

Probenentnahme

Inhalt

1	Zweck und Zielsetzung	2
2	Verantwortlichkeiten	2
3	Allgemeines	2
3.1.	Details	2
3.2.	Probenentnahme-Basis-KIT	3
3.3.	Nutzung der Proben.....	4
3.4.	Bereitstellung der Entnahmesets	4
4	Vorgaben zur Probengewinnung	5
4.1.	Benötigte Dokumente	5
4.2.	Reihenfolge der Abnahme der Bioproben	5
4.3.	Probengewinnung SERUM	6
4.3.4	Benötigte Materialien	6
4.3.5	Vorbereitung der Abnahme (am Beispiel Sarstedt-Monovette)	6
4.3.6	Probenentnahme SERUM.....	6
4.3.7	Verarbeitung der Proben (am Beispiel Sarstedt-Monovette).....	7
4.4.	Probengewinnung EDTA-Blut	8
4.4.1	Benötigte Materialien	8
4.4.2	Vorbereitung der Abnahme (am Beispiel Sarstedt-Monovette)	8
4.4.3	Probenentnahme EDTA-Blut.....	8
4.4.4	Verarbeitung der Proben (am Beispiel Sarstedt-Monovette).....	8
4.5.	Probengewinnung PAX-Blut	9
4.5.1	Benötigte Materialien	9
4.5.2	Vorbereitung der Abnahme	9
4.5.3	Probenentnahme PAX-Blut Erwachsene	9
4.5.4	Probenentnahme PAX-Blut Kinder	9
4.5.5	Verarbeitung der Proben	9
4.6.	Probengewinnung PBMCs	10
4.6.1	Vorbereitung der Abnahme	10
4.6.2	Probenentnahme.....	10
4.6.3	Verarbeitung der Proben	10
4.7.	Probengewinnung Hautbiopsie	11
4.7.1	Benötigte Materialien	11
4.7.2	Vorbereitung der Abnahme	11
4.7.3	Probenentnahme Hautstanze.....	11
4.7.4	Verarbeitung der Proben	11
5	Mitgeltende Dokumente und Aufzeichnungen	12

Probenentnahme

1 Zweck und Zielsetzung

Die vorliegende SOP regelt die standardisierte Probenentnahme über verschiedene humane Biomaterialien hinweg. Sie dient als Anleitung um die Probennahme einheitlich zu gestalten zum Zweck der Sicherung der hohen Qualität und Vergleichbarkeit der Analysedaten von Biomaterialien.

2 Verantwortlichkeiten

Funktion	Aufgabe
Abteilungsleitung und Qualitätsmanagementbeauftragte	Überwachung die allgemeine Einhaltung der Arbeitsanweisungen und Richtlinien im Labor. Verantwortlich für die Sicherstellung, dass externe Proben gemäß der Labornormen bearbeitet werden.
Arzt	Führt die Probenentnahme gemäß den spezifischen internen Protokollen und Standards durch. Dokumentiert die Probenentnahme und andere relevante Informationen gemäß internen Protokollen.
Case- und Probenmanagement	Überprüfung die Qualität der Probenentnahme und die Einhaltung der internen Qualitätsstandards. Überprüfung die Qualität der Proben und Sicherung der Rückverfolgbarkeit nach externen Richtlinien. Sicherung der vollständigen und genauen Dokumentation der externen Probenbearbeitung.
Mitarbeitende Labor	Entgegennahme Proben im Labor und Durchführung der notwendigen Vorverarbeitungsschritte.

3 Allgemeines

3.1. Details

Eine standardisierte Probenentnahme, also eine Gleichbehandlung der Biomaterialien bei Entnahme und Lagerung bis zur Analyse, ist entscheidend für die Qualität, Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Analysedaten, die aus diesen Materialien gewonnen werden.

Die vorliegende SOP beschreibt den Umgang mit diversen Biomaterialien beginnend von der Entnahme der Probe, über die Behandlung bis hin zur Lagerung des Materials.

