

DATEIÜBERSICHT: "Man-U3"

6.5 DIE BLUTABNAHME (A. DÖRING, K. PAPKE)	2
6.5.1 ZWECK	2
6.5.2 DER BLUTABNAHMEPLATZ	2
6.5.2.1 Ausrüstung des Blutabnahmeplatzes	2
6.5.2.2 Hygiene	2
6.5.3 MATERIALBESTAND	3
6.5.4 VORGEHENSWEISE	3
6.5.4.1 Vorbereitung	3
6.5.4.2 Vorbereitung zur Punktion	5
6.5.4.3 Durchführung der Blutabnahme	7
6.5.4.4 Abnahme von doppelten Proben(Duplikaten)	9
6.5.4.5 Spezielle Vorgehensweisen:	10
6.6 HANDHABUNG UND WEITERVERARBEITUNG DER BLUTPROBEN (A. DÖRING, T. IMMERSVOLL, K. PAPKE, M. PIETSCH, B. ZEITLER)	15
6.6.1 AUFGABEN, LABORORGANISATION	15
6.6.2 ALLGEMEINE ANWEISUNG ZUR WEITERVERARBEITUNG DER BLUTPROBEN	16
6.6.2.1 Weiterverarbeitung	16
6.6.2.2 Aliquotierung	18
6.6.3 SCHEMADARSTELLUNG DER BLUTPROBENWEITERVERARBEITUNG UND ALIQUOTIERUNG	19
6.6.4 SCHEMADARSTELLUNG ZUR MASCHINELLEN PROBENAUFBEREITUNG FÜR DIE STICKSTOFFLAGERUNG ...	20
6.6.5 PROBENTRANSPORT	21
6.6.6 BESONDERE METHODEN ZUR BLUTPROBENAUFBEREITUNG	23
6.6.6.1 DNA-Isolation	23
6.6.6.2 Isolierung von B- Lymphozyten aus humanem Vollblut	25
6.6.7 LABORAUSSTATTUNGSLISTE STAMMZENTRUM	27
6.6.8 BLUTENTNAHMERAUM IM SZ	29
6.6.9 AUSSTATTUNG FÜR BLUTPROBENVERARBEITUNGSPLATZ IM AUßENZENTRUM	30
6.6.10 AUSSTATTUNG FÜR BLUTABNAHMEPLATZ IM AUßENZENTRUM	30

6.5 DIE BLUTABNAHME (A. Döring, K. Papke)

6.5.1 Zweck

Mit den Blutproben sollen folgende Analysen im Labor des Zentralklinikums Augsburg durchgeführt werden: (a)Gesamtcholesterin, (b)HDL-Cholesterin, (c)LDL-Cholesterin, (d)Triglyceride, (e)Blutglucose, (f)Harnsäure, (g)Kreatinin, (h)HbA1c sowie (i)kleines Blutbild. Einige dieser Parameter(a-e) sind wichtige Einflußgrößen bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, während andere Parameter Aussagen zu Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes(e,h) und Gicht(f) bzw. zum Funktionszustand der Niere(g) erlauben. Dieser Untersuchungsteil ist mitunter problematisch, da sich viele Personen vor möglichen Verletzungen, Schmerzen oder Übelkeit in Zusammenhang mit der Blutabnahme ängstigen. Bei sorgfältiger und professioneller Durchführung stellt die Blutabnahme für den Probanden i.d.R. jedoch keine unzumutbare Belastung dar und liefert wichtige Informationen sowohl für ihn wie auch für die Beantwortung der Fragestellungen der KORA-Survey 2000.

6.5.2 Der Blutabnahmeplatz

Der Blutabnahmeplatz soll entweder ein separater Raum oder zumindest von einem Untersuchungsraum durch Raumteiler abgetrennt sein. Die Raumtemperatur sollte 18°-24° C betragen. Es muß genügend Platz vorhanden sein, daß sich der Proband im Falle eines Kollaps flach auf den Boden bzw. eine Liege legen kann.

6.5.2.1 Ausrüstung des Blutabnahmeplatzes

1	Arbeitstisch
1	Stuhl mit Armlehne (für den Probanden)
1	Rollhocker (für den Untersucher)
1	Armstütze, höhenverstellbar
1	Armauflage (abwaschbar)
1	Blutabnahmestuhl
1	Untersuchungsliege (wenn möglich)
1	Schwenker (mit Sichtschutz)
1	Abfallkorb

Der Untersuchungsplatz soll mit einer technisch versierten Untersucherin besetzt sein, die Erfahrung in der Blutabnahme besitzt und dies in der Schulung nachgewiesen hat. Die Bestätigung der Qualifikation durch die Studien- bzw. Schulungsleitung ist erforderlich (Abschlußtest).

6.5.2.2 Hygiene

Dieser Untersuchungsplatz muß immer peinlich sauber gehalten werden.

Benütztes Material sollte stets sofort in den entsprechenden Behältnissen entsorgt werden.

Reinigen Sie den Tisch, die Armauflage und, wenn nötig, auch den Fußboden nach jeder Blutabnahme mit dem dafür vorgesehenen Desinfektionsmittel und Einwegtüchern (z. B. Zellstoff).

Vor und nach jeder Blutabnahme sollte eine gründliche Handwäsche vorgenommen werden.

6.5.3 Materialbestand

Das Blutabnahmematerial muß in angemessener Menge zur Verfügung stehen. Überprüfen Sie kontinuierlich den Bestand und fordern Sie benötigtes Material rechtzeitig im Stammzentrum bei der zuständigen Mitarbeiterin Fr. Pietsch an.

100	Serum-Monovetten (9 ml)
100	Serum Gel Monovetten (7,5 ml)
100	EDTA-Monovetten (9 ml)
100	EDTA-Monovetten (2,7 ml)
100	Flügelkanülen Butterfly 19 G
100	Flügelkanülen Butterfly 21 G
100	Adapter
3	Röhrchenständer (für Monovetten)
2	Staubbinden
2	Desinfektionsmittel für die Blutabnahme (Dibromol Spray)
1	Desinfektionsmittel für die Geräte, Armauflage usw.
2	Wegwerfbehälter für Kanülen mit abnehmbarem Deckel (1 in Gebrauch, 1 Ersatz)
3	Breuschalen (zum Einmalgebrauch)
1	Breuschale (Edelstahl)
1	Rolle Zellstofftupfer und eine Purcellinbox
1	Packung Mullbinden
2	Tuben Heparinsalbe (1 in Gebrauch, 1 Ersatz)
100	Injektionspflaster
2	Rollen Leukosilk 2cm (1 in Gebrauch, 1 Ersatz)
2	Packungen Gummihandschuhe (verschiedene Größen)
2	Packungen Mülltüten (1 in Gebrauch, 1 Ersatz)
1	Packung Kleenex
1	Etikettensatz für die Kontrollproben-Duplikate
1	Handtuch (für Probanden)
10	Etikettensatz Barcode KZVA Labor
100	Laborbelege KZVA Basisuntersuchung A
100	Laborbelege KZVA Basisuntersuchung B
10	Päckchen für Blutabnahme durch den Hausarzt (Anschieben, Serum Gel Monovette, Anforderungsformulare KZVA Belegart 1 in einem etikettiertem Kuvert)

6.5.4 Vorgehensweise

6.5.4.1 Vorbereitung

1. Für die Blutabnahme trägt die Untersucherin einen weißen, sauberen Kittel. Der Proband wird von der Untersucherin zum Blutabnahmeplatz begleitet. Nimmt hier eine andere Untersucherin das Blut ab, wird ihr die Probandenakte übergeben.

2. Überprüfen Sie das benötigte Material (Desinfektionsmittel, Tupfer, Pflaster, Mullbinden, Flügelkanüle, Adapter, Leukosilk, Gummihandschuhe, Röhrchenständer, Abwurfbehältnis) und etikettieren Sie ein vorbereitetes Monovettenset sowie die Laborbelege für das Zentrallabor.

