Position des/der Patienten*Patientin vor Blutentnahme: (min) _____

Besonderheiten bei der Blutentnahme (z. B. Wärmeanwendung, Pumpen, längere Stauung, forciertes Aspirieren, Schwäche des Probanden, 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)

Kit-ID

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

Proben-ID
CPT™ für PBMCs

6. RNA-Blut (PAXgene®)

Proben-ID
RNA-Blut

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

Probenverarbeitung BlutUhrzeit Beginn Blutentnahme: ||||| (hh:mm)Proben-ID
Monovette für Serum**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

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 (freie Texteingabe):

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

Probenverarbeitung BlutUhrzeit Beginn Blutentnahme: ||||| (hh:mm)Proben-ID
Citrat-Monovette für
Plasma**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 Hämolytisch

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 (freie Texteingabe):

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

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

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

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

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Gewinnung Überstand Plasma, Aliquotierung (erfolgt nicht bei CPT™)

Zeitpunkt Beginn Zentrifugation:

Datum: ||-||-|||||| (DD-MM-YYYY)Uhrzeit: ||||| (hh:mm)Auffälligkeiten Probe: Lipämisch Ikterisch Hämolytisch

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 (freie Texteingabe):

**Probe: Heparin-Monovette oder EDTA-Monovette für Plasma + PBMCs
oder CPT™ für 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)

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 (freie Texteingabe):

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

Probenverarbeitung Blut

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

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

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 (freie Texteingabe):

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

Probenverarbeitung Blut**Uhrzeit Beginn Blutentnahme:** ||||| (hh:mm)Proben-ID
RNA-Blut**Probe: RNA-Blut**

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

→ Einfrieren des Röhrchens ohne Verarbeitung

Zeitpunkt Einfrieren -20°C:

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

Zeitpunkt Einfrieren -80°C:

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

Bemerkungen (freie Texteingabe):

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

Entnahmeprotokoll Bioprobe (1/2) (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

Identifikation der Proben:

1. Oropharyngealabstrich oder Nasopharyngealabstrich oder Speichel

Proben-ID
Oropharyngealabstrich oder
Nasopharyngealabstrich oder
Speichel

2. Sofern Intensivpatient, statt 1.:
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)
oder Trachealsekret (ENTA)

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

3. Urin

- Anurie (wenn kein Urin verfügbar)

Proben-ID
Urin

4. Liquor

Proben-ID
Liquor

Dieses Dokument per Hauspost an die Studienassistentz senden

Entnahmeprotokoll Bioprobe (2/2) (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) (Speichel)
-- (DD-MM-YYYY) (Bronchoalveoläre Lavage)
-- (DD-MM-YYYY) (Trachealsekret)
-- (DD-MM-YYYY) (Urin)
-- (DD-MM-YYYY) (Liquor)

Uhrzeit der Probenahme (Bioprobe je nach Auswahl)

: (hh:mm) (Oropharyngealabstrich)
: (hh:mm) (Nasopharyngealabstrich)
: (hh:mm) (Speichel)
: (hh:mm) (Bronchoalveoläre Lavage)
: (hh:mm) (Trachealsekret)
: (hh:mm) (Urin)
: (hh:mm) (Liquor)

Nur relevant bei Uringewinnung:

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

Art der Uringewinnung: Mittelstrahlurin Dauerkatheter

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

3S

Probenverarbeitung Bioprobe (außer Blut):

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

Proben-ID
Oropharyngealabstrich oder
Nasopharyngealabstrich
oder Speichel

Kit-ID

Probe: Oropharyngealabstrich oder Nasopharyngealabstrich oder Speichel

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

**→ Oro- oder Nasopharyngealabstrich oder Speichel: Einfrieren ohne
Verarbeitung**

Zeitpunkt Einfrieren:

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

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

Eingefroren in:

-80°C

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Bemerkungen (freie Texteingabe):

**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): _____

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: _____

Zeitpunkt Einfrieren BALF:

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

Eingefroren in:

 -80°C N₂ Gasphase N₂ Flüssigphase

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

(wird im verarbeitenden Labor ausgefüllt)

Zeitpunkt Einfrieren BAL-Zellen:

Datum: -- (DD-MM-YYYY)

Uhrzeit: : (hh:mm)

Eingefroren in:

-80°C

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Besonderheiten beim Ausgangsmaterial:

Flockig Eitrig Schleimig Blutig Trüb Schaumig

Bemerkungen (freie Texteingabe):

**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

Anzahl Aliquote: || à 1,6 ml

Zeitpunkt Einfrieren:

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

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

Eingefroren in:

-80°C

N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

Besonderheiten beim Ausgangsmaterial:

Bemerkungen (freie Texteingabe):

**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 mlAnzahl 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 (freie Texteingabe):