Aus den so gewonnenen Biomaterialien können im Anschluss molekulargenetische Untersuchungen an DNA, RNA, Proteinen u.a. erfolgen.

Die Probenentnahme erfolgt mit den in der vorliegenden SOP definierten Entnahmesystemen. Dazu werden **konfektionierte Entnahme-Sets** des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar mit den meisten Materialien, die für die Blut- und Gewebeatnahme benötigt werden, bereitgestellt.

Probenentnahme

Die gewonnenen Biomaterialien werden zentral unter standardisierten Bedingungen in der IHG-Biobank (Institut für Humangenetik der TU München) gelagert.

Wann immer möglich, sollen auch **Bioproben** der **Eltern** der **Indexpatienten** gewonnen werden.

3.2. Probenentnahme-Basis-Kit

Zur Asservierung von Bioproben stehen PROBENENTNAHME-BASIS-KITS zur Verfügung. Die Entnahme der Proben folgt diesem Leitfaden zur Probenentnahme.

Stellen Sie sicher, dass alle Röhrrchen während der Verarbeitung und zum Zeitpunkt des Versands ordnungsgemäß mit **mindestens Vorname, Nachname und Geburtsdatum beschriftet** sind.

Die Probenentnahme-Kits können die folgenden Artikel enthalten und bieten das jeweilige Zubehör, um Proben von einem Probanden zu sammeln:

1x SERUM-Monovette 4,7 ml, braun



2x EDTA-Monovette, 2,7 ml, rot



1x PAXGene-Röhrrchen 2,5 ml, orange



1x BD Vacutainer CPT



1x Safety-Multifly-Kanüle



1x Blutkulturadapter Long Neck



6x Cryo-Röhrrchen für SERUM-Aliquots



1x Biopsiestanze



1x 15 ml Falcon



Probenentnahme

3.3. Nutzung der Proben

Diese Basis-Kits umfassen Material für SERUM, EDTA-BLUT, BLUT für RNA-ISOLATION, BLUT für die ISOLATION von PBMCs und eine HAUTBIOPSIE. Diese Proben sollten stets in gleicher Form vorverarbeitet und anschließend in der IHG-Biobank asserviert werden.

3.4. Bereitstellung der Entnahmesets

Das Proben-Entnahme-Set kann unter folgender Email-Adresse angefordert werden:

diagnostik.ihg@mri.tum.de

Stellen Sie sicher, dass Sie Ihre Vorräte und/oder zusätzliche Materialien lagernd sind, damit sowohl geplante als auch spontane Probenentnahmen möglich sind.

Bitte erlauben Sie uns ZWEI Wochen für die Bearbeitung und Lieferung von Probenentnahme-Kit-Bestellungen.

Zusätzlich dazu soll folgendes von der Probenentnahmestelle bereitgestellt werden:

Tourniquet

Alkohol Tupfer

Gaze-Pad

Verband

Rack für Mikrozentrifugenröhrchen

Handschuhe

Behälter und Deckel für scharfe Gegenstände

Trockeneis

Pipetten und Pipettenspitzen

Steri-Strips

NaCl / Nährmedium (z.B. RPMI, DMEM)

PBS zur Aufarbeitung der PBMCs

Urinbecher zur Entnahme und dem Transport von Urin

Sterile Probengefäße für die Lagerung und den Versand von Finger- und Fußnägeln

Probenentnahme

4 Vorgaben zur Probengewinnung

Es gelten die jeweiligen lokalen Vorgaben zur Blutabnahme.

Um sicherzustellen, dass Proben von höchster Qualität entnommen, verarbeitet und gelagert werden, bitten wir Sie, die kritischen Prozessschritte zu beachten und die beschriebenen Verarbeitungs- und Versandverfahren zu befolgen.