Ein Etikett "Erhebungsnummer" wird jeweils geklebt auf

- die Serumgel-Monovette **1** (7,5 ml),
- die EDTA-Monovette **2** (2,7 ml),
- die EDTA-Monovette **3** (9 ml),
- die EDTA-Monovette **4** (9 ml),
- die Serum-Monovette **5** (9 ml),
- die Serum-Monovette **6** (9 ml),
- die Citrat-Monovette **7** (9 ml),
- die EDTA-Monovette **8** (9 ml),- ein (bei OGT-Probanden zwei) KZVA-Anforderungsschein Basisuntersuchung Belegart: 1 (Abbildung 1),
- ein KZVA-Anforderungsschein Spezialuntersuchung Belegart: 2 (Abbildung 2),
- die Labortagesliste → *siehe Materialienband*

- Je ein Etikett "KZVA-Barcode" wird auf die beiden (bzw. drei) KZVA-Anforderungsscheine geklebt.
- Je ein KZVA Klebeetikett Belegart 1 mit der Aufschrift "klin. Chemie" und ein blaues Etikett "Serum" der Belegart 2 werden zusammen mit der Erhebungsnummer auf der Serumgel Monovette **1** angebracht.
- Ein KZVA Klebeetikett rot mit der Aufschrift "Hämatologie" muß auf das 2,7 ml EDTA Röhrchen **2** geklebt werden.

Die Nummerierung der Monovetten entspricht der bei der Blutabnahme einzuhaltenden Abfolge.

3. Prüfen Sie, ob der Proband marcumarisiert ist (Einnahme von Marcumar, Marcuphen, Coumadin, Phenproratiopharm, Falitrom). Trifft dies zu, soll die Blutabnahme nur erfolgen, wenn ein Arzt im Untersuchungszentrum anwesend ist. Anderenfalls wird der Proband um eine Blutabnahme beim nächsten Arztbesuch gebeten und erhält das Päckchen für den Hausarzt. Die Ausgabe wird sowohl auf dem Untersuchungs- wie dem Zentrumsdokumentationsbogen von der Untersucherin vermerkt.

Sollte der Proband an Hämophilie (Bluterkrankheit) leiden, wird ihm überhaupt kein Blut abgenommen.

4. Erklären Sie dem Probanden Ihr Vorgehen. Hierzu ein Beispiel: "Ich werde Ihnen jetzt Blut aus Ihrer Armvene entnehmen. Wir tun dies, um Analysen ihres Blutes durchzuführen, wovon einige Werte - wie zum Beispiel ihre Blutfette - im Labor des Zentralklinikums bestimmt werden. Sie werden die Ergebnisse zusammen mit einem Befundbrief in einigen Tagen erhalten. Haben Sie noch irgendwelche Fragen ?"
5. Machen Sie den Probanden darauf aufmerksam, daß die Blutabnahme nur einige Minuten dauert.
6. Falls der Proband etwas ängstlich ist, nehmen Sie sich viel Zeit, versuchen Sie beruhigend auf ihn einzuwirken und von der Wichtigkeit der Untersuchung zu überzeugen.
7. Zwingen Sie den Probanden nicht unter allen Umständen zur Blutabnahme.
8. Wenn der Proband die Blutabnahme verweigert, bieten Sie ihm an, daß sein Hausarzt die Blutabnahme vornehmen kann. Stimmt er zu, übergeben Sie ihm das vorbereitete Päckchen für den Hausarzt und vermerken dies im Zentrumsdokumentations- sowie im Untersuchungsbogen. Verweigert der Proband auch diese Form der Blutabnahme, vermerken Sie dies mit Angabe des Grundes.
9. Lassen Sie den Probanden, nachdem er Jacke, Pullover o.ä. ausgezogen hat, bequem auf einem Stuhl (mit Armlehnen) Platz nehmen. Die Blutabnahme erfolgt grundsätzlich im Sitzen. Lediglich bei Probanden, die eine Blutabnahme in sitzender Haltung verweigern, kann diese ausnahmsweise nach Rücksprache mit der Leitung des Untersuchungszentrums im Liegen durchgeführt werden, was auf dem Untersuchungsbogen zu dokumentieren ist. In diesem Fall sollte die Blutabnahme besonders zügig erfolgen, um den Einfluß der liegenden Position möglichst gering zu halten. Der linke Ärmel (bei langarmigen Hemden oder Blusen) ist aufgerollt, so daß die Venen der Ellenbeuge frei liegen. Achten Sie auf die richtige Sitzhöhe und gute Lage des Armes auf der Armauflage (durchgestreckt, aber entspannt).

6.5.4.2 Vorbereitung zur Punktion

1. Suchen der Punktionsstelle:

Legen Sie die Staubbinde 7,5 - 10 cm oberhalb der Venenpunktionsstelle an. Betasten und verfolgen Sie mehrmals den Verlauf der Venen mit dem Zeigefinger. Bei verstopften Venen fehlt die Elastizität, sie fühlen sich schnurähnlich an und rollen sehr leicht. Wenn die oberflächlichen Venen nicht gänzlich erscheinen, dann bitten Sie den Probanden eine Faust zu machen. Ein leichtes, mehrmaliges Beklopfen der Vene mit dem Zeige- und Mittelfinger bewirkt ein Anschwellen der Vene. Durch ein Absenken

des Armes wird bewirkt, daß sich die Venen verstärkt füllen. In schwierigen Fällen kann auch feuchte Wärme das Hervortreten der Venen fördern. Halten Sie ein Handtuch unter heißes Wasser und legen Sie dieses mehrere Minuten lang auf die Ellenbeuge.

Wenn Sie eine geeignete Stelle für die Punktion gefunden haben, lockern Sie die Staubbinde.

2. Gelegentlich wird am linken Arm keine geeignete Vene zu finden sein, oder der Proband wünscht, daß ihm das Blut vom anderen Arm entnommen wird. In diesem Fall nehmen Sie den rechten Arm (Vorgehensweise wie in 5. beschrieben).

3. **Reinigung und Desinfektion der Venenpunktionsstelle:**

Besprühen Sie die von Ihnen gewählte Entnahmestelle mit dem Desinfektionsmittel. Säubern Sie die Haut an der Entnahmestelle durch einmaliges Abreiben mit einem Zellstofftupfer. Warten Sie, bis die Stelle trocken ist, um eine mögliche Hämolyse des Blutes durch das Desinfektionsmittel zu vermeiden, da diese zu Veränderungen der Blutwerte führt. Wenn die Venenpunktion schwierig erscheint, müssen Sie gegebenenfalls die Vene erneut betasten. Falls dies der Fall ist, muß die betreffende Stelle noch einmal mit dem Desinfektionsmittel gesäubert werden.

4. **Die Vorbereitung der Monovetten und Punktionsmaterialien**

- Während das Desinfektionsmittel trocknet, bereiten Sie sich das Material vor, das Sie benötigen (Sarstedt- Monovetten, Flügelkanüle und Adapter).
- Röhrchen, die schon einmal verwendet oder unsachgemäß benutzt wurden, sind unmittelbar zu entsorgen. Benutzen Sie keine Kanülen, bei denen die Verpackung beschädigt oder verschmutzt wurde.
- Schauen Sie sich die Spitze der Nadel an, um zu sehen, ob keine Haken an ihrem Ende sind und die Öffnung der Nadel frei von kleinen Partikeln ist, die den Fluß des Blutes behindern könnten. Fassen Sie die Nadel nicht an (die Nadel muß steril sein).
- Jede Monovette muß mit einem Erhebungsnummernetikett des entsprechenden Probanden versehen sein, auf der Serumgel(1)- und der 2,7 ml EDTA(2) Monovette müssen zusätzlich die Laborklebeetiketten der KZVA Laboranforderungsscheine befinden(s.o.).
- Vermeiden Sie beim Aufkleben der Etiketten eine zirkuläre Anbringung, da sonst die Füllskala teilweise verdeckt wird und ein eventuell exaktes Ablesen der Füllmenge behindert wird.
- Kontrollieren Sie die Erhebungsnummer der Monovetten mit der Erhebungsnummer des Probandendeckblattes.

6.5.4.3 Durchführung der Blutabnahme

Um direkten Kontakt mit Probandenblut zu vermeiden, darf die Blutentnahme grundsätzlich nur mit Gummihandschuhen durchgeführt werden.

