



# Rapport

## Nationella riktlinjer för preanalytisk hantering av vätskebaserade prov för forskning

**Dokumentregistrerings-ID:** Y2-BIS2020-R

**Framtagen av:** Gunnel Tybring, docent, Karolinska Institutet

**Version:** 2020-02-20



## Innehåll

<b>1. Sammanfattning</b> .....	2
<b>2. Inledning</b> .....	2
<b>3. Samverkan mellan biobank och forskare</b> .....	3
<b>4. Preanalytiska faktorer som påverkar provkvalitet</b> .....	4
<b>5. Provtagning och val av provtagningsrör</b> .....	4
<b>6. Hantering av blodprov för separation av plasma och serum</b> .....	6
<b>7. Hantering av blodprov för separation av citrat-plasma</b> .....	7
<b>8. Hantering av Urinprov</b> .....	7
<b>9. Hantering av blodprov för DNA extraktion</b> .....	7
<b>10. Hantering av blodprov för separation av buffy coat</b> .....	8
<b>12. Hantering av blodprov för fritt cirkulerande tumör-DNA (ccf-DNA)</b> .....	9
<b>13. Hantering av blodprov för RNA extraktion</b> .....	10
<b>14. Hantering av blodprov för kryopreservering av perifera mononukleära celler, PBMC</b> .....	10
<b>15. Alikvotering och förvaring</b> .....	11
<b>16. Transport</b> .....	12
<b>17. Omformatering av prov</b> .....	12
<b>18. Dokumentation</b> .....	13
<b>19. Referenser</b> .....	14

## 1. Sammanfattning

Dessa nationella riktlinjer riktar sig till professionen inom biobankers och inom laboratorieservice vars uppdrag är att stödja forskning som omfattar insamling och hantering av vätskebaserade prov i etikprövad forskning. Syftet är att skapa nationellt samordnade riktlinjer för den preanalytiska hanteringen av vätskebaserade prov för forskning oberoende av i vilken verksamhet eller organisation provtagning och provhantering bedrivs.

Hög provkvalitet är en förutsättning för framgångsrik och reproducerbar forskning. Men provkvalitet är en komplex fråga och möjligheten att analysera biomarkörer som ett mått på ”provkvalitet” är i dagsläget begränsad till ett fåtal markörer och dessa är inte praktiskt applicerbara på insamlade prov. Däremot finns stor kunskap om hur olika preanalytiska variabler påverkar provkvaliteten.

Logistiken för hur och var provtagning ska genomföras och hur prov ska hanteras i olika forskningsstudier varierar och styrs i hög utsträckning av den vetenskapliga frågeställningen. Detta innebär att forskare som medverkar i nationella eller internationella samarbeten har att förhålla sig till beslutade protokoll medan andra studier kan anpassa logistiken efter den service som erbjuds lokalt eller regionalt.

För vissa analyser är tiden från provtagning till frys en kritisk kvalitetsindikator. I andra fall är det viktigare att provinsamlingen och den preanalytiska hanteringen är standardiserad. För analys av vissa känsliga biomarkörer inom metabolomik och proteomik är rekommendationen att plasma och/eller serum separeras från röda blodkroppar genom centrifugering inom 3 timmar. Men det utesluter inte att prov som hanterats under längre tid kan användas i framgångsrik forskning. Med studiespecifika instruktioner och ett bra IT-stöd som medger spårbarhet från provtagning till frys kan prov selekteras för olika analyser.

Rekommendationerna i dessa nationella riktlinjer baseras på rapporter från olika aktörer inom biobankning (ISBER, BBMRI-ERIC, SPIDIA), ISO standarder och publicerade vetenskapliga artiklar samt den erfarenhet som finns på biobankers i Sverige som erbjuder en operativ service för provhantering.

## 2. Inledning

Prov som insamlas för medicinsk forskning har, till skillnad från prov för ändamålen vård och behandling, som regel ingen validerad instruktion (Standard Operation Procedure, SOP) som på ett detaljerat sätt beskriver hur prov ska hanteras från provtagning till frys. En förklaring till detta är att analyserna i ett forskningsprojekt inte alltid specificerats i detalj vid planeringen och att utvecklingen av nya analysmetoder går mycket snabbt. Vidare kan insamling pågå under lång tidsperiod och dessutom på olika platser i landet med olika förutsättningar för att erbjuda efterfrågad service.

