

DZHK-SOP-B-02

Biomaterialverarbeitung

(DZHK Clinical Study Units)

Version: V2.2

Gültig ab: 27.05.2020

Ersetzte Version: V2.1

Vom: 19.02.2020

	Fachliche Autorenschaft	Fachliches Review	Zustimmung Bereichsleitung	Freigabe DZHK
Name	Tanja Zeller	Tanja Heimberger	Matthias Nauck	Frank Edelmann
Datum	28.1.2020	31.01.2020	22.7.2020	23.7.20
Unterschrift				

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Abkürzungsverzeichnis	3
2 Änderung zur vorherigen Version.....	3
3 Einleitung zur SOP	3
3.1 Zielsetzung.....	3
3.2 Hintergrund	3
3.3 Begriffe und Definitionen	3
4 DZHK Basis-Biomaterialsammlung	4
5 Voraussetzungen für Biomaterialverarbeitung und Dokumentation	4
6 Ablauf der Probenverarbeitung und Dokumentation im DZHK-LIMS.....	6
6.1 Vorgaben	6
6.2 Flow-Chart	6
6.3 Ablauf der Probenverarbeitung und Dokumentation im Detail	6
6.4 Verarbeitungszeiten und Lagerung - Probenqualitäten	8
6.5 Verhalten bei Abweichung	8
7 Literatur / Quellen.....	8
8 Querverweise zu bestehenden DZHK-SOPs.....	9
9 An der SOP-Schreibung beteiligte Personen	9

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Klartext
SOP	Standardarbeitsanweisung, engl. Standard Operating Procedure
DZHK	Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V.
BMS	Biomaterialsammlung
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
LIMS	Laborinformationsmanagementsystem

2 Änderung zur vorherigen Version

Änderung der Bezeichnung interne Zentren zu DZHK Clinical Study Unit.

3 Einleitung zur SOP

3.1 Zielsetzung

Diese Standardarbeitsanweisung beschreibt die Verarbeitung und Lagerung des im Rahmen von DZHK-Projekten (i.d.R. einer klinischen Studie, eines Registers oder einer Kohorte) gewonnenen Bioproben für das Anlegen einer DZHK-Biomaterialsammlung unter standardisierten Bedingungen.

Kernelemente sind in dieser SOP grau unterlegt.

3.2 Hintergrund

In wissenschaftlichen Studien werden verschiedene Ansätze zur Untersuchung von humanen Biomaterialien verwendet, wie z.B. Bestimmung von (zirkulierenden) Biomarkern, Bestimmung von Standardlaborwerten, OMICs Verfahren, DNA-/RNA-Gewinnung oder „Biomonitoring“, für die eine hohe Probenqualität die Basis ist. Um präanalytische Faktoren, welche einen wesentlichen Einfluss auf die Probenqualität nehmen, zu minimieren, müssen die Schritte der Gewinnung, Prozessierung und Lagerung standardisiert nach DZHK-SOP erfolgen. Diese Standardisierung sichert nicht nur, dass möglichst viele der oben genannten Techniken auch nach langfristiger Lagerung von Biomaterialien noch durchgeführt werden können, sondern ermöglicht auch die Vergleichbarkeit der an den unterschiedlichen DZHK-Zentren prozessierten und gelagerten Biomaterialien sowie der gewonnenen Analysedaten im Rahmen von Nachnutzungsprojekten.

3.3 Begriffe und Definitionen

Biomaterialien sind z.B. Blut, Urin, Stuhl und Gewebe sowie die nach Verarbeitung entstandenen Materialien (z.B. Plasma, Serum, gewonnene DNA, RNA, Stammzellen).

Unter einer **Biomaterialsammlung (BMS)** ist die Lagerung von Biomaterialien sowie die Speicherung von Qualitätsmerkmalen des Biomaterials und zugehörige Informationen zu verstehen. Die Biomaterialien werden bei mindestens -80°C gelagert (z.B. in Tiefkühlschränken oder automatisiertem Kryolager).

DZHK-Biomaterial ist das Biomaterial, das im Rahmen eines DZHK-Projektes (i.d.R. einer klinischen Studie, einem Register oder einer Kohorte) von jedem Patienten/Probanden entnommen und Eigentum des DZHK wird und somit der DZHK-Nutzungsordnung unterliegt. Die zu entnehmende Biomaterialmenge für Blut errechnet sich aus der studienübergreifenden und der studienspezifischen Menge (DZHK-Basismenge bzw. DZHK-Studienmenge), die verarbeitet und gelagert werden müssen.