1. **Lassen Sie die Staubinde niemals länger als eine Minute und auch dann nur mit geringem Staudruck angelegt.** Zum einen ist eine zu lange Stauung für den Probanden sehr unangenehm, zum anderen kommt es sonst zu einer Konzentration des Blutes (Hämokonzentration) und dadurch zu einer Veränderung der Blutwerte.
2. Stecken Sie vor der Punktion den Adapter auf das Schlauchende des Flügelkanüle.
Suchen Sie die Punktionsstelle unter mäßiger Stauung. Wenn Sie sich für eine Stelle entschieden haben, öffnen Sie die Staubinde. Anschließend reinigen Sie die Punktionsstelle wie unter 10 beschrieben. Dann stauen Sie erneut und nehmen zügig das Blut ab.
Nehmen Sie den Arm des Probanden mit festem Griff, benutzen Sie den Daumen, um die Haut zu straffen. Dies dient zur Fixierung der Vene. Der Daumen sollte sich dabei 2,5-5,0 cm unterhalb der Venenpunktionsstelle befinden.
Stechen Sie mit einer ruhigen, gleichmäßigen Bewegung in die Vene, die geöffnete Spitze der Nadel soll dabei nach oben zeigen.
3. Fließt Blut in die Kanüle ein, ist die Staubinde zu öffnen. Fixieren Sie die Flügelkanüle mit Klebepflaster.
4. Stecken Sie nun die erste (Serum-)Monovette auf den Adapter und füllen Sie diese durch vorsichtigen und gleichmäßigen Zug am Stempel. Danach wird die Monovette nach einer leichten Linksdrehung von der Kanüle abgezogen. Kippen Sie die Monovette zwei bis drei Mal und legen Sie sie in die dazu bestimmte Nierenschale. Anschließend wird die nächste (EDTA-)Monovette aufgesteckt und befüllt. Legen Sie die EDTA-Monovetten nach der Füllung sofort auf den eingeschalteten Schwenker (mit Stempel). Serum- und Serumgel-Monovetten werden unmittelbar nach Beendigung der Blutabnahme in die Kühlung(4°) gelegt
5. Die Reihenfolge der Monovetten ist unter 6.5.4.1 vorgegeben.
6. Bitten Sie den Probanden, die Faust zu öffnen, wenn Sie alle Entnahmeröhrchen gefüllt haben.

Legen Sie, um die Nadel zu entfernen, einen Zellstofftupfer über die Venenpunktionsstelle.

Entfernen Sie die Nadel rasch und üben Sie sofort mit Ihrem Daumen Druck auf die Punktionsstelle aus.

7. Fordern Sie den Probanden auf, den Tupfer fest auf den Arm zu drücken und diesen eine Minute lang gestreckt hochzuhalten, um ein Hämatom zu vermeiden. Danach sollte noch einige Minuten Druck auf die Punktionsstelle ausgeübt werden, der Arm soll dabei im Ellenbogen nicht abgewinkelt sein.
8. Werfen Sie die Flügelkanüle unbedingt in den dafür vorgesehenen gelben Behälter, und achten Sie dabei besonders darauf, sich nicht zu verletzen. Die integrierten Klappdeckel der Abwurfbehälter sind über Nacht zu verschließen. Sobald der Behälter $\frac{3}{4}$ gefüllt ist, wird der Klappdeckel mit Kelbeband für den Abtransport gesichert. Ein Umfüllen der Abwurfbehälter ist nicht gesattet.
9. Verbinden Sie den Arm, indem sie unter normalen Bedingungen ein Heftpflaster über die Venenpunktionsstelle kleben, nach dem sie sich vergewissert haben, daß der Blutfluß zum Stillstand gekommen ist.
10. Falls der Proband weiterhin blutet:
 - Üben Sie mit einem Zellstofftupfer Druck auf die Punktionsstelle aus. Der Arm muß so lange hoch gehalten werden, bis die Blutung aufgehört hat.
 - Wickeln Sie gegebenenfalls eine Mullbinde um den Arm über den Tupfer.
 - Sagen Sie dem Probanden, er soll die Binde mindestens 15 Minuten angelegt lassen.
11. Diejenige, die die Blutabnahme durchführt, soll auch auf stärkere Blutungen vorbereitet sein. Dauert die Blutung länger als fünf Minuten, sollte im SZ ein Arzt, im AZ die Zentrumskoordinatorin oder eine andere Untersucherin informiert werden, damit diese den zuständigen Arzt verständigt. Üben Sie weiterhin Druck auf die Punktionsstelle aus, so lange es nötig ist, bis die Blutung aufhört. Notieren Sie die Umstände unter "Besondere Vorkommnisse bei der Blutabnahme" im Untersuchungsbogen.
12. Sollte sich an der Punktionsstelle ein Hämatom zeigen, oder der Proband über Schmerzen klagen, bringt ein kleiner Salbenverband mit Heparinsalbe Linderung.
13. **Falls die Blutabnahme nicht erfolgreich ist:**
 - Verändern Sie die Stellung der Nadel durch Drehung. Falls diese zu weit in die Vene eingedrungen ist, ziehen Sie sie ein wenig zurück. Falls die Nadel nicht weit genug eingedrungen ist, schieben Sie sie noch weiter in die Vene vor.

- Lösen Sie die Staubbinde. Wenn sie zu eng angelegt wurde, behindert dies den Blutfluß. Legen Sie die Staubbinde erneut etwas weniger straff an. Vergewissern Sie sich jedoch, daß sie bei jedem Versuch nicht länger als eine Minute angelegt bleibt.
 - Ein mehrmaliges Herumprobieren (an derselben Stelle) ist nicht empfehlenswert, da es für den Probanden schmerzhaft ist. In den meisten Fällen empfiehlt es sich, unterhalb der ersten Stelle eine erneute Punktion vorzunehmen.
14. Machen Sie nur zwei Versuche: Fragen Sie dann den Probanden, ob er bereit wäre, sich von einer anderen Untersucherin punktieren zu lassen. Falls die Blutentnahme auch der zweiten Mitarbeiterin nach max. zwei Versuchen nicht gelingt, vermerken Sie dies im Untersuchungsbogen.
15. **Wenn sich ein Proband schwach fühlt oder schwach aussieht:**
Bei Blutabnahmen mit Flügelkanülen treten weniger Probleme auf als mit normalen Kanülen. Sollte sich der Proband trotzdem einmal schwach fühlen oder schlecht aussehen, so
- Beruhigen Sie den Probanden und halten Sie ihn, damit er nicht umfällt. Verletzungsgefahr!
 - Sorgen Sie dafür, daß er sitzenbleibt - wenn möglich mit hochgelagerten Beinen, bis seine Gesichtsfarbe zurückkehrt oder er sich besser fühlt.
 - Falls der Proband Übelkeit verspürt, geben Sie ihm eine Schale.
 - Falls er sich weiterhin unwohl fühlt, messen Sie Blutdruck und Puls.
 - Falls der Proband ohnmächtig zu werden droht, legen Sie ihn mit Hilfe einer anderen Untersucherin auf den Boden oder auf eine Liege und lagern Sie seine Beine hoch. Informieren Sie unverzüglich einen der anwesenden Ärzte(SZ). Im Außenzenrum muß vor Beginn der Untersuchungsperiode eine nahegelegene Praxis gesucht werden und der Arzt informiert werden, daß man gegebenenfalls auf ihn zukommen wird. Seine Telefonnummer sollte am Blutabnahmeplatz griffbereit sein.
16. Vermerken Sie Ihre Untersuchernummer für die Blutabnahme im Zentrumsdokumentationsbogen !!! , notieren Sie dort den Blutabnahme-Status und komplettieren Sie den Untersuchungsbogen "Blutabnahme".
17. Danken Sie dem Probanden und begleiten Sie ihn zur nächsten Untersuchungsstation.

6.5.4.4 Abnahme von doppelten Proben(Duplikaten)

- A. Um die Zuverlässigkeit der Labortests überprüfen zu können, sollen blinde Duplikate von Blutproben unter die anderen Proben eingestreut werden. Dies soll nach ungefähr

jeder 30. Blutprobe geschehen. Während der Pilotphase bleibt das Erstellen der Duplikate auf das SZ beschränkt, so daß unter Berücksichtigung der AZ-Pb bei etwa jeder 20. Blutprobe im SZ die für das Klinikum bestimmten Monovetten (1 und 2 oder alternativ ein EDTA-Röhrchen) doppelt abgenommen werden sollten. Der Zeitpunkt zur Abnahme doppelter Proben wird anhand der Labortageslisten festgelegt und obliegt der Labor-MTA des SZ, die den Pb aussucht und die zuständige Untersucherin rechtzeitig informiert. Willigt der Teilnehmer in die zusätzliche Abnahme ein, so wird die Anmeldung gebeten, den Pb unter einer zweiten Erhebungsnummer im PDM anzumelden und einen dazugehörigen Laboretikettensatz auszudrucken.

Die Kontrollprobe soll von einem geeigneten Probanden entnommen werden, der etwa auf folgende Art und Weise eingeladen werden soll, bei der Qualitätskontrolle mitzuwirken: "Es ist nötig, in regelmäßigen Abständen die Qualität unserer Laboranalysen zu überprüfen. Würde es Ihnen etwas ausmachen, wenn ich Ihnen zu diesem Zweck zwei weitere Röhrchen Blut abnehme?" Falls der Proband zustimmt, werden eine 9 ml-Serumgel-Monovette und eine 2,7 ml EDTA-Monovette (oder alternativ: eine EDTA-Monovette zusätzlich entnommen. Diese Proben werden behandelt wie alle anderen Proben.