Forskningsprojektet kan omfatta olika typer av analyser såsom kvantifiering av kända biomarkörer (target analysis) eller att identifiera och kartlägga biomarkörer genom screening med masspektrometri eller nmr (non target analysis) eller molekylära OMIC profiler (metabolomik, proteomik, genetik, transskriptomik, mm). Vidare bedrivs forskning i ökad utsträckning mot systembiologiska studier (multi-OMIC profiler) vilket ställer extra höga krav på standardiserade och dokumenterade processer (Sciacovelli et al. 2017, Lippi et al. 2019, Lee and Kim 2017).

Faktorer som påverkar provkvalitet är dock komplexa och kan inte alltid definieras utifrån en specifik analys. Bra provkvalitet, dvs att den molekylära integriteten är så opåverkad som möjligt är en förutsättning för pålitliga och reproducerbara analysdata. I rapporten ”*Preanalytical Challenges – Time for solutions*” (Lippi et al. 2019) betonas vikten av att ha så detaljerad information som möjligt om alla steg från provtagning till analys.

### 3. Samverkan mellan biobank och forskare

En viktig roll för biobanker är att samverka med forskare och professionen på olika analysplattformar och sprida kunskap om hur preanalytiska faktorer påverkar provkvalitet och därmed analysdata.

Varje forskningsstudie som omfattar provtagning och biobankning av vätskebaserade prov bör inkludera dokumentation om provets handhavande från provtagning till infrysning i forskningsplanen. Ett kvalitetskrav är också att upprätta studiespecifika instruktioner för hur prov ska hanteras på biobanken.

Några väsentliga frågeställningar att beakta i diskussion med forskare när studier som inkluderar vätskebaserade prov ska hanteras på ett laboratorium alternativt på en biobank:

- Hur ska provtagningen genomföras?
  - val av nål, ordningsföljd på provtagningsrören i de fall man har flera olika provtyper mm.
- Vilka provtyper ska inkluderas?
  - att använda samma typ av provtagningsrör och förvaringsrör är önskvärt men är i Sverige inte alltid möjligt pga. av upphandlingar i vården och lokala biobanksrutiner.
- Hur säkerställs att den preanalytiska hanteringen från provtagning till infrysning uppfyller kvalitetskraven på planerade analyser?
  - att dokumentera variabler som påverkar provets integritet skapar de förutsättningar som krävs för att kunna selektera prov också för framtida analyser.
- På vilket sjukhus/vårdinrättning sker provtagningen?
  - olika provtagningsplatser är en faktor som kan påverka provkvalitet.
- Ska analyser genomföras inom rutinsjukvården/klinisk kemi?

- detta bör i så fall alltid diskuteras direkt med aktuellt laboratorium eftersom möjligheten att ta emot andra rör än det för analysen avsett provtagningsrör kan vara begränsad.

#### 4. Preanalytiska faktorer som påverkar provkvalitet

Stabiliteten av olika biomarkörer varierar stort, allt ifrån <1 timme för särskilt känsliga aminosyror till 24 timmar för stabilare metaboliter, proteiner och flera dagar för tex antikroppar. Det är väl studerat att tiden från provtagning tills det att plasma och serum separeras från röda blodkroppar genom centrifugering påverkar provkvalitet. Dessa förändringar sker genom de processer som pågår i ett blodprov efter provtagningen och som kan leda till ökade nivåer av biomarkörer genom läckage från blodceller eller degradering av instabila biomarkörer. Kall hantering dämpar dessa effekter (Cao et al. 2019, Kamlage et al. 2018, Shen et al. 2018, Malm et al. 2016, Kamlage et al. 2014, Daniels et al. 2019).

Den publicerade ISO standarden för metabolomik definierar inte i detalj inom vilken tid alikvoterat serum och/eller plasma bör vara infryst (CEN/TS 16945:2016; *Molecular in vitro diagnostic examinations-Specifications for pre-examination processes for metabolomics in urine, venous blood, serum and plasma*). Denna ISO standard betonar liksom flera vetenskapliga biobanksrelaterade publikationer vikten av standardisering, dokumentation och spårbarhet av den preanalytiska processen.

Om det vetenskapliga syftet är att analysera profiler av metaboliter och/eller proteiner är rekommendationen att centrifugera blodprov och separera plasma och/eller serum inom 3 timmar från provtagning (Kamlage et al. 2014, Shen et al. 2018).

