

Instruks for håndtering af ledvæske Regionernes Bio- og GenomBank

Formål

Følgende instruks beskriver arbejdsgangen i forbindelse med indsamling af ledvæske til opbevaring i Regionernes Bio- og GenomBank (RBGB). Instruksen indeholder en beskrivelse af arbejdsgangene på hhv. den kliniske afdeling (del 1) og den prøvehåndterende afdeling (del 2). Den lokale logistik vedr. ledvæsker aftales lokalt mellem afdelingerne, evt. i samarbejde med centerprojektlederne. Det anbefales, at der i relation til ledvæskeprøver tages supplerende blodprøver til RBGB.

Del 1: Arbejdsgange på den kliniske afdeling

- Ledvæske tappes fra patienten en eller flere gange i et udrednings/behandlingsforløb.
- Ledvæsken tappes fra leddet og overføres til 1-10 stk. 9 ml EDTA glas (fortrinsvist med K3-EDTA) og mærkes med cpr.nr., dato og tidspunkt samt led og sideangivelse (høj knæ, ve. ankelled etc.). Vær opmærksom på at spidsglas ikke er velegnede, med mindre de indeholder EDTA eller heparin.
- Prøvevolumen 3-100 ml.
- Opbevares i køleskab indtil afhentning.
- Procedure for afhentning aftales lokalt.
- Procedure for bestilling af ledvæskehåndtering på den prøvehåndterende afdeling aftales lokalt (via Labka eller lignende).
- Kliniske data ajourføres i DANBIO eller anden relevant klinisk database.

Del 2: Arbejdsgange på den prøvehåndterende afdeling

I det følgende beskrives arbejdsgangen for håndtering og opbevaring af ledvæske i RBGB. Ledvæsken kan håndteres i overensstemmelse med procedure 1 eller 2. Det aftales med DRB og evt. den lokale kliniske afdeling, hvilken procedure afdelingen følger.

Procedure 1 beskriver en enkel metode til fraktionering af ledvæske, som ikke tager hensyn til bevarelse af celler i ledvæsken. Denne vil kunne implementeres på alle prøvehåndterende afdelinger.

Procedure 2 kan følges, hvis man ønsker en optimal opbevaring mhp. cytokinmåling ved flowcytometri, cellekulturdyrkning, kloning, transplantationer og produktion af hybridomaceller. Eventuelle krystaller i ledvæsken formodes ikke at blive bevaret ved nedenstående procedurer.

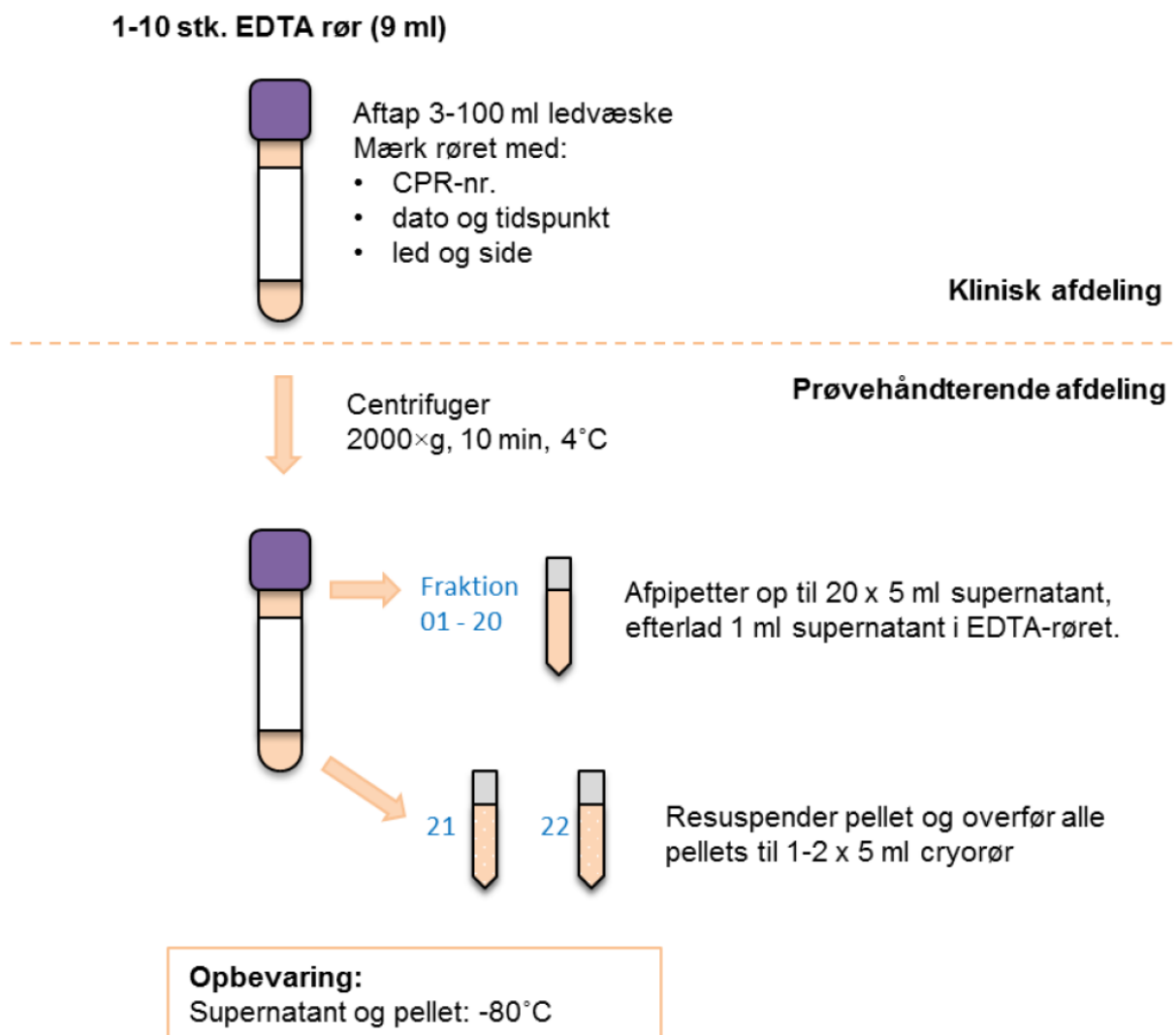
Ledvæsken bør håndteres inden for 4 timer for at bevare det bedste potentiale. Den anbefalede fraktionsstørrelse ved opbevaring er 5 ml, men afdelingen vælger selv, om man vil følge dette eller opbevare større eller mindre fraktioner. Ledvæskefraktionerne registreres i registreringsmodulet for RBGB. Det anbefales, at registreringen foretages sideløbende med håndteringen af materialet. Der henvises til gældende instruks for registrering af ledvæske i RBGB. På figur 1 ses et stort procedureflowskema af procedure 1.