Studienübergreifende Biomaterialien, die unabhängig von einer konkreten Studie gesammelt werden, werden als **DZHK Basis-Set** bezeichnet. Die **DZHK Basis-Biomaterialsammlung** umfasst alle DZHK Basis-Sets der verschiedenen DZHK-Studien.

Studien-spezifische Biomaterialien, die zusätzlich zum DZHK Basis-Set für die Beantwortung der Studienfragestellung gesammelt werden, werden als **DZHK Studien-spezifische Sets** bezeichnet. Die **DZHK Studien-spezifische Biomaterialsammlung** umfasst alle DZHK Studien-spezifischen Sets der verschiedenen DZHK-Studien.

DZHK-LIMS: Das zentrale Laborinformationssystem CentraXX dient der Prozesssteuerung und Dokumentation der Probengewinnung, -verarbeitung, -lagerung und -abgabe.

4 DZHK Basis-Biomaterialsammlung

Von jedem Patienten/Probanden, der an einer DZHK-Studie, einem Register und/oder einer Kohorte teilnimmt wird zur Baseline Untersuchung ein DZHK Basis-Set abgenommen, sofern der Patient/Proband entsprechend eingewilligt hat. Das gewonnene Biomaterial wird verarbeitet und prospektiv eingelagert. Die Zusammensetzung des DZHK Basis-Sets ist studienunabhängig festgelegt und in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1 Primärgefäß, Volumen und Anzahl in der DZHK Basis-Biomaterialsammlung

	Primärgefäß	BD		Sarstedt	
		Volumen	Anzahl	Volumen	Anzahl
DZHK Basis-Set	Serum	10,0 ml	1	7,5 ml	1
	EDTA	10,0 ml	1	7,5 ml	1
	Citrat	2,7 ml	1	3,0 ml	1
	Urin	11,0 ml	1	10,0 ml	1

Im Rahmen einer DZHK-Studie, einem Register und/oder einer Kohorte können neben dem DZHK Basis-Set noch ein oder mehrere studien-spezifischen Sets abgenommen werden. Die Zusammensetzung dieses studien-spezifischen Sets obliegt dem Verantwortlichen Principle Investigator der jeweiligen Studie und wird den teilnehmenden Studienzentren vor Beginn der Studie mitgeteilt.

5 Voraussetzungen für Biomaterialverarbeitung und Dokumentation

Um die Probenverarbeitung und -lagerung für das DZHK Basis-Set und ggf. Studien-Set durchzuführen werden folgende Voraussetzungen benötigt:

- Zugang zum DZHK-LIMS mit Nutzerrolle MTLA
- Abgeschlossene Dokumentation der Probengewinnung durch Study Nurse
- Handscanner zum Scannen der Identifikationscodes (Proben IDs)
- Zentrifuge (gekühlt oder ungekühlt)
- Kalibrierte Pipetten
- Gefrierschrank -80°C mit Anschluss an Überwachungssystem und Ausfallsicherungskonzept
- Primärproben aus DZHK Basis-/Studien-spezifisches Set
- Aliquotgefäße (300 µl tubes) auf 96well Rack (Brooks, ehem. FluidX oder LVL) folgend dargestellt:



Abb. 1: Beispiel Aliquotgefäße 300 µl von Brooks (ehem. FluidX), analog dazu LVL (Informationen zur Bestellung sind im Foliensatz „DZHK Biobanking“ zu finden: <https://dzhk.de/das-dzhk/klinische-dzhk-studien/4-biobanking-lims/>)

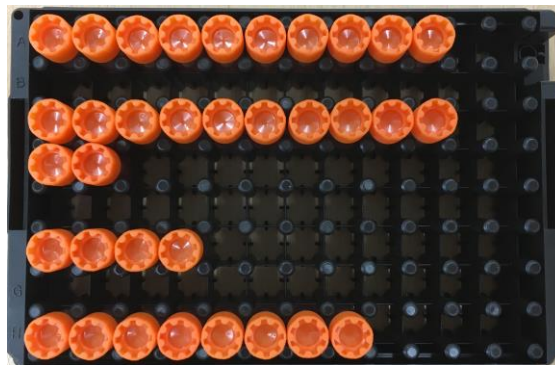


Abb. 2: Standard-Positionen der Aliquotgefäße auf dem Rack zur Erfassung im DZHK-LIMS