**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)

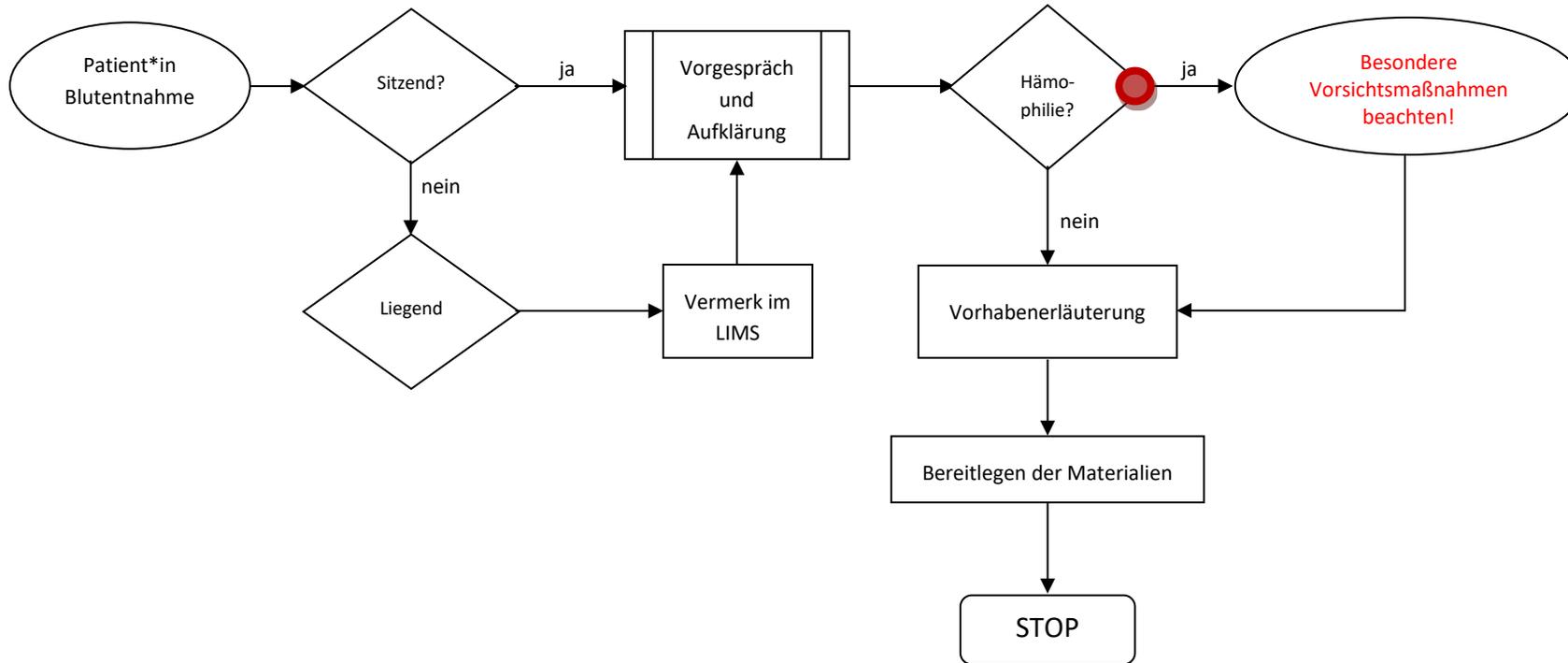
N₂ Gasphase

N₂ Flüssigphase

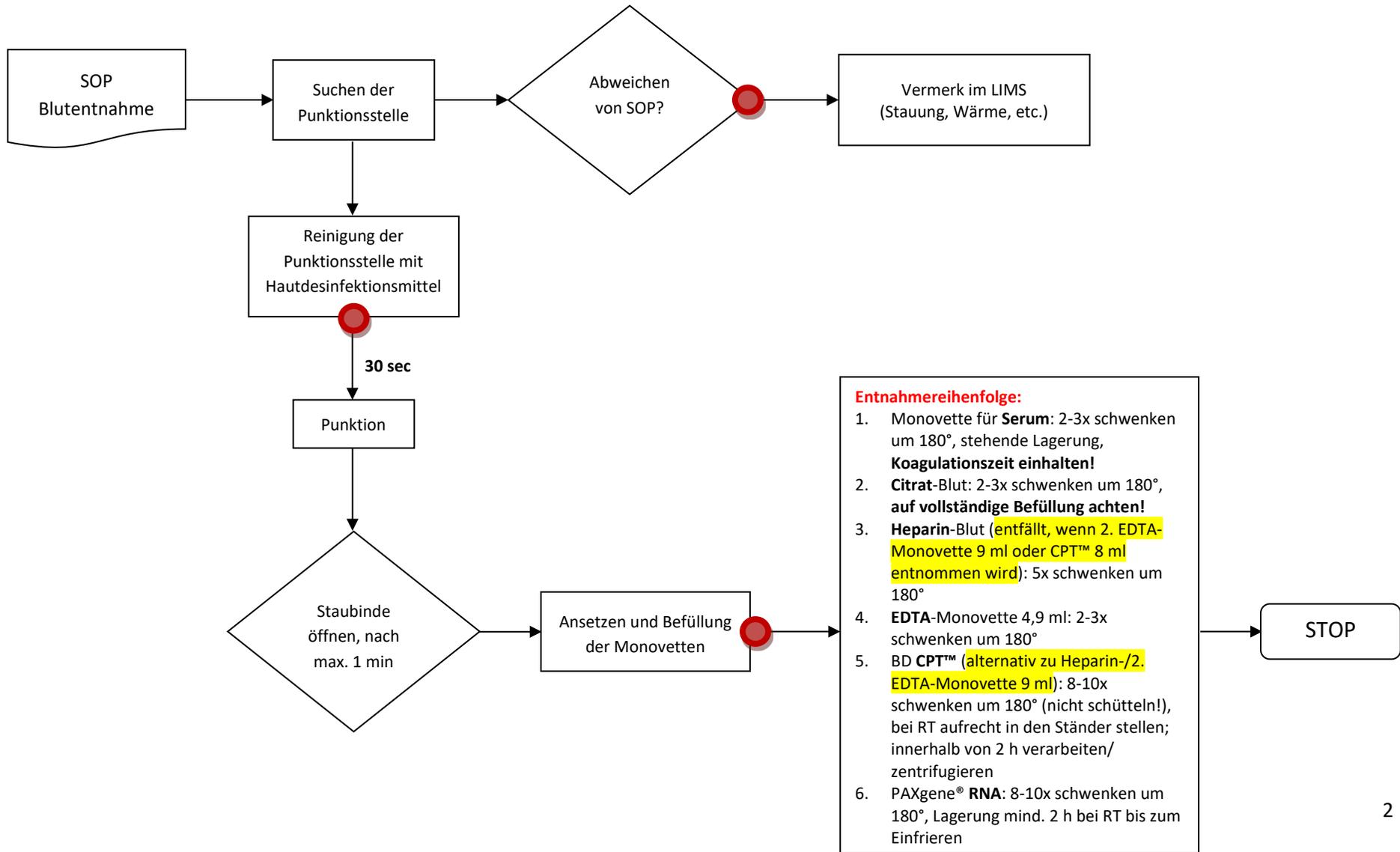
Bemerkungen (Freitext):

