

## Instruks for håndtering af blod og knoglemarv ved hæmatologisk sygdom Regionernes Bio- og GenomBank

### Baggrund

Denne instruks omhandler indsamling af perifert blod (PB) og knoglemarvsaspirat (KM) fra patienter med formodet hæmatologisk kræft i regi af Regionernes Bio- og GenomBank (RBGB). Der kan indsamles PB og KM fra diagnosetidspunktet og/eller fra ét eller flere tidspunkter i det opfølgende forløb.

RBGBs registreringsmodul anvendes til indregistrering af patientdata og prøvevariable svarende til den aktuelle version af webmodulet.

Denne instruks er udarbejdet nationalt i samarbejde mellem patologi- og hæmatologiafd. i Odense, Aalborg, Aarhus, Herlev, Roskilde og på Rigshospitalet.

### Standardsæt for PB og KM

- For PB består et standardsæt af:  
2 × 1,5 ml plasma, 1 × 1,5 ml buffy coat, 2 × 1,5 ml serum og 6 x mononukleære celler (MNCs, mononuclear cells) (5 rør á 5 eller 10 mio. MNCs + MNC rest).
- For KM aspirat består et standardsæt af:  
2 × 1 ml plasma (KM supernatant) og 6 x MNCs (5 rør á 5 eller 10 mio. MNCs + MNC rest).
- For MNCs gælder at:

Ved < 5 mio. MNCs:	alle celler i ét rør (MNC rest)
Ved 5 – 50 mio. MNCs:	5 mio. celler pr. MNC rør + evt. MNC rest
Ved > 50 mio. MNCs:	10 mio. celler pr. MNC rør + evt. MNC rest

### Prøvetagning

- For KM anbefales det at lave et nyt indstik til aspirat til biobank mhp. minimal blodtilblanding.
- For KM anvendes glas med EDTA-antikoagulant (lilla låg), heparin-antikoagulant (grønt låg) eller kromosom medie (for anbefalede medier, se bilag 1), min. ca. 2 ml aspirat og helst 4 – 6 ml eller mere.
- For PB anvendes glas med EDTA-antikoagulant (lilla låg) eller heparin-antikoagulant (grønt låg) til plasma, buffy coat og MNC fraktionerne, min. ca. 10 ml. For PB anvendes tørglas (rødt låg) til serum fraktionerne, min. ca. 10 ml.
- Det registreres, hvilke glas der er anvendt til PB og KM prøvetagning.
- Transport af PB og KM prøver til laboratoriet anbefales at foregå uden nedkøling. Transport kan dog foregå med nedkøling såfremt prøven vil blive nedkølet efter prøvetagning.

## Prøvehåndtering i laboratoriet

### For både PB og KM gælder følgende:

- Prøvebehandling og nedfrysning af alle fraktioner bør foregå hurtigst muligt og helst samme dag som prøven er taget. Håndtering og nedfrysning kan også udføres dagen efter prøvetagning, hvis det vurderes for upraktisk at gøre det samme dag. Kun i særlige tilfælde anbefales det at nedfryse fraktioner fra prøver, der har været opbevaret i 2 døgn eller derover.
- Såfremt prøven håndteres på dagen for prøvetagning opbevares prøven ved stuetemperatur indtil håndtering. Såfremt prøven håndteres dagen efter prøvetagning (eller senere) skal prøven opbevares i køleskab indtil håndtering. Såfremt prøven nedkøles anbefales det, hvis praktisk muligt, at foretage hele den efterfølgende prøvehåndtering nedkølet, og med nedkølede reagenser, så temperaturudsving i prøven undgås. Det registreres om prøven opbevares nedkølet, og om den efterfølgende prøvehåndtering udføres nedkølet.
- Alle reagenser og utensilier skal være "sterile grade". Det vurderes ikke nødvendigt at anvende sterile arbejdsgange ved håndteringen af prøverne.
- Alle reagenser til fortynding af prøver, vask af MNCs og hæmolyse skal have stuetemperatur. De kan med fordel opbevares ved stuetemperatur så evt. opvarmning inden anvendelse kan undgås. Nedkølede reagenser anvendes i de tilfælde, hvor det er praktisk muligt at udføre hele prøvehåndteringen nedkølet.
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Fetal Calf Serum (FCS) og DMSO opløsning opbevares og anvendes koldt. DMSO opløsning laves dagligt og medie med serum laves ugentligt.
- Indsamlende afdelinger skal have fryserne med tilkoblet alarm for temperaturstigning samt instruks for aktion ved driftsstop. Indsamlende afdelinger skal have reservefryser til rådighed til opbevaring af alle indsamlede biobankprøver i tilfælde af driftsstop.

