

DZHK-SOP-B-02

Bioprobenverarbeitung

(DZHK Clinical Study Units)

Version: V2.3

Gültig ab: 01.12.2023

Ersetzte Version: V2.2

Vom: 27.05.2020

Hinweis: Ausdrücke unterliegen nicht dem Aktualisierungsprozess!

Änderungshinweis: Änderungen Wording
Redaktionelle Änderungen

	Fachliche Autorenschaft	Fachliches Review	Zustimmung WGCR Sprecher:in	Freigabe DZHK
Name	Tanja Zeller	Ivonne Wallrabenstein	Sabine Hanß	Katharina Eulenburg
Datum				
Unterschrift	Diese SOP ist aufgrund überwiegend redaktioneller Änderungen ohne Unterschriften gültig.			

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Abkürzungsverzeichnis.....	3
1.2 Zielsetzung.....	3
1.3 Hintergrund.....	3
1.4 Begriffe und Definitionen.....	3
2 DZHK-Set.....	4
3 Voraussetzungen für Bioprobenverarbeitung und Dokumentation.....	4
4 Ablauf der Probenverarbeitung und Dokumentation im DZHK-LIMS.....	5
4.1 Vorgaben.....	5
4.2 Flow-Chart.....	6
4.3 Ablauf der Probenverarbeitung und Dokumentation im Detail	6
4.4 Verarbeitungszeiten und Lagerung - Probenqualitäten.....	7
5 Literatur / Quellen.....	8
6 Querverweise zu bestehenden DZHK-SOPs.....	8
7 Änderungen	8
8 Beteiligte Personen	8
9 Anlagen.....	9
9.1 Freigabe Vorversion.....	9

1 Einleitung

1.1 Abkürzungsverzeichnis

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

1.2 Zielsetzung

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

Kernelemente sind in dieser SOP grau unterlegt.

1.3 Hintergrund

In wissenschaftlichen Studien werden verschiedene Ansätze zur Untersuchung von humanen Bioproben 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-SOPs erfolgen. Diese Standardisierung sichert nicht nur, dass möglichst viele der oben genannten Techniken auch nach langfristiger Lagerung der Bioproben noch durchgeführt werden können, sondern ermöglicht im späteren Verlauf auch die Vergleichbarkeit gewonnener Analysedaten, der an den unterschiedlichen Studienzentren prozessierten und gelagerten Bioproben.

1.4 Begriffe und Definitionen

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

DZHK-Biobanking¹ für die DZHK Heart Bank

Die [DZHK Heart Bank](#) vereint wertvolle Ressourcen von Bioproben, assoziierten klinischen Daten, Bilddaten sowie genomischen Daten, die im Rahmen von DZHK-Projekten sowie weiteren Projekten zusammengetragen werden. Damit soll ein nachhaltiger Beitrag zur Forschung und Verbesserung der Gesundheit geleistet werden. Die zweckoffene Ressource steht weltweit für Forschungsprojekte zur Verfügung. Das DZHK-Biobanking wird mit einem fest definierten **DZHK-Set²** durchgeführt. Die DZHK Heart Bank enthält alle gewonnenen DZHK-Sets.

¹ Ehemals „DZHK-Basis-Biobanking“

² Ehemals „DZHK-Basis-Set“

Studienbiobanking³ zur Beantwortung der Studienfrage

Neben dem DZHK-Set kann eine studienspezifische Probengewinnung gemäß der hier vorliegenden SOP notwendig sein. Die Zusammensetzung dieser **Studien-Sets⁴** sowie die Festlegung der Entnahmezeitpunkte obliegt dem verantwortlichen Principle Investigator des jeweiligen DZHK-Projekts und wird den teilnehmenden Studienzentren spätestens zur Initiierungsveranstaltung mitgeteilt.

DZHK-LIMS

Als zentrales DZHK-LIMS wird die Software „CentraXX“ verwendet. Sie dient der Prozesssteuerung und Dokumentation der Probengewinnung, -verarbeitung, -einlagerung und -auslagerung. Für jede Bioprobe wird ein definiertes Bioprobendatenset gespeichert. Hierüber wird im Nachgang automatisiert das Qualitätslevel der einzelnen Bioproben zur Nachnutzung für weitere Forschungsprojekte ermittelt.

2 DZHK-Set

Von jede:r Teilnehmer:in eines DZHK-Projekts wird **einmalig zur Baseline-Visite (vor Intervention) ein einheitliches DZHK-Set** abgenommen, sofern der:die Teilnehmer:in eingewilligt hat. Die Zusammensetzung des DZHK-Sets ist folgend in Tabelle 1 gelistet. Je nach etablierten Klinikroutinen können entweder Gefäße der Firma BD oder der Firma Sarstedt verwendet werden.