- B. Kennzeichnung: Die Aufkleber (eine zweite KORA-Erhebungsnummer sowie die dazugehörigen Etiketten der zweiten KZVA-Laboranmeldung) für die Kontrollprobe werden nach Einwilligung des Probanden von der Anmeldung des SZ zur Verfügung gestellt.. *Die Etiketten für die Kontrollproben dürfen nur für diese Duplikate verwendet werden.* Es handelt sich dabei um Nummern, die außerhalb des Bereiches der "echten" Erhebungsnummern liegen. In der Laborliste werden die Kontrollproben-Erhebungsnummernetiketten direkt unter die "echte" Erhebungsnummer geklebt, rechts daneben die beiden Kontrollprobenetiketten des KZVA-Labors. Es muß ein vermerk angebracht werden: Pb xxxxx is Duplikat von Pb yyyy. Ein weiteres Etikett mit der Kontrollprobenerhebungsnummer wird auf dem Untersuchungsbogen unterhalb der ersten Erhebungsnummer angebracht. Für die Duplikatproben werden ebenfalls KZVA-Anforderungsformulare ausgefüllt. Sollte ein EDTA-Röhrchen entnommen worden sein, wird dieses behandelt wie EDTA 3 oder EDTA 4.

6.5.4.5 Spezielle Vorgehensweisen:

1. Die Flügelkanülen müssen nach der Blutabnahme, unmittelbar in die gelben Abwurfbehälter geworfen werden.

2. Die Flügelkanülen müssen sicher aufbewahrt sein, wenn das Zentrum geschlossen ist.
3. Zur Vermeidung des Infektionsrisikos bei direktem Kontakt mit Blut müssen von allen Untersucherinnen bei der Blutentnahme Handschuhe getragen werden.

4. Falls sich der Untersucher tatsächlich einmal an einer benutzten Nadel verletzt, muß die Wunde sorgfältig mit Seife und Wasser gereinigt und anschließend desinfiziert werden. (Bitte beachten Sie die im sog. „Stichinfo“ detailliert beschriebenen Verhaltensregeln). Ein kurzer Bericht über den Vorfall sollte erstellt und dem Leiter des Stammzentrums übergeben werden. Zusätzlich muß der Vorfall im Zentrumsdokumentationsbogen (Rückseite) mit Untersuchernummer und Probandennummer vermerkt werden. Es wird angeraten (für die Angestellten des KZVA ist dies Pflicht), sich selbst unmittelbar einer Blutabnahme zu unterziehen und die Titer für HIV sowie Hepatitis B/C bestimmen zu lassen. Gleichzeitig sind ggf. entsprechende Analysen im Probandenblut durch das Labor des Zentralklinikums zu veranlassen. **Zuvor sollte aber unbedingt Rücksprache mit dem zuständigen Arzt, Herrn Papke (Tel.: 0821/3 46 42 -12), vorgenommen werden.**

Abbildung 1: KZVA-Belegart „Basisuntersuchung“

KORA-Barcode-Etikett

Entnahme-Zeit

Patientenetikett-KZVA

Etikett für Tagesliste

Markierungen (umfaßt alle Parameter)

KZVA - Barcode-Etikett Serum Gel Röhrchen ---- für das 2,7 ml EDTA-Röhrchen

Abbildung 2: KZVA-Belegart „OGT“

KORA-Barcode-Etikett

Entnahme-Zeit

Patientenetikett-KZVA

Etikett für Tagesliste

Markierungen für Glukose

KZVA-Barcode-Etikett für das Serum Gel Röhrchen (OGT)

6.6 Handhabung und Weiterverarbeitung der Blutproben (A. Döring, T. Immervoll, K. Papke, M. Pietsch, B. Zeitler)

6.6.1 Aufgaben, Labororganisation

Die Weiterverarbeitung der in S-2000 gewonnenen Blutproben läßt sich in folgende Arbeitsgebiete unterteilen:

- **Aliquotierung**
 - Zentrifugieren/Pipettieren (AZ/SZ)
 - Maschinelle Befüllung von sog. Strohhalmern (SZ)
- **Besondere Methoden zur Blutprobenaufbereitung**
 - DNA - Isolation (SZ)
 - Isolierung von B-Lymphozyten (SZ)
 - Aufbereitung von EDTA-Blut zur RNA-Gewinnung(AZ/SZ, Vorpipettierung: (SZ)
- **Versand**
 - AZ → Routinelabor (KZVA)
 - SZ → Routinelabor (KZVA)
 - AZ → SZ
 - SZ → GSF
 - SZ → Projektpartner
- **Lagerung**
 - Tiefkühlagerung (SZ, temporär)
 - Stickstofflagerung (GSF)

Die Weiterverarbeitung der Blutproben in den Außenzentren wird entsprechend der eingeschränkteren Möglichkeiten auf das Zentrifugieren, Aliquotieren sowie die Aufbereitung von EDTA-Blut zur RNA-Gewinnung durch die Untersucherinnen beschränkt bleiben. Im Stammzentrum werden zusätzlich die DNA-Isolation, die Isolierung von B-Lymphozyten, sowie die Vorbereitung von Serum und Plasma zur Stickstoffeinlagerung mittels maschineller Befüllung sogenannter "Strohhalme" durchgeführt. Diese Arbeiten setzen professionelle Laborkenntnisse sowie eine spezielle Methodenschulung voraus und sollen daher von drei ausgebildeten MTAs übernommen werden, die jeweils die gesamte Methodik beherrschen müssen, um sich gegenseitig vertreten zu können. Damit die Probenweiterverarbeitung auch im Falle außerplanmäßiger Fehlzeiten aufrecht erhalten werden kann, wird mindestens eine Reservekraft mit Befähigung zur manuellen und maschinellen (Bedienung des MAPI-Gerätes) Aliquotierung benötigt. Es gilt für alle im Labor tätigen Mitarbeiter/innen das Prinzip, die erworbenen Kenntnisse durch regelmäßigen Einsatz aufrecht zu erhalten. Für die

MTAs bedeutet dies eine abwechselnde Tätigkeit an jedem Laborarbeitsplatz, die Reservekraft muß die Aliquotierung in regelmäßigem wöchentlichen Umfang durchführen.

Die im SZ vorgesehene Raumausstattung sieht ein Labor für die Aliquotierung/DNA-Isolation sowie einen zweiten Raum zur Isolierung von B-Lymphozyten unter sterilen Bedingungen vor.

Zeitliche Anforderungen

DNA- bzw. B-Lymphozytenisolation erfordern eine Probenbearbeitung innerhalb von 30 Stunden. Daraus ergibt sich, daß auch nach dem Freitags- sowie dem Samstagvormittagsbetrieb ein regelmäßiger Arbeitsbedarf innerhalb dieser Frist besteht. Der Transportzeitpunkt (s. 5.1.6) zwischen AZ und SZ ist bewußt so gewählt, daß jeweils nachmittags die Blutproben desselben Vormittags einschließlich des vorangehenden Nachmittags bearbeitet werden können. Der Arbeitsanfall vor untersuchungsfreien Tagen beschränkt sich so auf die Blutmengen eines halben Untersuchungstages. An Samstagen mit Vormittagsbetrieb ist es notwendig, die Weiterverarbeitung am Nachmittag durchzuführen.

6.6.2 Allgemeine Anweisung zur Weiterverarbeitung der Blutproben

1. Die Handhabung und die Weiterverarbeitung der Proben muß genauso sorgfältig wie die Blutabnahme durchgeführt werden. Ein Abweichen von der Vorgehensweise kann die im Blut zu messenden Werte verändern. Auch hier wird immer mit Gummihandschuhen gearbeitet.
2. Die Zentrifuge sollte nicht in einem Raum, in dem sich Blutdruckmeßplätze befinden, aufgestellt sein. Jeden Morgen und jeden Abend wird die Temperatur im mittleren Fach des Kühlschranks gemessen und im Geräteprotokoll eingetragen. Vier Kühlakkus für den Serumtransport werden ins Kühlfach gelegt.

6.6.2.1 Weiterverarbeitung

1. Unmittelbar nach der Blutabnahme werden die Serumröhrchen gekippt, der Stempel abgebrochen und anschließend die Röhrchen auf den Schüttler gelegt .
2. Mischen Sie auch das Blut in den vier EDTA-Monovetten sowie das Citratblut auf dem dafür vorgesehenen Schüttler bis zur Beendigung des Blutabnahmeporganges.