### PB plasma og buffy coat - for PB taget i glas med EDTA eller heparin anbefales følgende procedure:

- Prøven centrifugeres ved  $2000 \times g$  ( $g$ -værdien =  $0,00001118 \cdot r \cdot \text{RPM}^2$ , eksempelvis vil 4500 RPM ved rotorradius 9 cm svare til  $2038 \times g$ ) i 10 min, stuetemperatur, svag bremse. Stuetemperatur anbefales for at undgå unødvendige temperaturudsving og svag bremse for at undgå turbulens i prøven. Tid og hastighed for centrifugering er identisk med tekniske anbefalinger for indsamling af PB ved solide tumorer.
- $2 \times$  ca. 1,5 ml plasma fordeles i 2 cryorør. Ved afsugning af plasma er det vigtigt at pipettespidsen holdes ca. 5 mm fra laget indeholdende buffy coat for at undgå tilblanding fra dette lag. Anbefalingen vedr. selve afpipetteringen bl.a. af hensyn til evt. fremtidige studier af cell free DNA (cfDNA) i plasma.
- $1 \times$  ca. 1,5 ml buffy coat overføres til 1 cryorør (evt. rest af plasma fjernes før buffy coat overføres).
- Prøverest anvendes efterfølgende til oprensning af MNCs.
- Plasma og buffy coat nedfryses hurtigst muligt, optimalt indenfor to timer efter afpipettering. Evt. opbevaring af plasma og buffy coat inden nedfrysning skal foregå i køleskab.
- Plasma og buffy coat nedfryses og opbevares ved  $-80^\circ\text{C}$  eller koldere.

**PB serum - for PB taget i tørglas gælder følgende procedure:**

- Prøven centrifugeres ved 2000xg i 10 min, stuetemperatur, svag bremse. Stuetemperatur anbefales for at undgå unødvendige temperaturudsving og svag bremse for at undgå turbulens i prøven. Tid og hastighed for centrifugering er identisk med tekniske anbefalinger for indsamling af PB ved solide tumorer.
- 2 × ca. 1,5 ml serum fordeles i 2 cryorør.
- Prøverest kasseres.
- Serum nedfryses hurtigst muligt, optimalt indenfor to timer efter afpipettering. Evt. opbevaring af serum inden nedfrysning skal foregå i køleskab.
- Serum nedfryses og opbevares ved -80 °C eller koldere.

**KM plasma - for KM taget i glas med EDTA eller heparin gælder følgende procedure (ej hvis i kromosom medie):**

- Prøven centrifugeres ved 2000xg i 10 min, stuetemperatur, svag bremse.
- 2 × ca. 1 ml plasma fordeles i 2 cryorør. Ved afsugning af plasma anbefales det at pipettespidsen holdes ca. 5 mm fra laget indeholdende buffy coat for at undgå tilblanding fra dette lag. Ved begrænset mængde plasma kan der dog afsuges tættere på laget indeholdende buffy coat for at sikre plasma til 2 cryorør.
- Prøverest anvendes efterfølgende til oprensning af MNCs.
- Det anbefales at KM plasma udtages fra prøven før tilsætning af PBS eller anden fortynding. Ex. ved prøvetagning i glas med EDTA-opløsning kan fortynding dog ikke undgås. Såfremt prøven er fortyndet anbefales registrering af dette (oftest er det kun muligt at registrere hvad prøven er fortyndet med, ikke en præcis fortyndingsfaktor).
- For KM aspirat der tages i glas med kromosom medie anbefales ikke udtagning af KM plasma da det vurderes uegnet til videre analyse.
- KM plasma nedfryses hurtigst muligt, optimalt indenfor to timer efter afpipettering. Evt. opbevaring af KM plasma inden nedfrysning skal foregå i køleskab.
- KM plasma nedfryses og opbevares ved -80 °C eller koldere.

**PB og KM MNCs - for alle typer af prøvetagningsglas gælder følgende procedure:**

- Ved fortynding af prøverne anvendes PBS eller CellWASH (BD Biosciences). Det registreres hvilken fortynding der evt. foretages.
- Der kan udføres filtrering af prøverne vha. cell strainer filter (30 – 70 µm, størrelse registreres).
- Både centrifugerør med barriere (Leucosep-rør) og uden barriere, 15 eller 50 ml, anbefales til isolering af MNCs. Der anbefales Ficoll/Ficoll-Paque (GE Healthcare) eller Lymphoprep (STEMCELL Technologies/Fresenius) som densitets gradient medie til separationen ved centrifugering. Det registreres hvilket densitets gradient medie der anvendes.
- Prøven sættes på rør med densitets gradient medium. Ved brug af rør uden barriere lægges prøven forsigtigt ovenpå mediet.
- Ved anvendelse af rør med barriere (Leucosep-rør) centrifugeres prøven ved 800xg i 15 min, stuetemperatur, svag bremse. Supernatanten med MNCs hældes derefter over i nyt 50 ml rør, resten kasseres.