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

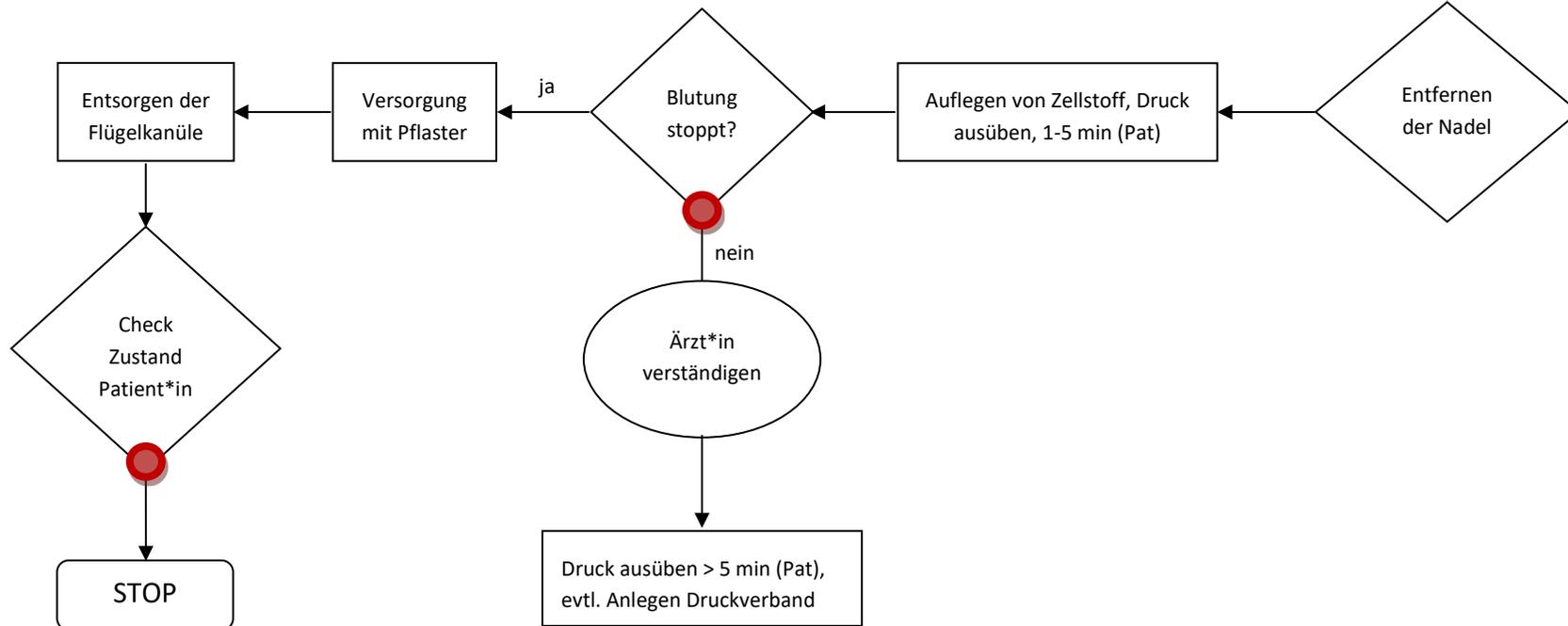
Flow Chart zur Blutentnahme: Vorbereitung