Procedure 1

Enkel fraktionering af ledvæske mhp. DNA/RNA og proteinanalyser.

Anbefalet håndteringstid: <4 timer. Ledvæsken opbevares på køl indtil håndtering.

1. Centrifuger ledvæsken ved 2000xg i 10 min ved 4°C.
2. Afpipetter supernatanten i op til 20 x 5 ml cryorør (samlet volumen max. 100 ml), men efterlad ca. 1 ml supernatant i EDTA-røret.
3. Resuspender pellet i den resterende 1 ml ledvæske, og overfør fraktionen til et mikrorør. Er der tappet flere glas med ledvæske, resuspenderes pellet i hvert rør og fordeles i 1-2 stk. 5 ml rør.
4. Ledvæske og celler indfryses og opbevares ved -80°C.



Figur 1. Håndtering af ledvæske til RBGB

Procedure 2

Fraktionering af ledvæske mhp. DNA/RNA og celleanalyser. Proceduren er delt op i **A)** fraktionering af ledvæske og **B)** isolering af mononukleære celler (MNC'er). Arbejdet foregår i Flowbænk.

Anbefalet håndteringstid: inden for 4 timer.

Forberedelser til proceduren:

- Saltvand og FicollPaque tempereres til stuetemperatur.
- Frysemedium blandes, slutvolumen ca. 20 ml: 70 % RPMI, 20 % FCS, 10 % DMSO til 9 mikrorør.

A) Fraktionering af ledvæske

1. Centrifuger ledvæsken ved 335×g i 15min ved 20°C.
2. Afpipetter op til 9 x 1,8 ml supernatant til 9 mikrorør.
3. Ledvæsken indfryses og opbevares ved -80°C.
4. Registrér samtidig ledvæskefraktionerne i Regionernes Biobanks registreringsmodul.

B) Oprensning af MNC'er fra ledvæske

1. Resten af ledvæsken fortyndes 1:2 med NaCl 0,9 % og fordeles i det nødvendige antal 50 ml rør. Ledvæsken centrifugeres 335×g i 15min ved 20°C.
2. Supernatanten kasseres, og cellerne resuspenderes i ialt 20 ml NaCl 0,9 %.
3. For at separere de mononukleære celler underlejres med 12 ml Ficoll-Paque. Centrifuger uden bremse ved 930×g i 25 min ved 20°C.
4. Hvis der er for lidt materiale til dette, overlejres på Ficoll-Paque i rundbundet 10 ml glas, 5 ml Ficoll lægges i bunden af glasset, og 3 ml ledvæske afpipetteres forsigtigt ovenpå Ficollen. Centrifuger uden bremse ved 930×g i 25 min ved 20°C.
5. Interfasen høstes og overføres til ét 15 ml rør, og der fyldes op med PBS/BSA 5 % w/v. Centrifugeres ved 335×g i 10 min ved 20°C. Det er vigtigt, at dette gøres hurtigt efter, at centrifugeringen er afsluttet, da Ficollen er cytotoxisk.
6. Cellerne resuspenderes i 5 ml (eller passende volumen). PBS/BSA og tælles i fortyndingen 5 µl + 150 µl.
7. Cellerne centrifugeres ved 335×g i 10 min. ved 20°C. Supernatanten kasseres, og cellerne resuspenderes i en relevant volumen iskoldt *frysemedium* (se ovenfor). Der stiles mod 9 mikrorør á 5 mio. celler, hvis færre celler, prioriteres 9 mikrorør ned til min. 2 mio/rør. Herefter reduceres antallet af mikrorør, og der overføres 1 ml til hver 1,8 ml iskolde cryotubes. Fraktionerne indfryses i indfrysingsboks ved -80°C.
8. Dagen efter overflyttes prøverne til -135°C fryseren.

Version	Dato	Ændring
2	10.07.2024	- Revision foretaget da instruksen ellers har været uændret i mere end 3 år
1	29-04-2020	-

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, L6, 2730 Herlev. Tlf. (+45): 3868 9132/3868 9812). E-mail: RBGB.sekretariat.herlev-og-gentofte-hospital@regionh.dk