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serum (10 x 300µl)	A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	B												
EDTA-Plasma (10 x 300µl)	C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>										
Buffy Coat* (2 x bis 300µl)	E												
	F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>								
Citrat (4 x 300µl)	G												
	H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				

Abb. 3: Schematische Darstellung der Standard-Positionen der Aliquotgefäße auf dem Rack mit Probenart (*entfällt bei Einfrieren des entsprechenden Primärrohrchens vor Pipettieren des Buffy Coats, siehe auch Abschnitt 6.3)

6 Ablauf der Probenverarbeitung und Dokumentation im DZHK-LIMS

6.1 Vorgaben

Die Biomaterialverarbeitung muss durch geschultes Personal gemäß dieser SOP erfolgen. Folgende Vorgaben sind außerdem zu beachten:

- Regelmäßige Arbeitsflächendesinfektion
- Einhaltung gängiger Hygienevorschriften

6.2 Flow-Chart

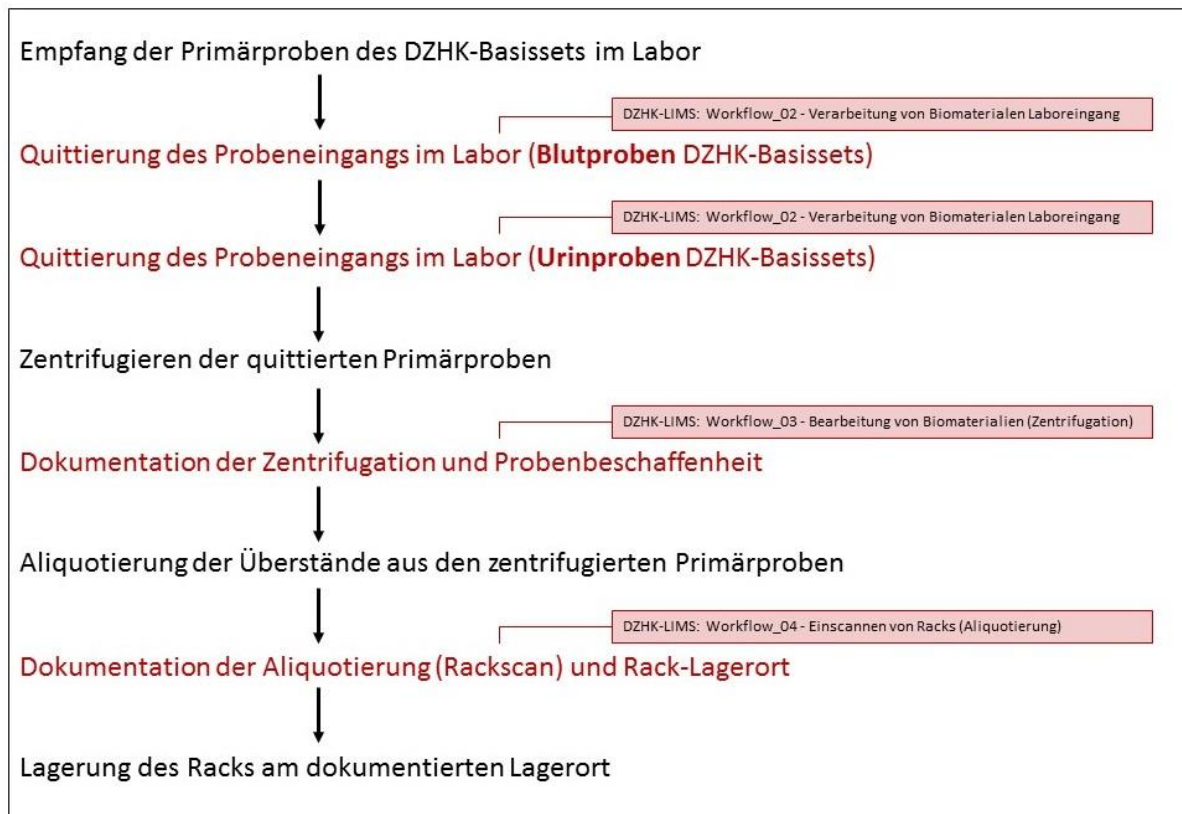


Abb.4: Ablauf Verarbeitung von Biomaterialien im Überblick

6.3 Ablauf der Probenverarbeitung und Dokumentation im Detail

Nach **Probeneingang im Labor** den Laboreingang im DZHK-LIMS quittieren:

- Hierfür die Identifikationscodes der Primärgefäße mit dem Handscanner scannen (KEINE manuelle ID-Eingabe).
- Abgleich Anzahl Primärgefäße: Werden mehr Primärproben des Sets gelistet als physisch vorliegen, müssen diese Primärproben aus dem DZHK-LIMS gelöscht werden (dieser Schritt sollte bereits durch die Study Nurse erfolgt sein. Wenn nicht, kann das Vorgehen dem Manual „MTLA – Kurzanleitung DZHK-LIMS“ entnommen werden).