Flow Chart zur Blutentnahme

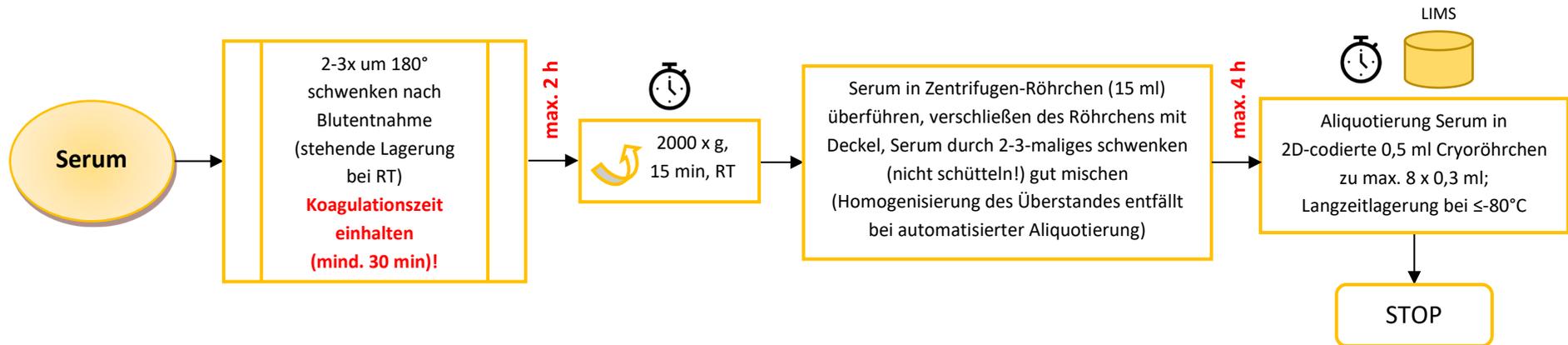


Flow Chart zur Blutentnahme Fortsetzung



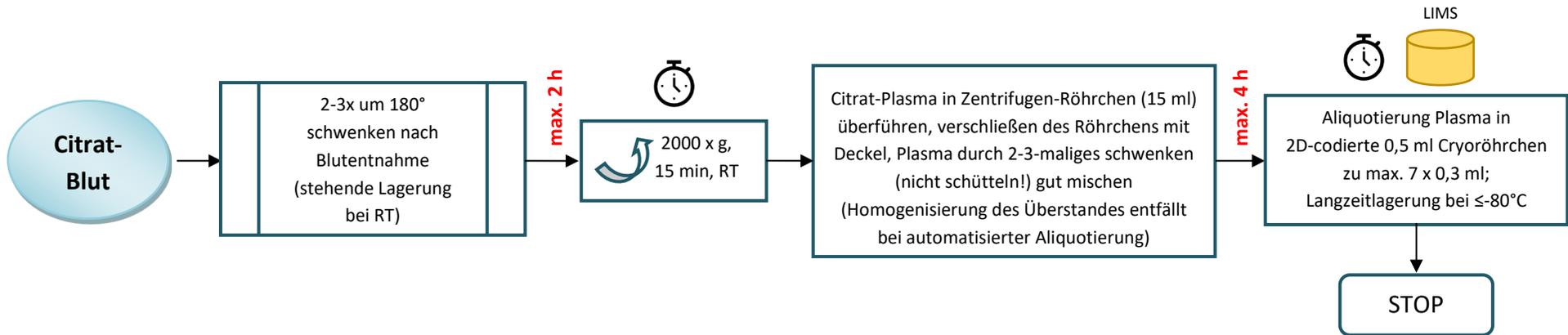
Flow Chart zur Blutverarbeitung Serum

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



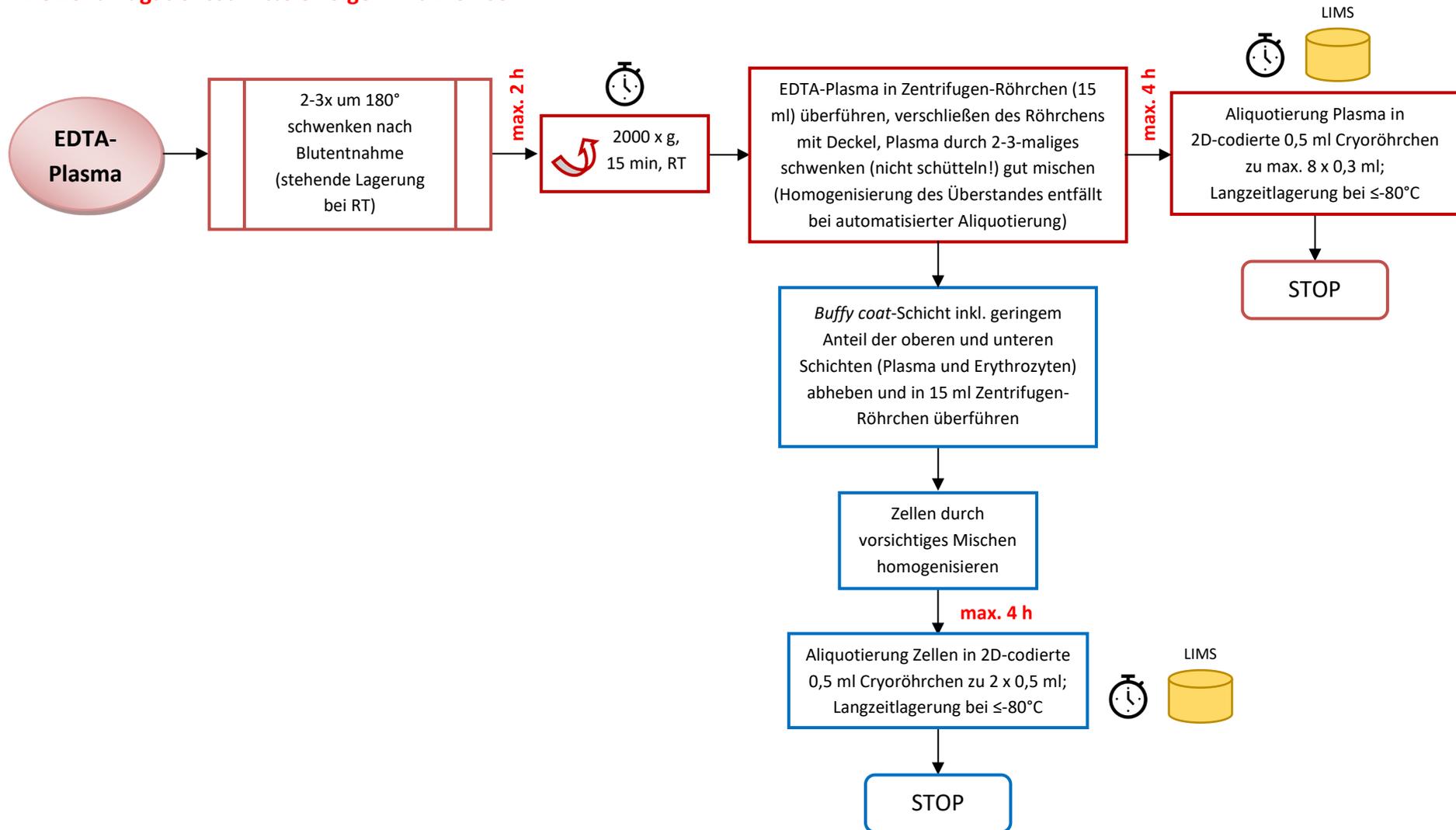
Flow Chart zur Blutverarbeitung Citrat-Plasma