Viktiga faktorer som kan påverka provkvalitet:

- Hemolys vilket oftast uppstår i samband med provtagning
- Tid och temperatur från provtagning tills det att plasma/serum separeras från blodceller genom centrifugering
- Centrifugering; g-tal och tid
- Alikvotering vilket omfattar alikvoteringsvolym och format på förvaringsrör
- Förvaringstemperatur och förvaringstid

#### 5. Provtagning och val av provtagningsrör

Provtagning för ändamålet forskning genomförs vanligen inom vårdens infrastruktur. Regionalt upphandlade provtagningsrör inom vården bör i största möjliga utsträckning användas också inom forskning. I de fall en forskningsstudie omfattar nationell provinsamling eller ingår i en internationell studie bör kravet på samma provtagningsrör tillgodoses för att skapa bästa möjliga standardisering.

Val av provtyp styrs av planerade analyser och analysmetod. Det finns ett flertal rapporter som rekommenderar plasma före serum både för metabolomik och proteomik. Detta kan delvis förklaras av att hanteringen av plasma är enklare att standardisera jämfört med serum. På vissa sjukhus i landet har nu serum fasats ut som provtyp och ersatts av plasma.

Riktlinjer för venös provtagning är publicerade på

<https://www.varldshandboken.se/undersokning-och-provtagnings/blodprov/blodprov-venos-provtagnings/>.

I de fall provtagning omfattar olika provtagningsrör, varav vissa för ändamålet vård och behandling och andra för det specifika forskningsprojektet, är det viktigt att beakta i vilken ordningsföljd prov ska tas.

Riktlinjer:

- Citratrör ska alltid tas som första rör
- PAXgene och Tempusrör ska alltid tas som sista rör och med en butterfly nål.

Att använda gelrör ger en direkt barriär mellan koagel och serum och mellan röda blodkroppar och plasma som bidrar till ökad stabilitet. Gelrör som centrifugeras i samband med provtagning rekommenderas i de fall transporttiderna överstiger 3 timmar. (För vissa typer av screeninganalyser finns en liten risk för interferens från kemikalier i gelen).

I tabell 1 nedan redovisas de vanligaste och rekommenderade provtagningsrören för respektive planerad analys.

Planerad analys	Provtagningsrör	Provtyp
<b>Genetik</b>	K2-EDTA Saliv: kommersiella provtagningskit	EDTA helblod Saliv
<b>Metabolomik</b>	K2-EDTA K2-EDTA med gel Serum med koagulationsaktivator Serum med koagulationsaktivator och gel Urin	EDTA-plasma EDTA-plasma Serum Serum Urin
<b>Proteomik</b>	K2-EDTA K2-EDTA med gel Urin	EDTA-plasma EDTA-plasma Urin
<b>Koagulationsfaktorer</b>	Na-Citrat	Citratplasma
<b>Gentranskription</b>	Kommersiella provtagningsrör innehållande RNase hämmare	Blod för RNA extraktion
<b>Viabla celler för funktionell analys Singel cell analys</b>	K2-EDTA Na-Heparin Na-Citrat Kommersiella provtagningsrör för separation av celler	Blod för cellseparation

<b>Fritt cirkulerande tumörceller ccf-DNA ccf-RNA (liquid biopsies)</b>	Kommersiella provtagningsrör innehållande stabiliserande reagens	Plasma-ccf
<b>Mikrobiota</b>	Kommersiella provtagningskit för saliv och faeces	Saliv Faeces
<b>Övriga analyser</b>	Li-Heparin Li-Heparin med gel Cerebrospinalvätska	Heparin-plasma Heparin-plasma CSF

## 6. Hantering av blodprov för separation av plasma och serum

Plasma och serum som i många fall används för analys av proteiner, metaboliter, lipider mm ska betraktas som två olika provtyper eftersom de kan ha olika påverkan på analysresultatet (Gonzales-Covarrubias et al., *Metabolomics* 2013;9:337–48).

Rumstemperatur (RT) definieras som 18–25 °C och kyla 4–6 °C. Vid centrifugering i RT ska temperaturen på centrifugen vara inställd på 22 °C om inget annat anges.