Nachdem der Probeneingang im Labor quittiert wurde, erfolgt die **Zentrifugation der Proben**:

- Die Primärgefäße sind innerhalb von 60 Minuten nach Probengewinnung zu verarbeiten.
- Für die Zentrifugation der Primärproben muss eine der zwei folgenden Zentrifugationsarten genutzt werden: 2.000 g für 10 Minuten ODER 3.000 g für 5 Minuten.

- Die Zentrifugation kann entweder in gekühlten Zentrifugen ODER ungekühlten Zentrifugen erfolgen. Bei gekühlten Zentrifugationen ist die Temperatur auf 18°C einzustellen. Ungekühlte Zentrifugen sind auf Raumtemperatur (RT) einzustellen. Die jeweilige Zentrifuge nach jedem Lauf abkühlen lassen.
- Die Zentrifugationsart, der Zentrifugationszeitpunkt (Ende der Zentrifugation) sowie die Beschaffenheit jeder zentrifugierten Primärprobe (Blut: unauffällig, hämolytisch, ikterisch, lipämisch und Urin: unauffällig, trüb, blutig) werden im DZHK-LIMS dokumentiert.

Aliquotierung der Überstände nach der Zentrifugation:

- Aliquotierung von 300 µl-Portionen in entsprechende Aliquotgefäße.
- Der Buffy Coat wird aus dem EDTA-Plasma Primärröhrchen gewonnen. Wenn nicht ausreichend Material vorhanden ist, kann das Aliquotgefäß auch mit weniger als 300 µl Buffy Coat befüllt werden.
Es ist auch möglich nach Pipettieren des Überstandes (Plasma-Aliquote) das Primärröhrchen mit dem restlichen Volumen einzufrieren und das Material für eine spätere DNA Isolation zu verwenden. Bei diesem Vorgehen ist eine vom Standardprozess abweichende Dokumentation im DZHK-LIMS notwendig, der dem Leitfaden „Kurzanleitung LIMS – MTLA“ entnommen werden kann.
(In Ausnahmefällen kann anstelle des EDTA-Plasma Primärröhrchens auch Citratblut verwendet werden.)
- Verschluss der Aliquotgefäße.
- Leere Aliquotgefäße aus dem Rack entfernen.

Rack mit den befüllten Aliquoten mittels Rackscanner einscannen und im DZHK-LIMS dokumentieren:

- Primärgefäß scannen und einer Zeile Aliquotgefäße auf dem Rack zuordnen (siehe Abb. 5 und auch MTLA – Kurzanleitung DZHK-LIMS)

	Stammprobe:	Probenvorlage:
A	1000720001	FluidX-Aliquot 300µl Serum
B		Bitte wählen Sie...
C	1000720102	FluidX-Aliquot 300µl EDTA-Plasma
D	1000720102	FluidX-Aliquot 300µl Buffy Coat
E		Bitte wählen Sie...
F	1000720203	FluidX-Aliquot 300µl Citrat
G		Bitte wählen Sie...
H	1000720404	FluidX-Aliquot 300µl Urin

Abb. 5: Screenshot DZHK-LIMS Aliquotdokumentation. Links Scannen des Identifikationscodes der Primärgefäße und rechts Zuweisung der abgebildeten Aliquotvorlagen („FluidX-Aliquot 300 µl ...“) je nach Probenart

- Dokumentation des Lagerortes und des Einlagerungszeitpunktes im DZHK-LIMS (ggf. manuelle Anpassung des Aliquotierzeitpunktes).
- Lokale Lagerung der Probenaliquote bei -80°C am dokumentierten Lagerort.