- Ved anvendelse af rør uden barriere centrifugeres prøven ved 450xg i 30 min, stuetemperatur, svag bremse. Interfasen med MNCs overføres med pipette til nyt 50 ml rør og resten kasseres.
- MNCs vaskes ved at efterfylde til ca. 45 ml med PBS eller CellWASH. Prøven centrifugeres ved 500xg i 10 min, stuetemperatur, middel bremse.
- Supernatanten borthældes.
- Det anbefales at udføre ammonium chlorid-baseret hæmolyse vha. Ammoniumchlorid (Ampliqon), EasyLyse (Dako), Ortholysing (Region Hovedstadens Apotek) eller Hoffmans buffer (Region Hovedstadens Apotek). Buffer til hæmolyse skal være uden fixative.
- Hæmolyse udføres ved at tilsætte ca. 10 ml hæmolyse-reagens og lade prøven stå i ca. 10 min ved stuetemperatur. Derefter efterfyldes med PBS eller CellWASH til ca. 45 ml og prøven centrifugeres ved 500xg i 10 min, stuetemperatur, middel bremse.
- Supernatanten borthældes, evt. rest bortsuges med pipette eller sterilt papir.
- Der tilsættes kendt volumen PBS eller CellWASH, volumen afhængig af forventet antal celler i prøven.
- Prøven tælles på Sysmex (Sysmex) eller NucleoCounter (Chemometec).
- Den resuspenderede prøve kan evt. overføres til 15 ml rør fra 50 ml røret. Specielt for prøver med relativt få celler kan det være en fordel at overføre til 15 ml rør.
- MNCs vaskes ved at efterfylde til ca. 15 eller 45 ml med standard PBS buffer eller CellWASH. Prøven centrifugeres ved 500xg i 10 min, stuetemperatur, middel bremse. Der kan dog på dette trin undlades at tilsætte yderligere buffer og i stedet blot centrifugere prøven.
- Supernatanten borthældes, evt. rest bortsuges med pipette eller sterilt papir.
- Pellet resuspenderes i koldt RPMI eller IMDM medie indeholdende 50 % FCS (medie 1). Der arbejdes på is eller i køleblok. Såfremt cellerne ønskes nedfrosset i fraktioner á 1 ml tilsættes medie 1 i en mængde svarende til 500 ul pr. fraktion. Der kan tilsættes antibiotika til medie 1, det anbefales at evt. tilsætning af antibiotika registreres.
- Cellerne kan nu uddeles som aliquots á 500 ul til cryorør hvortil der drypvís tilsættes koldt medie 2 indeholdende 50 % FCS, 30 % medie (RPMI eller IMDM, der vælges samme type som i medie 1) og 20 % DMSO. Alternativt kan medie 2 tilsættes drypvís i forholdet 1:1 før uddeling til cryorør. Der arbejdes på is eller i køleblok. Såfremt cellerne ønskes nedfrosset i fraktioner á 1 ml tilsættes medie 2 ligeledes i en mængde svarende til 500 ul pr. fraktion. Der kan tilsættes antibiotika til medie 2, det anbefales at evt. tilsætning af antibiotika registreres.
- Efter tilsætning af medie 2 med DMSO startes indfrysning af prøverne så hurtigt som muligt, prøverne opbevares på is eller i køleblok indtil indfrysning starter. Umiddelbart inden start af indfrysning vendes cryorørene et par gange.
- Indfrysning bør foregå enten vha. kontrolleret N<sub>2</sub>-baseret nedfrysning eller vha. kontrolleret -80 °C fryser nedfrysning med ex. CoolCell container (BioCision). Nedfrysnings hastigheden anbefales at være ca. 1 °C/minut for begge metoder.
- MNC fraktionerne anbefales overført fra indfryser eller -80 °C fryser til N<sub>2</sub>-tank indenfor en uge.

**Bilag 1: Anbefalede kromosom medier**

- 200 ml RPMI 1640, 1 ml penicillin/streptomycin, 40 ml FCS, pH indstilles til 6,8 med HCL, 2 ampuller heparin (5000IU/ml) tilsættes
- 200 ml RPMI 1640, 3 ml penicillin/streptomycin, 50 ml FCS
- 500 ml MEM-EAGLE med Gentamycin, 70 ml FCS, 5 ml L-glutamin

*Oplysninger om Regionernes Bio- og GenomBank (RBGB) kan fås ved henvendelse til:  
Sekretariatet for Regionernes Bio- og GenomBank, Afdeling for Patologi, Herlev Hospital, Borgmester Ib Juuls Vej 73, Opgang 7, 4. etage, L5, 2730 Herlev. Tlf. (+45): 3868 9132/3868 9812 (i tidsrummet kl. 10-12). E-mail: [RBGB.sekretariat.herlev-og-gentofte-hospital@regionh.dk](mailto:RBGB.sekretariat.herlev-og-gentofte-hospital@regionh.dk)*