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Provtagningsrör: K2-EDTA (med/utan gel)  
Li-Heparin (med/utan gel)  
Serum med/utan koagulationsaktivator (med/utan gel)
- b) Provtagningsrör för serum med koagulationsaktivator ska koagulera minst 30 min i RT efter provtagning. Motsvarande tid för provtagningsrör utan koagulationsaktivator är minst 60 min.
- c) Centrifugering inom 3 timmar vid 2000 g, 10 minuter.
  - Lokala variationer förekommer men mindre avvikelser från rekommenderat g-tal och tid för centrifugering har sannolikt ingen effekt på provkvaliteten. En kortare tid kan kompenseras med ett högre g-tal och omvänt för ett lägre g-tal.
- d) Om tiden för transport till laboratoriet eller till biobanken överstiger möjligheten att centrifugera inom 3 timmar rekommenderas något av följande alternativ:
  - Centrifugera prov i samband med provtagning enligt punkt c ovan varefter serum och/eller plasma överförs till ett sekundärrör som skickas kylt eller fruset till aktuellt laboratorium alternativt biobank.
  - Använd provtagningsrör med gel för plasma och serum som centrifugeras enligt punkt b (se ovan) innan transport till aktuellt laboratorium alternativt biobank för alikvotering.

## 7. Hantering av blodprov för separation av citrat-plasma

Citrat-plasma används främst för analys av koagulationsfaktorer och dessa provtagningsrör innehåller citrat som ska stabilisera pH i provet. Det är viktigt att provtagningsröret fylls med blod för att få rätt koncentration av citrat i blodprovet.

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Provtagningsrör: Na-Citrat (9 ml)
- b) Centrifugering för separation av citrat-plasma ska ske inom 60 min efter provtagning vid 2500 g, 20 minuter.
- c) Citrat-plasma ska frysas inom 4 timmar från provtagning. Viktigt att tänka på innan överföring av citrat-plasma till nytt rör är att ca 0,5 ml plasma (ca 7 mm plasmapelare) ska vara kvar i provtagningsröret för att minimera risken att få med trombocyter i plasmaprovet.

### Observera:

- Provtagningsröret ska inte kylas innan centrifugering
- Citratrör tillverkade av glas kan enligt tillverkaren centrifugeras vid 2500 g
- Rekommenderade riktlinjer för citrat-plasma kan avvika från lokala riktlinjer som avser prov för vård och behandling.

## 8. Hantering av Urinprov

Tiden för urininsamling kan variera från ett enskilt prov till ett bestämt tidsintervall.

Rekommenderade riktlinjer:

- Provtagning i plastmugg alternativt plastflaska avsedd för urinprov
- Överför utan dröjsmål del av volymen till ett avhållningsrör
- Centrifugera vid 2000 g, 5 minuter (eller 10 min för att följa samma rutiner som för blodprov) innan alikvotering.

Observera att urinprov ska i största möjliga utsträckning förvaras i kyla efter avslutad insamling för att förhindra bakterietillväxt.

## 9. Hantering av blodprov för DNA extraktion

EDTA helblod används uteslutande för genetiska analyser. Ett uppskattat DNA utbyte från en frisk individ är 25 µg/ml blod. Dagens analysteknologier för sekvensering och genotypning kräver en relativt liten mängd DNA. Extraktionsmetoderna utgår därför från relativt små blodvolym, 200–400 µl EDTA helblod. Med nya och effektivare analysmetoder är det numera möjligt att genomföra en helgenomisk sekvensering på <1 µg DNA.



En förfinad metod för att analysera DNA på strukturnivå, long read sequencing, är under utveckling. Denna metod har dock helt andra kvalitativa krav på DNA vilket kräver en annan teknik för DNA extraktion.

Att alikvotera helblod i lämpliga volymer som sedan förvaras vid -70 °C eller lägre säkerställer att prov finns för upprepad DNA extraktion.

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Provtagningsrör: K2-EDTA (4 ml)
- b) Provtagningsröret kan skickas med post i RT

Tabell 3 visar hur tid och temperatur påverkar DNA integritet i ett blodprov innan extraktion.