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



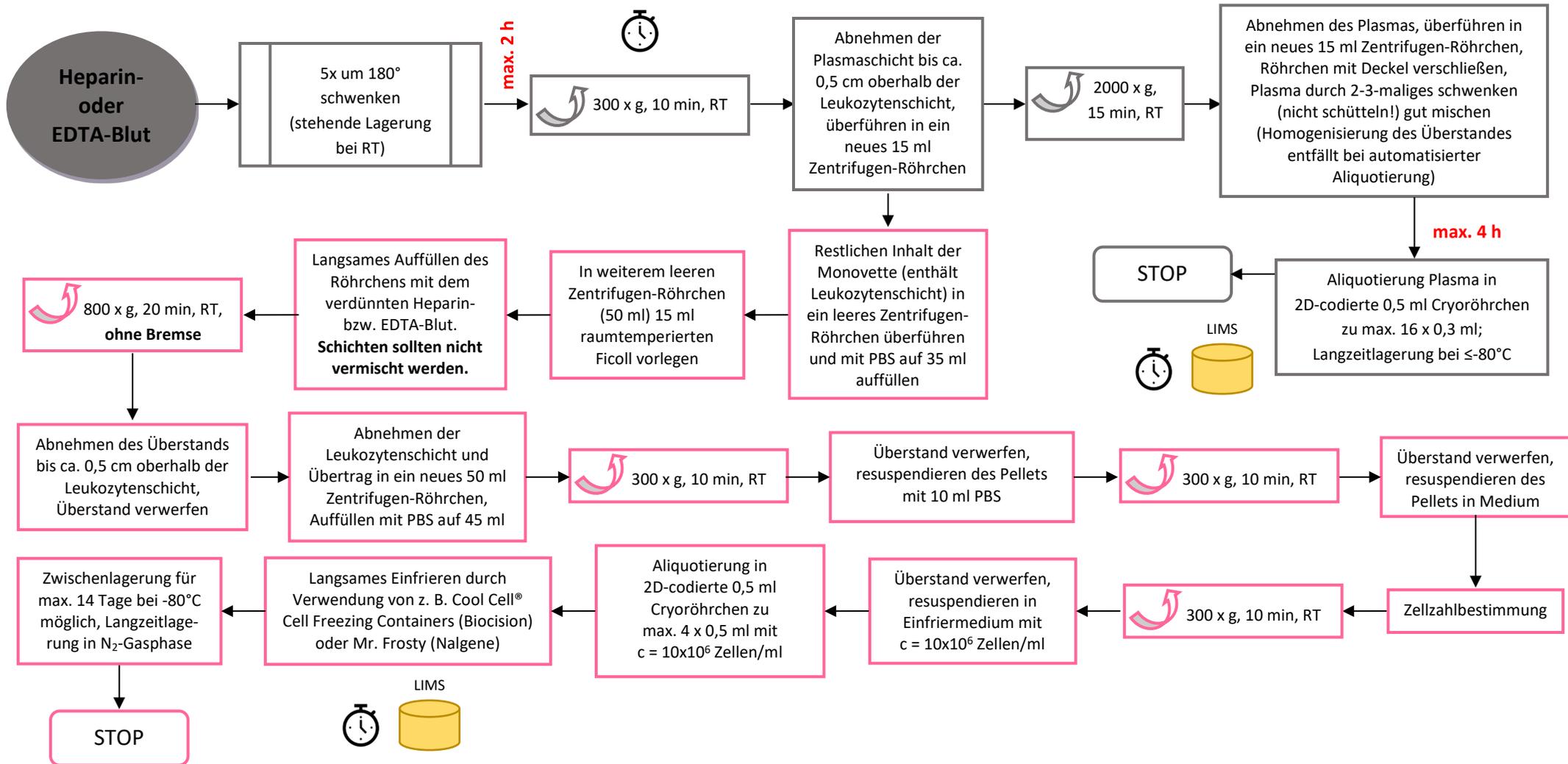
Flow Chart zur Blutverarbeitung EDTA-Plasma

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

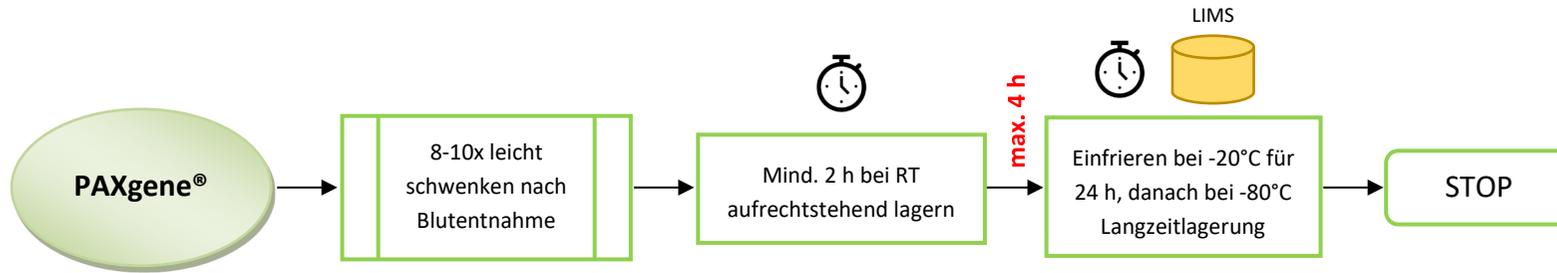


Flow Chart zur Probenverarbeitung von Heparin- oder EDTA-Blut zu Plasma und PBMCs

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse, sofern nicht anders angegeben.