4.1. Benötigte Dokumente

Patienteninformation und **Einwilligungserklärung** werden vom Institut für Humangenetik zur Verfügung gestellt. Sie können auch unter

<https://humangenetik.mri.tum.de/de/formulare-fuer-aerztinnen-und-aerzte>

oder über folgenden QR-Code heruntergeladen werden:



Des Weiteren werden klinische Angaben (**Arztbriefe mit Epikrise sowie Synopse**) des Patienten benötigt, insbesondere die bereits durchgeführten **genetischen Voruntersuchungen**.

4.2. Reihenfolge der Abnahme der Bioproben

1. SERUM-Röhrchen
2. EDTA-Röhrchen
3. PAX-Röhrchen
4. BD Vacutainer CPT
5. Biopsiestanze

Probenentnahme

4.3. Probengewinnung SERUM



4.3.4 Benötigte Materialien

1xSERUM-Gel-Röhrchen

z.B. SARSTEDT_Monovette 4,7 ml, braun

4.3.5 Vorbereitung der Abnahme (am Beispiel Sarstedt-Monovette)

- Es gelten die Herstellerangaben
- Standard-Kanülengröße verwenden
- Monovette auf Multi-Adapter aufsetzen und per Rechtsdrehung verriegeln
- zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zur Monovette einhalten

4.3.6 Probenentnahme SERUM

- Es gelten die Herstellerangaben
- Kein Mehrfacheinstich an selber Stelle
- Gleichmäßiges Aspirieren
- Kein Durchstechen der Vene
- Möglichst kein Faustschluss oder Pumpen
- Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, zuletzt PAX-Röhrchen)
- Füllung der Monovetten durch gleichmäßigen Zug am Stempel
- Füllstand beachten (Markierung)
- Stempel nach Befüllung abknicken
- **Kritischer Schritt:** Monovette vom Adapter abziehen und nach zweimaligem Schwenken um 180° aufrecht in einen Ständer stellen

Probenentnahme

- Die Gerinnung des Blutes in der Monovette ist nach ca. 20 bis 30 Minuten abgeschlossen

4.3.7 Verarbeitung der Proben (am Beispiel Sarstedt-Monovette)

- Es gelten die Herstellerangaben
- **Kritischer Schritt:** Zentrifugieren: 10 min/ 2500 x g (Beispiel Sarstedt-Monovette)
- Jeweils 350 µl Serum in die bereitgestellten Cryo-Röhrchen füllen (ergibt max. 6 Aliquots á 350 µl)
- **Kritischer Schritt:** Den Übertrag von Blutzellen vermeiden!
- Einfrieren und Lagern von Proben in Cryo-Aufbewahrungsboxen bei -80 °C (-112°F) im Gefrierschrank. Bei ca. -75 bis -80 °C aufbewahren, bis die Proben auf Trockeneis versendet werden können.

Probenentnahme

4.4. Probengewinnung EDTA-Blut



4.4.1 Benötigte Materialien

2xEDTA-Röhrchen

z.B. SARSTEDT-Monovette 2,7 ml, rot

4.4.2 Vorbereitung der Abnahme (am Beispiel Sarstedt-Monovette)

- Es gelten die Herstellerangaben
- Standard-Kanülengröße verwenden
- Monovette auf Multi-Adapter aufsetzen und per Rechtsdrehung verriegeln
- zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zur Monovette einhalten

4.4.3 Probenentnahme EDTA-Blut

- Kein Mehrfacheinstich an selber Stelle
- Gleichmäßiges Aspirieren
- Kein Durchstechen der Vene
- Möglichst kein Faustschluss oder Pumpen
- Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, zuletzt PAX-Röhrchen)
- Füllung der Monovetten durch gleichmäßigen Zug am Stempel
- Füllstand beachten (Markierung)
- Stempel nach Befüllung abknicken

Kritischer Schritt: Die gerinnungshemmende Wirkung von EDTA kommt nur voll zur Geltung, wenn die Monovette nach der Blutentnahme 5-10 x über Kopf geschwenkt wird.