Tid	Temperatur	Påverkan på DNA integritet
<24 timmar	RT	Låg; högmolekylärt DNA;> 50 kb
<3 dagar	Kylförvaring <8 °C	Låg; högmolekylärt DNA;> 50 kb
<3 dagar	RT	Viss påverkan; DNA fungerar för analyser som ej kräver högmolekylärt DNA
3–7 dagar	<8 °C	Risk att DNA börjar fragmentera men fungerar i de analyser som inte kräver högmolekylärt DNA
3–7 dagar	RT	Påvisbar fragmentering men DNA fungerar bra för genotypning och target sekvensering

- c) I de fall det är aktuellt att alikvotera helblod innan infrysning för senare DNA extraktion, är det viktigt att säkerställa att provet är homogent blandat för att förhindra sedimentering av leukocyter.
- d) Blod för DNA extraktion kan förvaras vid -70 °C eller lägre med bibehållen DNA integritet (Bulla et al. 2016). Utbytet kan bli lägre i ett blodprov som tinas innan extraktion men funktionaliteten är opåverkad. Temporär förvaring vid -20 °C är möjligt under begränsad tid max 3 månader. Risk finns att DNA integritet påverkas om blodprov tinas vid upprepade tillfällen.

## 10. Hantering av blodprov för separation av buffy coat

Buffy coat är en koncentrerad fraktion leukocyter i EDTA blod som främst används till DNA extraktion. Fördelen är att man kan alikvotera både plasma och buffy coat ifrån ett och samma provtagningsrör. Nackdelen är att buffy coat innehåller ett stort antal leukocyter i en liten volym. Detta innebär att buffy coat fraktionen måste spädas så att volym och antalet leukocyter anpassas efter det protokoll som används för DNA extraktion. Att separera buffy coat kräver stor vana och ett strukturerat arbetssätt.

Det finns ingen rapporterad skillnad i kvalitet eller funktionalitet på DNA som extraheras från buffy coat jämfört med EDTA helblod

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Provtagningsrör: K2-EDTA (10 ml)
- b) Centrifugering vid högst 1500 g, under 15 minuter inom 2 timmar. Leukocytfractionen syns då som ett tunt skikt mellan plasma och röda blodkroppar.
- c) Överför plasmafasen till ett eller flera alikvoteringsrör.
- d) Pipettera därefter med stor försiktighet ca 1,5–1,7 ml av leukocytfractionen till ett eller flera förvaringsrör. Det är oundvikligt att få med lite plasma och lite röda blodkroppar.

### **11. Hantering av saliv för genetiska analyser**

DNA från saliv fungerar i de flesta PCR- och sekvenseringsanalyser med undantag för metyleringsanalyser. Kommersiella kit för insamling av saliv för DNA extraktion innehåller en preserverande vätska som gör att provet kan förvaras i RT minst 5 år utan att DNA integriteten påverkas. För detaljerad information hänvisas till produktinformationen från respektive leverantör.

Provet kan skickas med post i RT.

### **12. Hantering av blodprov för fritt cirkulerande tumör-DNA (ccf-DNA)**

Extra-cellulärt DNA från tumör (circulating cell-free DNA) i blod påverkas snabbt efter provtagning genom degradering och läckage från nukleinsyrenehållande celler. Eftersom andelen fritt cirkulerande DNA från tumörceller är avsevärt lägre i förhållande till DNA i leukocyter ställs höga krav på att tiden mellan provtagning och centrifugering är kort och hanteringen är standardiserad (*Isolated circulating cell free DNA from plasma; SIS-CEN/TS 16835–3:2015*). Denna standard, avsedd för ackreditering av diagnostiska analyser, betonar vikten av dubbel centrifugering varav den andra vid ett mycket högt g-tal, 16 000 g. Även om dubbel centrifugering är en standard finns rapporter som beskriver att en centrifugering räcker (Trigg et al. 2018, Alidousty et al. 2017). Protokollet för hantering av ccf-DNA styrs i hög grad av planerade analyser.

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Använd kommersiella provtagningsrör innehållande en preserverande vätska som förhindrar nukleinsyrenehållande celler att lysa.
- b) Provet kan skickas med post och förvaras i RT upp till 30 dagar utan att integriteten av tumör DNA påverkas.

För den fortsatta hanteringen hänvisas till produktinformation från respektive leverantör.

### 13. Hantering av blodprov för RNA extraktion

Analys av genuttryck, (RNA, m-RNA mikro-RNA), i blod kräver provtagningsrör innehållande RNase hämmare vilket lyserar celler och stabiliserar RNA i blod. Två rörtyper dominerar marknaden, PAXgene och Tempus, men alternativa leverantörer finns. Eftersom flera studier har rapporterat skillnader i RNA profiler i dessa rör är det viktigt att man inom en och samma studie använder samma provtagningsrör och att extraktion sker med samma protokoll (Häntzsch et al. 2014, Stellino et al. 2019).