A) EDTA-Blut

EDTA-Monovette 9 ml Nr.8

Unmittelbar nach dem Befüllen und 4-maligem Schwenken dieser Monovette wird deren Stempel entfernt und die Kappe abgeschraubt. Mittels der GILSON-Pipette P5000 werden exakt 5 ml EDTA-Blut abpipettiert und in ein mit einem Pb-Etikett versehenes Rundbodenröhrchen mit 5 ml vorgelegter RNA-Stabilisierungslösung gegeben. Der Wiederverschluß muß mit größter Sorgfalt geschehen und das Röhrchen ist zunächst durch Umdrehen auf Dichtigkeit zu überprüfen, bevor es (möglichst zwischen Daumen und Zeigefinger) 3-4 mal in der Längsachse geschüttelt wird, bis sich eine homogene Masse gebildet hat. Das Zeitintervall zwischen dem Lösen der Monovette Nr. 8 vom Adapter bis zur Homogenisierung darf 2 Minuten nicht überschreiten. Anschließend wird das RNA-Rundbodenröhrchen für ca. 5 Min. auf den Schüttler gelegt und dann in den entsprechenden Ständer im Kühlschrank gestellt. Später erfolgt dessen Einlagerung im Kühlschrank (AZ, bis zum Transport in das SZ) bzw. im Gefrierschrank (SZ).

Die Monovette Nr. 8 wird wieder verschlossen und für 15 min. auf den Schüttler gelegt.

EDTA-Monovetten 2,7ml Nr.2 und 9 ml Nr. 3,4

1. Nach Beendigung der Blutentnahme und Versorgung des Probanden, wird das EDTA-Blut für mindestens 15 Minuten auf dem Schüttler belassen und anschließend im Kühlschrank in Ständern deponiert, die 2,7 ml Monovette Nr. 2 kommt in den Ständer "KZVA".

B) Serum

1. Serumgel(Nr.1)- / Serum-Monovetten Nr. 5 und Nr. 6 (mit Kaolinkügelchen)

1. Die Serummonovetten nach Schemadarstellung 6.6.3 im Manual bearbeiten.
2. Bevor Sie zentrifugieren, müssen Sie die Proben ausbalancieren. Bestücken Sie die Einsätze, die sich gegenüberliegen, gleich. Wenn die Monovetten nicht gleichmäßig gefüllt sind, füllen Sie zu jeder Monovette eine entsprechende Monovette mit Wasser und geben Sie diese in den gegenüberliegenden Einsatz. Bestücken Sie den Rotor, indem Sie jeweils gleichgewichtige Einsätze in entgegengesetzte Positionen einsetzen.
3. Stellen Sie die Zeitschaltuhr auf 15 Minuten und erhöhen Sie die Geschwindigkeit langsam auf 4000 Umdrehungen pro Minute. Notieren Sie in der Laborliste die Uhrzeit (Beginn des Zentrifugierens)

C) Citratblut

Die grüne Citratblut-Monovette wird für mindestens 15 Min. auf dem Schüttler belassen und dann 15 Min. bei 4000 U/min zentrifugiert. Anschließend wird das Plasma nach Schemadarstellung in die 1ml-NUNC-Röhrchen F1-F8 aliquotiert.

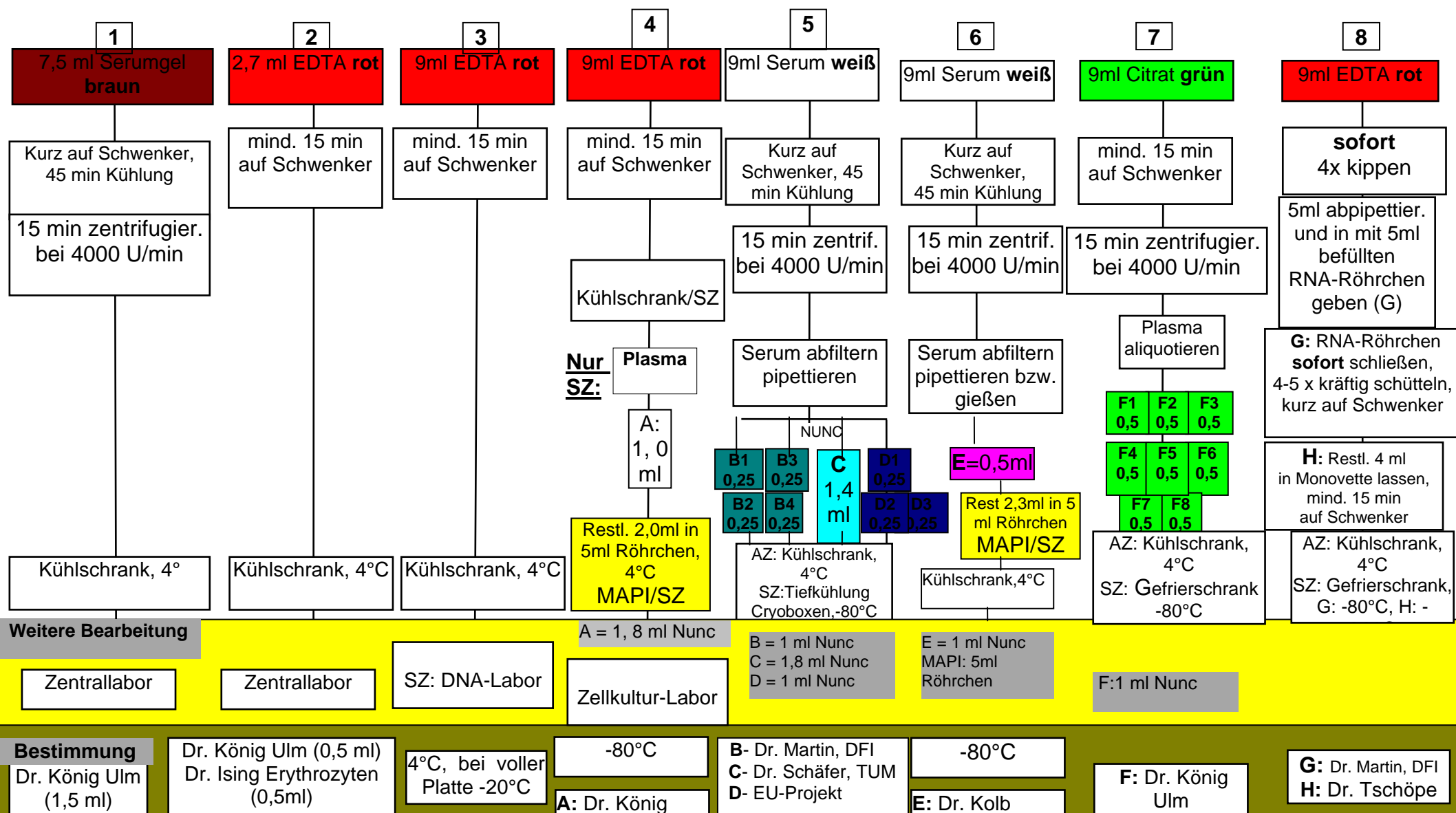
6.6.2.2 Aliquotierung

1. Für jeden Probanden sind von den für die Blutverarbeitung zuständigen Untersucherinnen insgesamt 17 NUNC-Röhrchen (Röhrchengrößen: 4x1ml „B“, 3x1ml „D“, 1x1ml „E“, 7x1ml „F“, 1x1,8ml „C“, 1x5ml „MAPI“) mit Erhebungsnummernetiketten (Klartext) zu versehen.