Tabelle 1 Typ, Volumen und Anzahl der Primärgefäße

	Primärgefäß	BD		Sarstedt	
		Volumen	Anzahl	Volumen	Anzahl
DZHK-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

3 Voraussetzungen für Bioprobenverarbeitung und Dokumentation

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

- Zugang zum DZHK-LIMS mit Nutzerrolle MTLA
- Abgeschlossene Dokumentation der Probengewinnung (Workflow 1 im DZHK-LIMS)
- Handscanner zum Scannen der Identifikationscodes (Proben IDs)
- Zentrifuge (gekühlt oder ungekühlt)
- Kalibrierte Pipetten
- Gefrierschrank -80°C mit Anschluss an Überwachungssystem und Ausfallsicherungskonzept
- Befüllte Primärgefäße aus DZHK-Set und/oder ggf. Studien-Set
- Aliquotgefäße auf 96-well Rack, die in den folgenden Abbildungen für das DZHK-Set dargestellt sind. Bei der Bestellung der Aliquotgefäße ist unbedingt das vom Hersteller angegebene

³ Ehemals „Studienspezifisches Biobanking“

⁴ Ehemals „Studienspezifisches Set“

Arbeitsvolumen zu beachten, das mindestens 300 µl betragen muss, da die Aliquotierung immer mit einer fest definierten Pipettiermenge von 300 µl erfolgt und die Flüssigkeit während des Gefrierens zusätzlich ausreichend Raum zum Ausdehnen benötigt. Unterstützung zur Bestellung sind im Foliensatz „[DZHK-Biobanking](#)“ zu finden.



Abb. 1: Beispiel Aliquotgefäße von Azenta (ehemals Brooks bzw. FluidX),

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serum (10 x 300 µl)	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 300 µl)	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"/>		
Buffy Coat* (2 x bis 300 µl)	D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>										
	E												
Citrat (4 x 300 µl)	F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>								
	G												
Urin (8 x 300 µl)	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. 2: Schematische Darstellung der Standard-Positionen der Aliquotgefäße auf dem Rack mit Probenarten und Pipettiermengen (*Der Buffy Coat ist für eine spätere DNA-Extraktion vorgesehen. Das Abnehmen des Buffy Coats entfällt bei Einfrieren des entsprechenden Primärrohrchens nach Abnahme des Plasmaüberstandes, siehe auch Abschnitt 6.3)

4 Ablauf der Probenverarbeitung und Dokumentation im DZHK-LIMS

4.1 Vorgaben

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

- Regelmäßige Arbeitsflächendesinfektion
- Einhaltung gängiger Hygienevorschriften