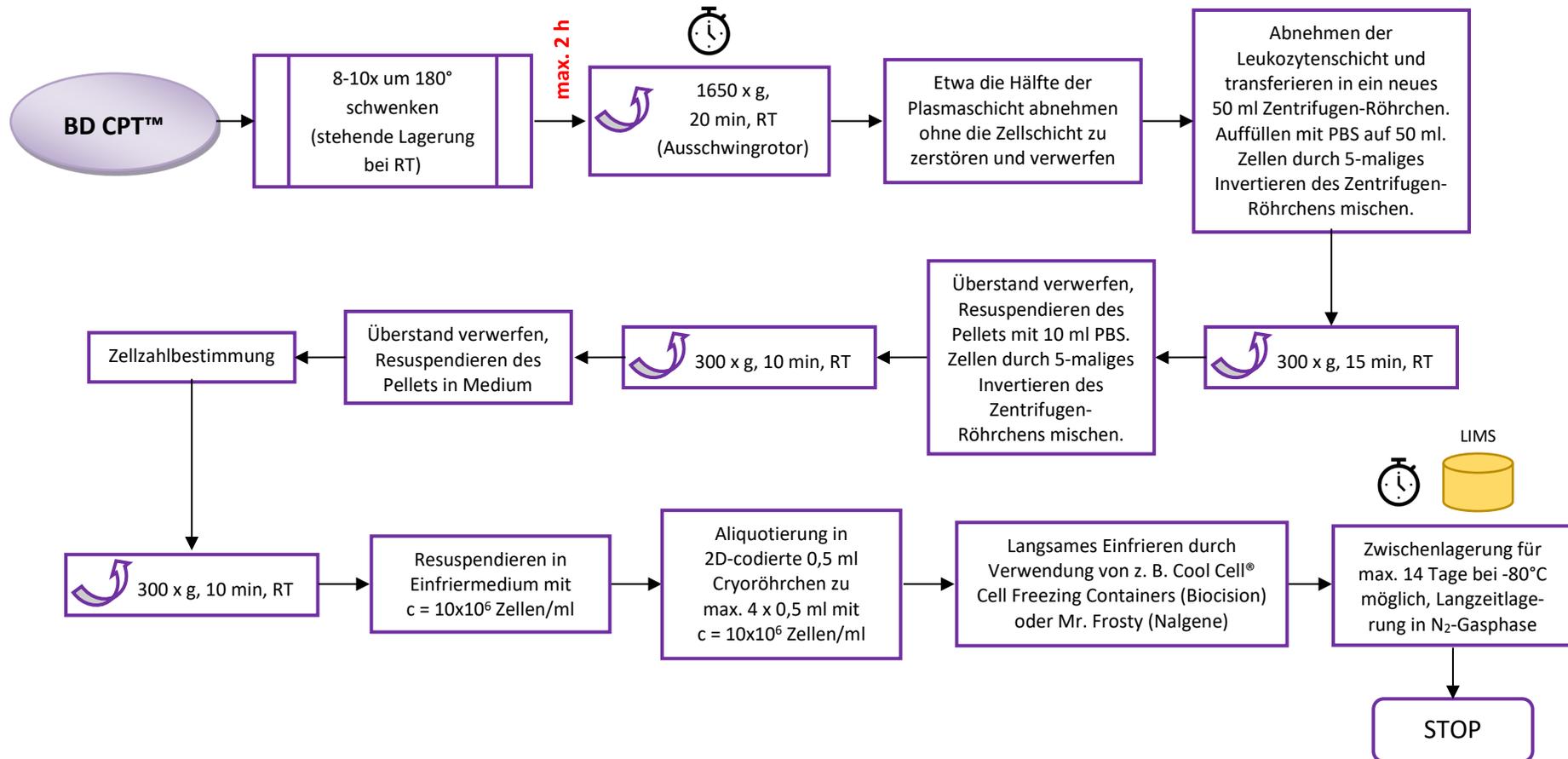


Flow Chart zur Probenverarbeitung RNA-Röhrchen PAXgene®

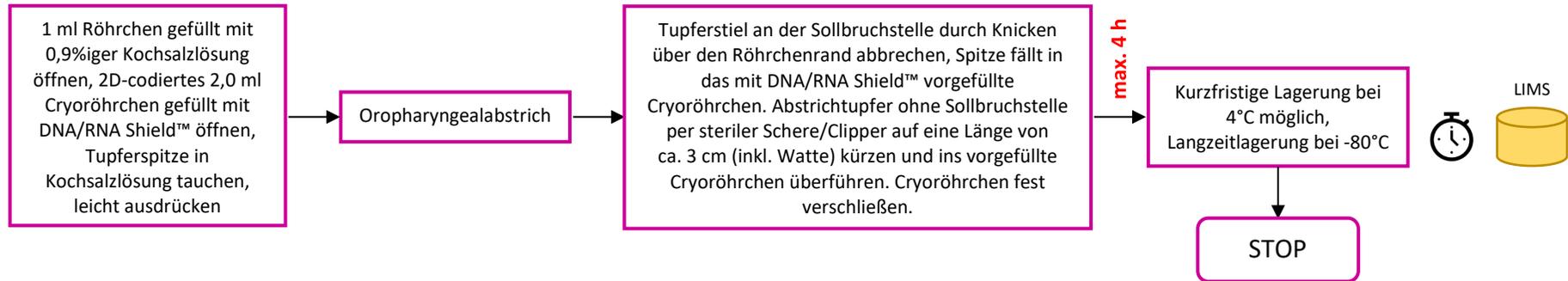


Flow Chart zur Probenverarbeitung von BD-CPT™ zu PBMCs

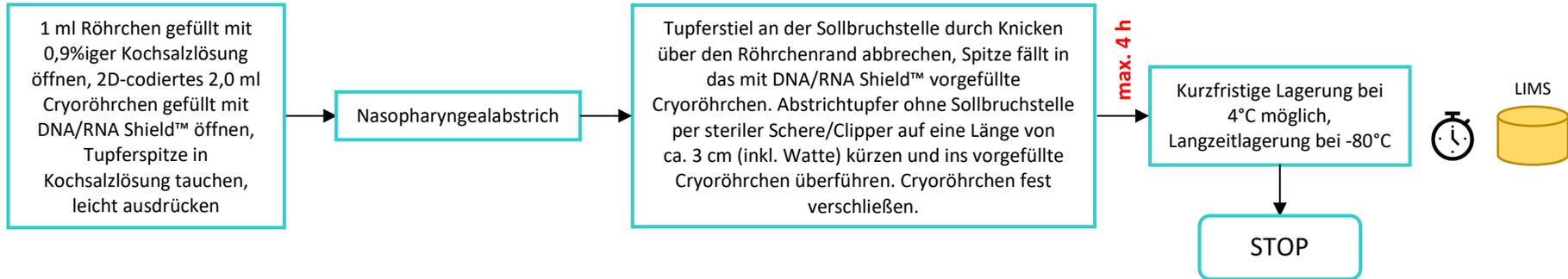
Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



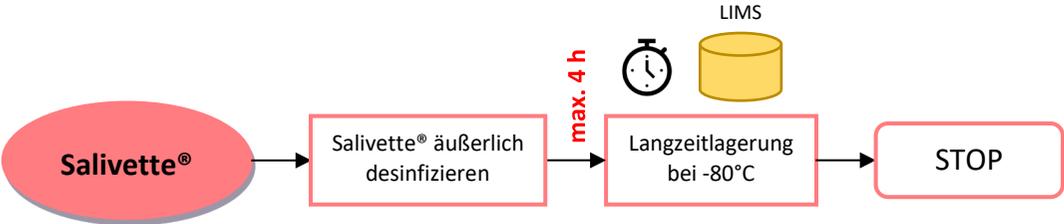
Flow Chart zur Gewinnung eines Oropharyngealabstrichs



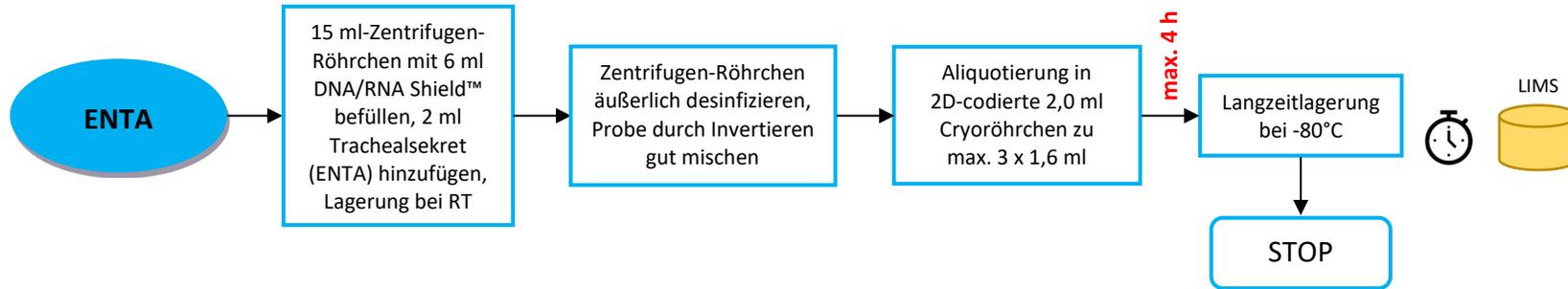
Flow Chart zur Gewinnung eines Nasopharyngealabstrichs