4.4.4 Verarbeitung der Proben (am Beispiel Sarstedt-Monovette)

Lagerung der Proben bei ca. -75 bis -80 °C, Versand auf Trockeneis.

Probenentnahme

4.5. Probengewinnung PAX-Blut



4.5.1 Benötigte Materialien

1x PAXgene-Röhrchen 2,5 ml

4.5.2 Vorbereitung der Abnahme

- Sicherstellen, dass das PAXgene-RNA-Röhrchen vor Gebrauch auf +18 bis +25 °C temperiert ist
- Zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zur Monovette einhalten.
- Mitgelieferten Adapter zusammensetzen

4.5.3 Probenentnahme PAX-Blut Erwachsene

- Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, zuletzt PAX-Röhrchen)
- Mit Hilfe des Blutentnahmesets und eines Halters entsprechend dem von der jeweiligen Einrichtung empfohlenen Standardverfahren für Venenpunktion Blut in ein PAXgene-RNA-Röhrchen entnehmen. Arm des Spenders weist nach unten.
- Röhrchen während der Blutentnahme in einer vertikalen Stellung unterhalb des Spenderarms halten.
- Stauschlauch lösen, sobald Blut in das Röhrchen fließt.
- Sicherstellen, dass während der Venenpunktion weder Stopfen noch Kanülenspitze mit Zusatzstoffen in Berührung kommt.
- **Kritischer Schritt:** Röhrchen nach erfolgter Füllung 10x schwenken

4.5.4 Probenentnahme PAX-Blut Kinder

- Führen Sie eine Injektionsnadel in das PAXgene-Röhrchen ein
- 3 ml PAXgene-Flüssigkeit sammeln und in ein 15 ml Falcon-Tube überführen
- Mit einer frischen Injektionsnadel 1 ml Blut vom Kind entnehmen und in das 15 ml Falcon-Tube mit der PAXgene Tube-Flüssigkeit überführen
- **Kritischer Schritt:** Röhrchen nach erfolgter Füllung 10x schwenken

4.5.5 Verarbeitung der Proben

- Es gelten die Herstellerangaben
- **Kritischer Schritt I:** Vor der Weiterverarbeitung das PAXgene®-RNA-Röhrchen für mindestens zwei Stunden (max. 72 Stunden!) aufrecht bei Raumtemperatur (+18 bis +25 °C) stehen lassen. Ein ungekühlter Versand ist in diesem Zeitfenster noch möglich.
- **Kritischer Schritt II:** Anschließend 24 Stunden bei -20 °C kühlen
- Danach bei -75 bis -80 °C aufbewahren, bis Sie die Proben auf Trockeneis versenden.

Probenentnahme

4.6. Probengewinnung PBMCs

1xBD Vacutainer CPT



4.6.1 Vorbereitung der Abnahme

- Sicherstellen, dass das BD Vacutainer CPT Röhrchen vor Gebrauch auf +18 bis +25 °C temperiert ist
- Zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zum Röhrchen einhalten.
- Mitgelieferten Long Neck Adapter von der PAX-Blut Abnahme verwenden

4.6.2 Probenentnahme

- Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, dann PAX-Röhrchen, dann BD Vacutainer CPT)
- Mit Hilfe des Blutentnahmesets und des Long Neck Adapters aus der vorherigen PAX-Blut Entnahme entsprechend dem von der jeweiligen Einrichtung empfohlenen Standardverfahren für Venenpunktion Blut in ein BD Vacutainer CPT-Röhrchen entnehmen. Arm des Spendenden weist nach unten.
- Röhrchen während der Blutentnahme in einer vertikalen Stellung unterhalb des Spenderarms halten. Stauschlauch lösen, sobald Blut in das Röhrchen fließt.
- Sicherstellen, dass während der Venenpunktion weder Stopfen noch Kanülenspitze mit Zusatzstoffen in Berührung kommt.
- **Kritischer Schritt:** Röhrchen nach erfolgter Füllung 5x schwenken und bei Raumtemperatur lagern
- **WENN KEINE VERARBEITUNG DER PROBEN AM STANDORT MÖGLICH IST MUSS DIE PROBE INNERHALB VON 24 h AN DAS INSTITUT FÜR HUMANGENETIK GESANDT WERDEN**