4.2 Flow-Chart

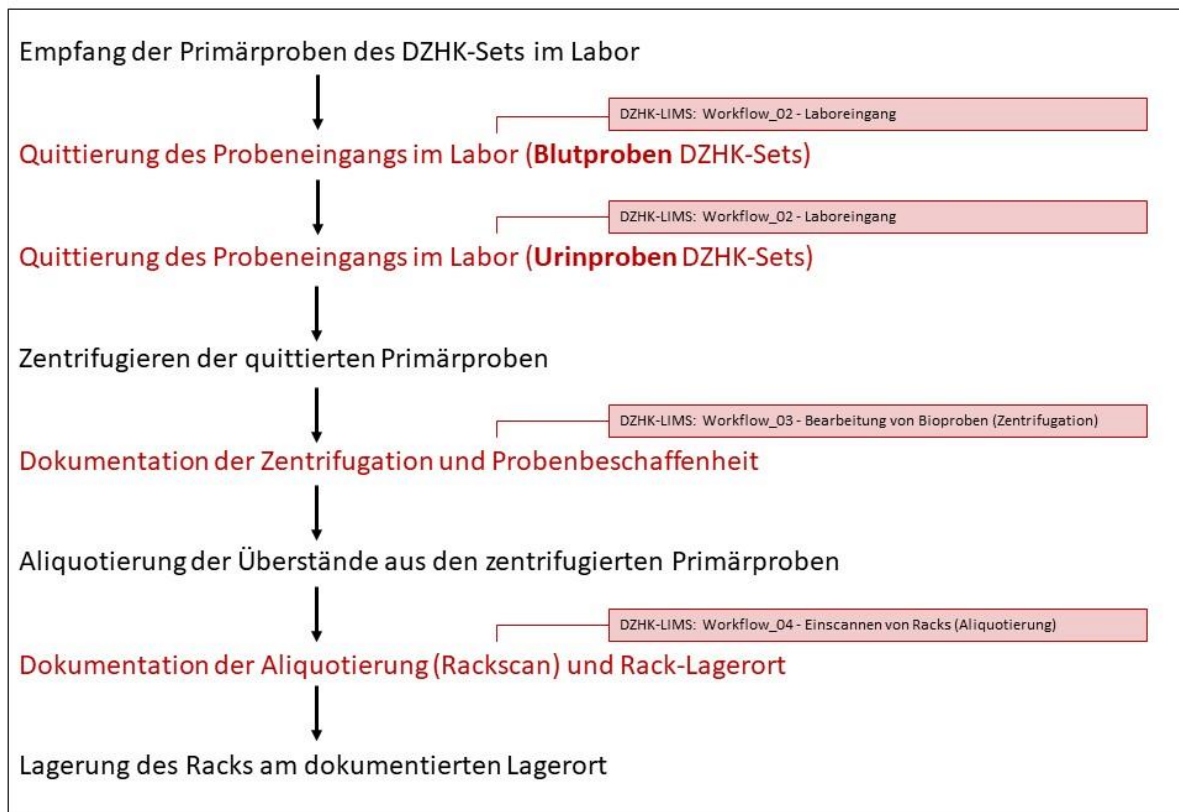


Abb.4: Ablauf Verarbeitung von Bioproben im Überblick

4.3 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.

Nachdem der Probeneingang im Labor quittiert wurde, erfolgt die **Zentrifugation aller Primärgefäße des DZHK-Sets**:

- Die Primärgefäße sind innerhalb von 60 Minuten nach Probengewinnung zu verarbeiten.
- Für die Zentrifugation der Primärproben muss eine der zwei folgenden Varianten genutzt werden: 2.000 g für 10 Minuten ODER 3.000 g für 5 Minuten.
- Die Zentrifugationen können jeweils in gekühlten Zentrifugen: Temperatureinstellung auf 18°C ODER ungekühlten Zentrifugen bei Raumtemperatur (RT) erfolgen: 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-Proben 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 in Ausnahmefällen 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 LF-B-02](#) entnommen werden kann. In Ausnahmefällen kann anstelle des EDTA-Plasma Primärröhrchens auch Citratblut verwendet werden. Das ist bei der entsprechenden Dokumentation der Aliquotierungen im DZHK-LIMS zu beachten.
- Verschluss der Aliquotgefäße.
- Ggf. leere Aliquotgefäße vom Rack entfernen.

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

- Primärgefäß scannen und den Aliquotgefäßen auf dem Rack zuordnen.
- Dokumentation des Lagerortes und des Einlagerungszeitpunktes.

Lokale **Lagerung der Probenaliquote** bei -80°C am dokumentierten Lagerort.

4.4 Verarbeitungszeiten und Lagerung - Probenqualitäten

Anhand der dokumentierten Zeiten von Gewinnung bis zur Einlagerung sowie der Lagerkonditionen werden die Qualitätslevel vergeben.

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.

Hinweis: Die Aliquote der DZHK-Sets können im Anschluss an die Erfassung von 2-3 Patient:innen auf einem Rack verdichtet werden. Hierfür kann der [Leitfaden LF-B-02](#) genutzt werden. Sofern die Proben nicht in automatisierten Lagern gelagert werden, sind ausschließlich DZHK-Sets auf einem Rack zu verdichten und **NICHT mit Studien-Sets zu vermischen**.

Achtung: Die Freezeröffnungszeiten sind immer minimal zu halten. Kondenswasser an den Tubes und insbesondere stärkere Wasseransammlungen führen zu erheblichen Einschränkungen bei Auslagerungsprozessen einzelner Gefäße.

5 Literatur / Quellen

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

6 Querverweise zu bestehenden DZHK-SOPs

Gültig ist die aktuellste, verfügbare Version.

SOP-ID	Titel
DZHK-SOP-B-01	Gewinnung von Bioproben (DZHK Clinical Study Units)

7 Änderungen

Änderung gegenüber der vorherigen Version.

Abschnitt	Änderungen gegenüber der vorherigen Version
Gesamtes Dokument	<p>Wording</p> <p>vormals Biomaterial wird zu Bioproben</p> <p>vormals DZHK Basisbiobanking wird zu DZHK-Biobanking</p> <p>vormals DZHK Basisset wird zu DZHK-Set</p> <p>vormals Studienspezifisches Biobanking wird zu Studienbiobanking</p> <p>vormals Studienspezifisches Probenet wird zu Studien-Set</p>

8 Beteiligte Personen

Name	Funktion	Beteiligung
Prof. Dr. Tanja Zeller	Erstautorin	Erstellung der SOP
Dr. Ivonne Wallrabenstein	Reviewer	Fachliche Prüfung
Dr. Ilka Wilhelmi	DZHK GSt	Koordination

9 Anlagen

9.1 Freigabe Vorversion

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	25.7.20
Unterschrift	