Flow Chart zur Probenverarbeitung von Speichel

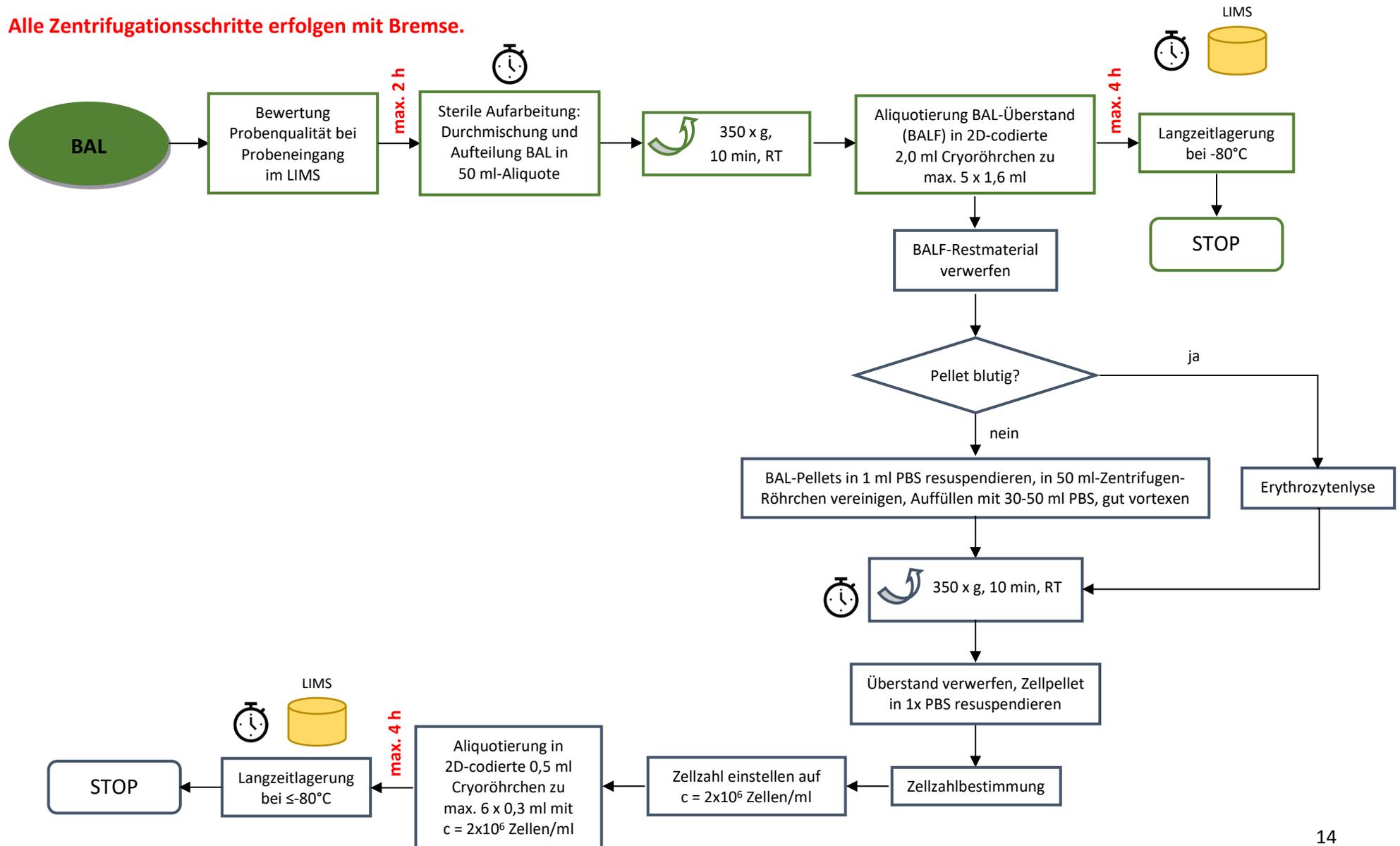


Flow Chart zur Probenverarbeitung von Trachealsekret (ENTA)



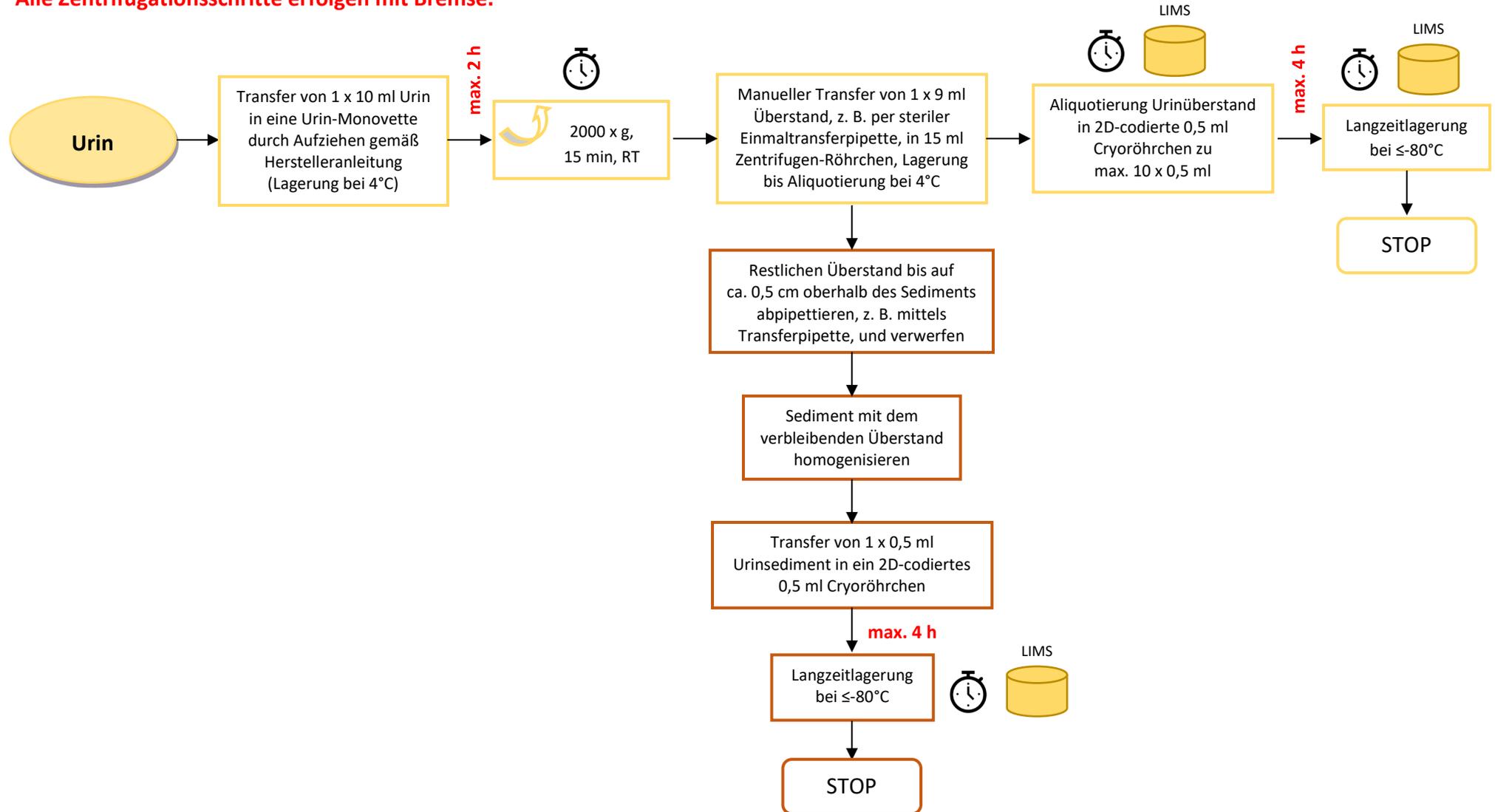
Flow Chart zur Probenverarbeitung von Bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



Flow Chart zur Urinverarbeitung

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.



Flow Chart zur Probenverarbeitung von Liquor

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen mit Bremse.