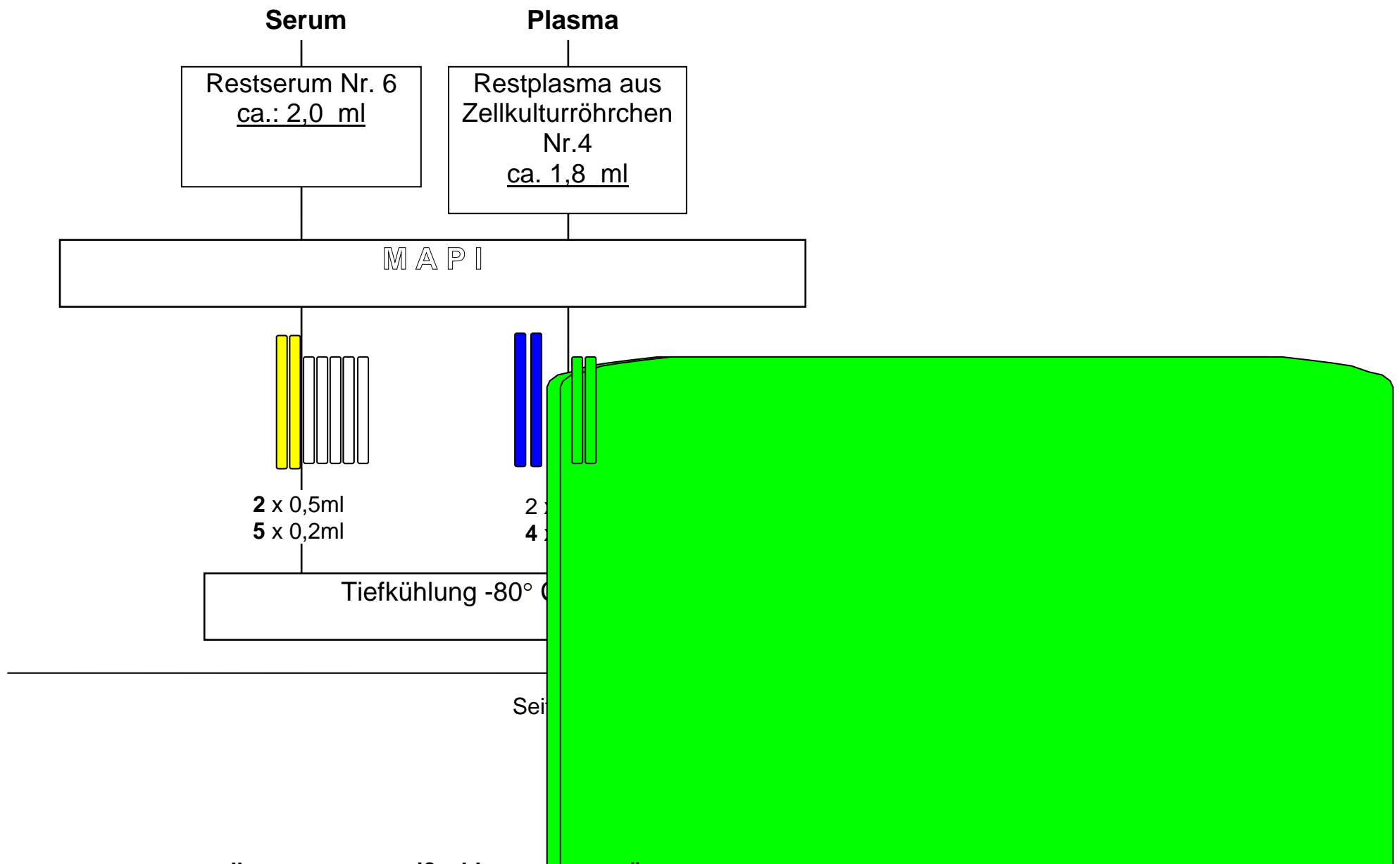
Anm.: Die im Verarbeitungsplan aufgeführte EDTA-Monovette Nr. 4 wird ausschließlich von den SZ-MTAs gefüllt.

2. Lassen Sie die Zentrifuge auslaufen (Bremsstufe 9 bei Zentrifuge „Universal 32 R“). Nach Stillstand der Zentrifuge nehmen Sie die Monovetten aus den Einsätzen. Um das Serum aus Monovette „5“ bzw. „6“ vom Blutkuchen zu trennen, führen Sie langsam den Filter in die Serummonovette ein (bis aufsteigende Erythrozyten zu beobachten sind). Es ist dabei sehr wichtig darauf zu achten, daß keinerlei feste Blutbestandteile aus dem „Steigrohr“ des Filters von oben her in das Serum gelangen. Das aus der Serummonovette „5“ gewonnene Serum wird sodann in die 1ml-NUNC-Röhrchen „B“, „C“ und „D“ pipettiert. Reicht die Serummenge aus Monovette „5“ nicht aus, so kann ggf. ein Rest aus Monovette „6“ z.B. zur Befüllung von „D1-D3“ verwendet werden.
3. Aus der Serummonovette „6“ wird ebenfalls mit Hilfe des Filters Serum gewonnen und 0,5 ml in das Röhrchen „E“ und mind 2,3 ml Serum in das 5ml-NUNC-Röhrchen „MAPI“ pipettiert. Falls die Gesamtmenge Serum nicht für alle 17 Röhrchen reicht, so sollte die Menge „C“ verringert, ggf. weggelassen werden. Vergleichen Sie bitte nach dem Aliquotieren noch einmal alle Etiketten, ob die Probandennummern übereinstimmen.
4. Lagerung in den zum Transport bestimmten Kryoboxen (s. 6.6.5) bei 4°C. Die Proben dürfen nicht gefrieren.
5. Protokollieren Sie alle Arbeitsschritte in der Laborliste. Jede Abweichung vom vorgeschriebenen Vorgehen muß in der Laborliste vermerkt werden.
6. Nach Abschluß aller Arbeiten lösen Sie die Etiketten von **nicht verwendeten Röhrchen**. Dies tritt ein, wenn bei der Blutentnahme nicht alle acht Monovetten gefüllt werden konnten!

6.6.3 Schemadarstellung der Blutprobenweiterverarbeitung und Aliquotierung

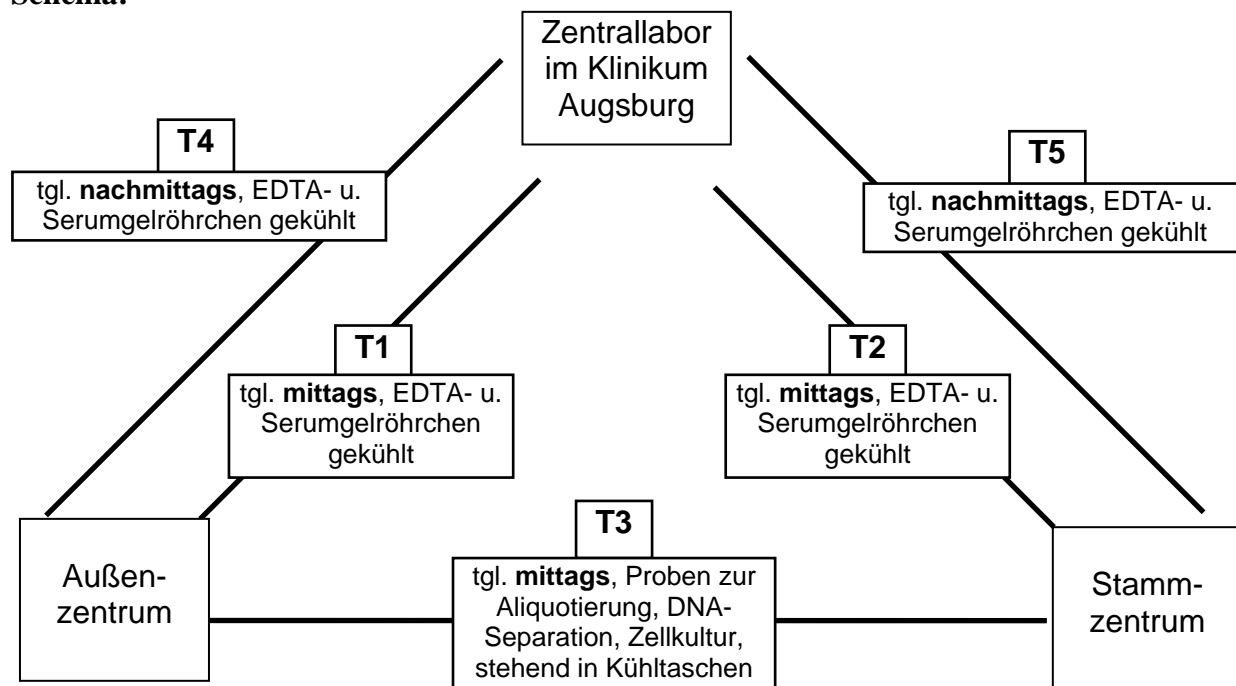


6.6.4 Schemadarstellung zur maschinellen Probenaufbereitung für die Stickstofflagerung



6.6.5 Probentransport

Schema:



Transporte T1 (AZ → Klinikum) , T2 (SZ → Klinikum), mittags

- Die Transporte erfolgen tgl. jeweils mittags nach abgeschlossener Erstverarbeitung der Expositionsblutprobe des letzten OGT-Teilnehmers und umfassen sämtliche Blutproben zur Bestimmung der Routineparameter, die am selben Vormittag und am Nachmittag (ggf. am Abend) des Vortages gewonnen wurden.
- Der Transport umfasst pro Proband folgende Abnahmeröhrchen:

- 2x 9ml Serumgel-Monovetten **Nr.1, Nr.9*** - braun
- 1x 2,7 ml EDTA-Monovette **Nr.2** - rot

* Nr.9 entspricht der zweiten Blutabnahme (postexpositionell) bei OGT-Teilnehmern.