4.6.3 Verarbeitung der Proben

- Es gelten die Herstellerangaben
- **Kritischer Schritt:** Probe innerhalb von 20 min verarbeiten für ein optimales Ergebnis
- Maximal 24 h nach der Abnahme muss eine Verarbeitung erfolgt sein
- Vor der Zentrifugation noch einmal 5x schwenken
- **Kritischer Schritt:** Zentrifugieren: 20 min/ 1650 x g bei Raumtemperatur
- Weiße Phase (enthält die PMCs) in ein 15 ml Falcon überführen
- Mit PBS auf 15 ml auffüllen
- 5x invertieren und 15 min bei 300 g zentrifugieren
- Überstand entfernen und PBMCs in frischem PBS resuspendieren
- Auf 10 ml mit PBS auffüllen
- Erneut 15 min bei 300 g zentrifugieren
- Zellpellet in 1 ml RPMI Medium aufnehmen
- Herstellung des Einfriermediums aus 80 % FBS und 20 % DMSO

Probenentnahme

- 250 µl Einfriermedium zu 250 µl Zellsuspension geben und schrittweise bis – 80 °C einfrieren

4.7. Probengewinnung Hautbiopsie



4.7.1 Benötigte Materialien

1x Hautstanze

1x 15 ml Falcon

z.B. Stiefel Biopsy Punch 3,0 mm

4.7.2 Vorbereitung der Abnahme

- Lokale Betäubung an Entnahmestelle. Als Entnahmestelle bietet sich die volare Seite des Unterarms an. Die Betäubung kann transkutan z.B. mit Emla-Pflaster oder Creme erfolgen. Alternativ kann auch ein Lokalanästhetikum, z.B. Lidocain injiziert werden. Hierfür ist jedoch die vorherige Desinfektion des Injektionsgebiets notwendig.
- Desinfektion des Entnahmegebiets, z.B. mit Octenisept und sterilen Tupfern/Kompressen

4.7.3 Probenentnahme Hautstanze

- Unter sterilen Bedingungen (sterile Handschuhe, sterile Abdeckung) die Hautstanze auf das betäubte Hautareal aufsetzen und unter Rotation wenige Millimeter in die Haut stanzen.
- Danach Stanze wieder aus dem Hautniveau entfernen. Die herausgetanzte Haut unter der Zuhilfenahme einer sterilen anatomischen Pinzette in ein Falcon-Tube mit einem sterilen Medium (z.B. NaCl oder DMEM) übertragen.
- Verschluss der Haut mit Steri-Strips und einem Wundverband unter sterilen Bedingungen.

4.7.4 Verarbeitung der Proben

- **Kritischer Schritt:** Die Hautstanze entweder direkt unter Raumtemperatur versenden.
- Oder alternativ für ein Anzüchten von Fibroblasten die Haut aus dem Falcon-Tube unter sterilen Bedingungen (Hood) in eine sterile Petri-Schale übertragen.
- Haut mit 2 Skalpellern zerkleinern. Nährmedium z.B. DMEM in einer 5ml oder 10ml Pipette vorlegen und zerkleinerte Hautstücke danach aufnehmen. Hautstücke in Nährmedium in eine Zellkulturflasche übertragen und in einem Brutschrank anzüchten.

Probenentnahme

5 Mitgeltende Dokumente und Aufzeichnungen

Mitgeltende Dokumente:	https://humangenetik.mri.tum.de/de/formulare-fuer-aerztinnen-und-aerzte Patienteninformation Einwilligungserklärungen
Aufzeichnungen:	