6.4 Verarbeitungszeiten und Lagerung - Probenqualitäten

Die Dauer der Probenverarbeitung sowie die Lagerkonditionen nehmen einen wesentlichen Einfluss auf die Probenqualität. Liegt mindestens eine der folgend gelisteten Bedingungen vor (*Dokumentation gefordert, siehe Abschnitt 6.7), wird die Probe damit in das jeweilige Qualitätslevel eingestuft:

DZHK Qualitätslevel Stufe 1

- Das Primärgefäß wurde nicht innerhalb von 60min nach Probengewinnung verarbeitet.*
- Das Probenaliquot wurde über 6h bei -20°C zwischengelagert.*
- Die Gesamtdauer von Biomaterialgewinnung, -verarbeitung und Einlagerung bei -80°C betrug über 240min.

DZHK Qualitätslevel Stufe 2

- Das Probenaliquot wurde bis max. 6h bei -20°C zwischengelagert.*
- Die Gesamtdauer von Biomaterialgewinnung, -verarbeitung und Einlagerung bei -80°C betrug max. 240min.

DZHK Qualitätslevel Stufe 3

- Die Gesamtdauer von Biomaterialgewinnung, -verarbeitung und Einlagerung bei -80°C betrug max. 120min.

Die Aliquote der DZHK Basis-Sets können im Anschluss an die Erfassung von 2-3 Patienten auf einem Rack verdichtet werden. Hierfür kann das Manual „MTLA- Kurzanleitung DZHK-LIMS“ genutzt werden. Bitte ausschließlich Proben der DZHK Basis-Sets auf einem Rack verdichten, **NICHT mit den DZHK Studien-spezifischen Proben mischen.**

6.5 Verhalten bei Abweichung

Abweichungen von den oben beschriebenen Vorgaben müssen unter „Besonderheiten“ im Rahmen des Laboreingangs (Workflow_02) im DZHK-LIMS festgehalten werden.

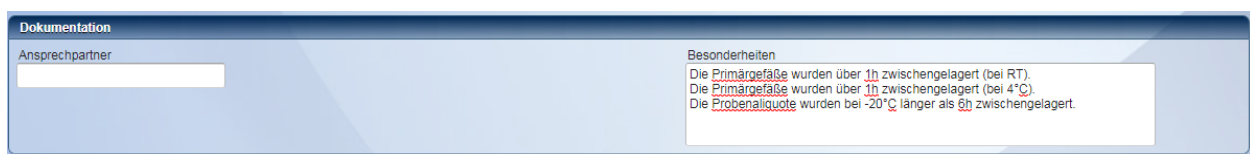


Abb.6: Beispiele für SOP-Abweichungen und deren Dokumentation unter „Besonderheiten“.

Abweichungen von den Vorgaben dieser SOP können auch im Nachgang noch dokumentiert werden (Erläuterung der Benutzerschritte im Manual „MTLA – Kurzanleitung DZHK-LIMS“).

7 Literatur / Quellen

Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Rili-BÄK). Deutsches Ärzteblatt | DOI: 10.3238 / arztebl.2019.rili_baek_QS_Labor20192312

8 Querverweise zu bestehenden DZHK-SOPs

Gültig ist die aktuellste, verfügbare Version.

SOP-ID	Titel
DZHK-SOP-B-01	Gewinnung von Biomaterialien aus Blut und Urin_int

9 An der SOP-Schreibung beteiligte Personen

Name	Funktion	Beteiligung
Prof. Dr. Tanja Zeller	AG-Leiterin, Autorin der SOP	SOP-Erstellung
Prof. Dr. Matthias Nauck	Leiter „Scientific Infrastructure“	Fachliche Prüfung
Dr. Nadine Umbach	AG-Mitglied, Reviewer	Fachliche Prüfung
Dr. Julia Hoffmann	AG-Mitglied, Koordinatorin	Fachliche Prüfung
Dr. Jennifer Franke	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Dr. Christian Geier	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Sabine Hübler	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Christian Schäfer	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Antje Müller	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
PD Dr. Astrid Petersmann	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
PD Dr. Thomas Pickardt	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Prof. Dr. Daniel Teupser	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Prof. Dr. Christian Troidl	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Dr. Tanja Weis	AG-Mitglied	Fachliche Prüfung
Prof. Dr. Frank Edelmann	Klinischer Sprecher WGCR	Fachliche Prüfung
Dr. Tanja Heimberger	Koordination Biobank Heidelberg	Fachliche Prüfung
Dr. Ivonne Wallrabenstein	DZHK Gst., DZHK Biobanking	SOP-Anpassungen