- Alle zu transportierenden Röhrchen werden spätestens 15 Minuten vor der vereinbarten Transportzeit aus der Kühlung genommen und in die Ständer der Metalltransportkästen gestellt. Diese werden zusammen mit Kühlelementen in die Kühltaschen gegeben. Zuvor ist die Sendung durch Vergleich der „Tagesliste KZVA-Labor“ mit den vorhandenen Röhrchen auf Vollständigkeit und durch Prüfung der Proben-Etiketten auf Übereinstimmung mit den Laboranforderungsscheinen auf Richtigkeit zu prüfen. **Das Zeitintervall zwischen der Abnahme des ersten 2,7 ml EDTA-Röhrchens am Morgen bis zur Ankunft im Labor des Zentralklinikums darf 6 Stunden in keinem Fall überschreiten.**

Transporte T3 (AZ → SZ) mittags

- Dieser Transport entspricht in Rhythmus und Zeitpunkt den Transporten T1/T2 und umfasst (bei vollständiger Blutabnahme) pro Proband:
 - Citratplasma in 8 NUNC-Röhrchen zur Tiefkühlagerung
 - Serum in 10 NUNC-Röhrchen zur Tiefkühlagerung
 - 10 ml Rundbodenröhrchen mit RNA Stabilisierungslösung-Vollblutgemisch
 - 2x 9ml EDTA-Monovetten Nr. 3/ Nr. 4 mit Vollblut
- Zum Transport der NUNC-Röhrchen werden Kryo-Boxen wie folgt beschriftet und verwendet:

1 BOX "F" Nunc-Röhrchen 1,0 ml "F1 - F7"

1 BOX Nunc-Röhrchen 1,0 ml "B, D, E"

"B,D,E ,C,M" Nunc-Röhrchen 1,8 ml „C“, Nunc-Röhrchen 5,0 ml „M“

- Die Rundbodenröhrchen werden zusammen mit den EDTA-Monovetten „3“ u. „4“ in die Ständer der Metall-Transportkästen gestellt. Alle Behältnisse werden in Kühltaschen transportiert.
- Die Dokumentation der übergebenen Materialien erfolgt seitens des AZ auf einer Übergabeliste, die dem Transport im Original beizufügen ist.
- Dieser Transport dient nicht nur zur Beförderung von Proben, sondern wird auch für die Mitnahme der am nächsten Tag im AZ benötigten Laboretiketten genutzt.

Transporte T4 (AZ → Klinikum) , T5 (SZ → Klinikum), nachmittags

- Die Transporte umfassen pro Proband folgende Abnahmeröhrchen:
 - 1x 9ml Serumgel-Monovetten **Nr.1** - braun
 - 1x 2,7 ml EDTA-Monovette **Nr.2** - rot
- Alle zu transportierenden Röhrchen werden spätestens 15 Minuten vor der vereinbarten Transportzeit aus der Kühlung genommen und in die Ständer der Metalltransportkästen gestellt. Diese werden zusammen mit Kühlelementen in die Kühltaschen gegeben. Zuvor ist die Sendung durch Vergleich der Labor-Tageslisten mit den vorhandenen Röhrchen auf Vollständigkeit und durch Prüfung der Proben-Etiketten auf Übereinstimmung mit den Laboranforderungsscheinen auf Richtigkeit zu prüfen. **Das Zeitintervall zwischen der Abnahme des ersten 2,7 ml EDTA-Röhrchens am Nachmittag bis zur Ankunft im Labor des Zentralklinikums darf 6 Stunden in keinem Fall überschreiten.**

Transportzeiten vor untersuchungsfreien Tagen

Vor untersuchungsfreien Tagen werden zusätzliche Abendtransporte vom Typ „T3“ mit den gesammelten Proben desselben Nachmittags durchgeführt.

6.6.6 Besondere Methoden zur Blutprobenaufbereitung

6.6.6.1 DNA-Isolation

Erwartete DNA Menge: 160-320 µg

Zellyse

1. 27 ml RBC Lysis Solution in 50 ml Falcon tube geben, 9 ml Vollblut dazu pipettieren und anschließend Falcon tube 2 x umdrehen, um Inhalt zu mischen; 10` bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
2. 10` bei 2000 x g zentrifugieren, Überstand abgießen, 200 - 400µl bleiben im Falcon tube
3. Falcon tube vortexen bis Zellen vollständig in Restflüssigkeit gelöst sind (**wichtig!**)
4. 9 ml Cell Lysis Solution zupipettieren (Stepper); Tube kurz vortexen, um Zellen mit Flüssigkeit zu mischen. Falls Zellklumpen auftauchen bei RT inkubieren bis Zellklumpen verschwunden sind; ansonsten kann sofort weiter gearbeitet werden (Die Proben sind in der Cell Lysis Solution für 18 Monate stabil und können bei diesem Schritt über Nacht oder übers Wochenende bei 4°C aufbewahrt werden).

Protein Präzipitation

1. 3 ml Protein Precipitation Solution zum Zelllysate pipettieren
2. 20`` bei maximaler Stufe vortexen, um die Protein Precipitation Solution mit dem Zelllysate zu mischen. Zentrifugieren (2000 x g, 10`). Die präzipitierten Proteine bilden in der Regel ein festes dunkelbraunes Pellet. **Wenn Pellet nicht fest ist**, Schritt 3 wiederholen, anschließend 15` bei 4°C inkubieren und dann Schritt 4 noch einmal wiederholen (20`)

DNA Präzipitation

1. 9 ml 100% Isopropanol in neues Falcon tube vorlegen
2. Überstand in Falcon tube überführen (abgießen!!) (**wichtig!! dunkelbraunes Pellet muß zurückbleiben**)
3. Mischen durch 50maliges vorsichtiges Umdrehen des Gefäßes (Überkopfschüttler!!!)
4. homogen vermischen (**wichtig!**)
5. 3` bei 2000 x g zentrifugieren; die DNA ist als kleines weißes Pellet sichtbar!
6. Überstand abgießen; Gefäß umgedreht auf trockenes, sauberes Cleanex stellen und kurz (1-2`) trocknen lassen. 9 ml 70 % Ethanol hinzupipettieren, Gefäß verschließen und 3 x umdrehen, um das Pellet zu waschen.
7. 2`- 3` bei 2000 x g zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen, weißes DNA Pellet oft lose, Pellet beobachten. (**wichtig!!! Pellet ist DNA, muß unter allen Umständen im Falcon tube bleiben!!!!**)
8. DNA Pellet 15` trocknen lassen. Dazu Falcontube umgedreht auf trockenes Cleanex stellen (30`)

DNA Hydratisierung

1. 750 µl DNA Hydration Solution zugeben (entspricht bei 9 ml Blut einer DNA Konzentration von ca. 400µg/ml) und über Nacht bei RT stehen lassen, DNA löst sich in DNA- Hydration Solution
2. Am nächsten Tag leicht Schütteln, 2` bei 2000 x g zentrifugieren und Überstand in 96-well-qiagen-Platten überführen (10 (**wichtig, Lageplan etikettieren !**))
3. Die DNA wird (bis zur endgültigen Lagerung bei - 20°C) im Kühlschrank bei 4° gelagert.

Gesamtzeit bei 28 Proben ca. 3.5 h

6.6.6.2 Isolierung von B- Lymphozyten aus humanem Vollblut

Bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe tragen, Blut ist infektiöses Material

Vor dem Öffnen der Monovette Verschuß mit 70% ETOH desinfizieren.

Nach dem Öffnen Blut mit steriler Einmalpipette aus der Monovette in ein steriles 15 ml Falcontube überführen,

Histopaque 1077 auf 37°C vorwärmen.

In ein steriles 50ml tube 9ml Histopaque vorgeben, dann 9ml Blut vorsichtig mit steriler Einmalpipette überschichten. (Blut darf nicht durch die Ficollschicht schießen !)

Zentrifugation bei RT ,30Min. 400 x g.

Nach der Zentrifugation sind 4 Phasen sichtbar.

Die oberste (1.) Phase enthält Plasma

Die 2. Phase (Interphase) besteht aus dem Lymphozytenring

Die 3. Phase ist Ficoll

Die 4. Phase besteht aus dem roten Zellpellet.

2 ml der oberen Plasmaphase werden vorsichtig mit einer sterilen Einmalpipette abgenommen und in ein 5ml-NUNC-Röhrchen überführt für die MAPI Abfüllanlage.

1 ml der oberen Plasmaphase werden in ein 1,8 ml NUNC- Röhrchen pipettiert (siehe Schemadarstellung der Blutprobenweiterverarbeitung).

Die 2. Phase (Interphase) wird vorsichtig mit steriler Pipette abgenommen, in ein steriles 50 ml Falcontube überführt und mit PBS auf 10ml aufgefüllt.

Zentrifugation RT 15Min. 60-100g

Nach Zentrifugation Überstand vorsichtig abpipettieren, Restpellet wieder mit PBS auf 10ml auffüllen, zweiter Waschzentrifugationsgang.

Überstand abnehmen bis auf ca. 300µl

Weitere Arbeitsschritte auf Eis ausführen

Zu diesem Zellpellet werden 1ml kaltes FCS und 1ml freezing Medium(Mischung 80% FCS und 20 % DMSO) gegeben.

Vorsichtig mischen und jeweils 1ml der Mischung in beschriftetes steriles 1ml-NUNC-Röhrchen pipettieren (pro Proband 2 NUNC-Röhrchen).

Dann werden die Proben umgehend in den Einfrierautomaten gestellt und das Freezing Programm gestartet.

Nach Beendigung des Einfriervorganges werden die Cryovials schnellstens im 80°C Freezer gelagert.

Nach Beendigung der sterilen Arbeiten wird die Laminar Air Flow entweder mit 70% ETOH oder Antifect Liquid gereinigt, UV Licht einschalten, Frontscheibe schließen

Reagenzien

FCS Gibco BRL 500ml No. 10091-148 Lagerung -20°C
Flasche im 37°C H₂O Bad tauen, dann hitzeinaktivieren bei 56°C 30 Min.

FCS hitzeinaktiviert Gibco BRL 500ml No. 10108-165
Nach Hitzeinaktivierung wird FCS aliquotiert und bei -20°C gelagert.

PBS Gibco BRL 500 ml No. 10010-015 ab 10 Flaschen DM 16,60 pro Flasche

DMSO Sigma D 2650 100ml DM 188,50

Histopaque 1077(Ficoll) Sigma H8889 100ml ab 12 Flaschen DM 48,20
pro Flasche

6.6.7 Laborausstattungsliste Stammzentrum

- **Einrichtungsgegenstände:**

- 1 Abfallbehälter grau mit Schwenkdeckel 20 l für Restmüll
- 1 Cytostatika- Behälter schwarz für klinischen Verbrennungsmüll
- 2 Rollhocker für Untersucher
- 1 Wandschüttenregal für Blutmonovetten
- 4 blaue Regalsortierschütten
- 1 Händedesinfektionsmittelspender

- **Großgeräte:**

- 1 Kühlschrank mit Thermometer
- 1 Cryo BioSystem
- 1 Laborrechner
- 1 Monitor 17"

- **elektrische Laborgeräte:**

- 3 Zentrifugen
- 2 Blutschaukler
- 1 Mini-Shaker
- 3 Überkopfschüttler
- 1 Ultraschallvernebler der Firma Jäger mit Siebeinsatz

- **Pipetten:**

- 3 Eppendorf 500 Ser. Nr. 4700
- 2 Varipette Eppendorf Referenz 1000
- 1 Pipetman Abimed
- 1 Multipette plus
- 25 Combitip plus
- 1 Pipetmen
- 1 Eppendorf Pipettenständer

- **Zentrifugenzubehör:**

- 1 Pck Labortücher
- 1 Tube Vaseline
- 12 variable Schwenkeinsätze

- **Ständer für Blutproben**

- 6 Metallständer
- 2 Ständer für Nuncröhrchen
- 4 Acryl- Kühlschrankständer

- **Blutmonovetten:**
 - 2 Schütten 7,5 ml EDTA Monovetten **rot**
 - 1 Schütte 2,5 ml EDTA Monovetten **rot**
 - 1 Schütte 7,5 ml Serum Gel Monovette **braun**
 - 2 Schütten 9 ml Serum Monovette **weiß**
- **Pipettenspitzen:**
 - gelbe Pipettenspitzen
 - blaue Pipettenspitzen
 - Pipettenspitzen C 6000
- **Einmalreagenzien und Endlagerungsgefäße**
 - 1 Schublade mit 1,8 ml Nunc Röhrchen mit Sternfuß
 - 1 Schublade mit Nunc Stopfen und Farbcodierung gelb, blau, rot
 - 1 Schublade mit Falcon Röhrchen
 - 1 Schublade mit CryoCodeColors gelb;grün, blau
 - 4 Deep-Well Platten
- **Dokumentationsmaterial**
 - 50 KZVA Laborbeleg Basisuntersuchung A
 - 50 KZVA Laborbeleg Basisuntersuchung B
 - 20 Blatt Barcode Etiketten KZVA
 - 20 Blatt Formblatt Lagerungsplan GSF Blut
 - 20 Blatt Formblatt sowieso
 - 20 Blatt Formblatt KZVA Transport
 - 2 weiche Bleistifte
 - 5 verschieden farbige Textmarker
- **Blutversandmaterial**
 - 2 Styroporkisten 10 l
 - 2 Styroporkisten 5 l
 - 1 Kühlboxen
 - 6 Kühlaggregate
 - 100 Klarsichtbeutel mit Zugband für KZVA Transport
 - Blancobelege für Fahrdienst
- **Chemikalien und Reaktionslösungen**
 - 1 Flasche Benzin
 - 1 Flasche Wasserstoffsuperoxid
 - 1 Flasche Benzin
 - Flächendesinfektionsmittel
 - Desinfektionsmittel Korsolin ID
- **Sonstiges**
 - je 1 Pck Handschuhe Größe 6 und 7
 - Desinfektionsschale für Mehrwegbehältnisse
 - Laborkittel

6.6.8 Blutentnahmeraum im SZ

- **Einrichtung:**

- 1 Blutabnahmeliege mit Ärztekrepp
- 1 Blutabnahmestuhl mit Ärztekrepp
- 1 Abfallbehälter mit Schwenkdeckel 10 l blau
- 1 Rollcontainer für Material
- 1 Rollhocker für Untersucher
- 1 Wandschüttenhalterung für Blutentnahmematerial
- 1 Waschbecken
- 1 Seifenspender
- 1 Einweghandtuchspender
- 1 Desinfektionsmittelspender

- **Bestückung des Rollcontainers:**

- 1 Pck Handschuhe Größe 6
- 1 Pck Handschuhe Größe 7
- 1 Staubbinde
- 1 Dibromolspray
- 1 befüllten Pur-Zellin-Hygienespender
- 1 Fach Butterfly 19 G
- 1 Fach Butterfly 21 G
- 1 Fach Adapter
- 1 Rolle Leukosilk 1 cm
- 1 Rolle Leukosilk 2 cm
- 1 Stapel Zellstoff
- 3 Einmalbrechschalen

6.6.9 Ausstattung für Blutprobenverarbeitungsplatz im Außenzentrum

1 Kühlschrank mit Thermometer und mindestens 4 gekühlten Akkus
Kühlbox
Laborlisten
mehrere Ständer für Monovetten jeglicher Größe
1 Pipettenständer
1 Zentrifuge
1 Blutschaukler
1 Abfallbehälter Restmüll
1 Abfallbehälter Verbrennungsmüll (KZVA schwarz)
1 Varipette Eppendorf Referenz 1000
1 Pipetman Abimed
1 Eppendorf 4700
Pipettenspitzen
eventuell Verlängerungsschnur oder Kabeltrommel
Handschuhe
weiße Kittel

6.6.10 Ausstattung für Blutabnahmeplatz im Außenzentrum

500 Sarstedt Monovetten Serum weiß 9ml
500 Sarstedt Monovetten Serumgel braun 7,5 ml
500 Sarstedt Monovetten EDTA rot 7,5 ml
500 Sarstedt Monovetten EDTA rot 2,5 ml
50 Butterfly 19 G
50 Butterfly 21 G
50 Adapter
1 Staubbinde
Leukosilk in 2 Breiten, je 1 Rolle
1 Purcellin Box mit Tupfern
Handschuhe verschiedener Größe
1 Dibromolspray
1 Kanülenschlucker
Einmalnierenschalen
Zellstoff
Injektionspflaster
Kleine Kompresse
Ärztekrepp
Händedesinfektion
Flächendesinfektion
1 Abwurfbehälter für Restmüll mit Mülltüten
1 Kanülenschlucker
Handtuch und Seife für Probanden