Rekommenderade riktlinjer för PAXgene:

- a) Låt provet stå i RT minst 2 timmar (detta moment kan också ske i samband med att provet tinas innan RNA extraktion).
- b) Provet kan förvaras i RT upptill 3 dygn eller i kyla upp till 5 dygn innan infrysning.
- c) Infrysning vid -20 °C minst 24 timmar (detta för att förhindra sprickbildning i röret innan provet placeras i -70 °C).

Rekommenderade riktlinjer för Tempusrör:

- a) Tempusrör kan förvaras i RT upp till 5 dygn eller i kyla upptill 7 dygn innan infrysning vid -70 °C.

Båda dessa rör kan skickas med post i RT.

Data från flera studier visar att båda dessa rör kan förvaras vid -70 °C minst 7 år utan försämrade RNA kvalitet (Tang et al. 2019, Häntzsch et al. 2014).

Även om båda tillverkarna anger att rören kan långtidsförvaras vid -20 °C utan att påverka RNA integritet rekommenderas den lägre temperaturen eftersom säkerheten med dessa frysar är högre.

För övrig hantering av dessa prov hänvisas till produktinformation från leverantören.

### 14. Hantering av blodprov för kryopreservering av perifera mononukleära celler, PBMC

Viabla mononukleära celler används fr.a. för att studera immunorespons vid behandling med olika läkemedel och vacciner.

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Provtagningsrör: K2-EDTA, Na-Heparin eller i Na-citrat (9/10ml)

- Val av provtagningsrör och protokoll för separation och kryopreservering av viabla celler som ficoll, lymphoprep eller i specifika rör utformade för cell-preparation styrs av planerade analyser.
- b) Prov kan skickas med post i RT under förutsättning att prov levereras inom 24 timmar. Därefter minskar antalet viabla celler snabbt men funktionaliteten på dessa celler kan vara acceptabel upp till 36 timmar.

Kryopreservering av viabla celler är en relativt känslig och omfattande process. Viktigt att man använder samma typ provtagningsrör och följer ett standardiserat protokoll för att ta fram dessa celler. Infrysning av viabla celler sker stegvis enligt protokoll för kryopreservering och förvaras i lågtemperaturfrysar (-150 °C) eller i kärl innehållande kväve i gas- eller vätskefas (-190 °C).

## 15. Alikvotering och förvaring

Alikvotering kan vara automatiserad eller manuell beroende på lokala förutsättningar. Analysplattformar för storskaliga OMIC-analyser kräver relativt små volymer (20–200 µl) medan analyser som genomförs inom klinisk diagnostik i vissa fall kräver större volymer och att prov levereras i ett format som passar befintlig automation. För vissa analyser kan det därför bli nödvändigt att poola flera alikvoter för att få tillräcklig volym och rätt rörformat.

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Serum, plasma och urin bör alikvoter i multipla alikvoter för att undvika upprepade tina/frys cykler.
- b) Automatiserad alikvotering sker lämpligen i relativt små volymer, från 200–500 µl, i SBS format (96, 48, eller 24-rör/platta) eller i separata kryorör. Alikvoterna ska ha individuellt unika koder som länkar till provtagningsröret.
- c) Manuell alikvotering kan ske i samma format som för automatiserad hantering men då med färre antal fraktioner och i vissa fall i större volymer, från 500–1000 µl (gäller också för ”Uppsala-plankan”). Detta eftersom manuell alikvotering med små volymer i 96-format innebär en risk för kontamination och kräver stor noggrannhet och struktur under utförandet.
- d) Förvaringsrören och förslutning av dessa rör ska vara anpassade för långtidsförvaring i -70 °C eller lägre. De flesta leverantörer rekommenderar förvaringsrör tillverkade av polypropylen. Risken för absorption av proteiner och peptider vid långtidsförvaring i polypropylenrör anses försumbar (Kofanova, Mommaerts and Betsou 2015).
- e) Förvaringsrören ska vara volymsanpassade för att minimera effekterna av avdunstning under långtidsförvaring. Viktigt att inte helt fylla röret eftersom vätska utvidgas vid infrysning.
- f) Alikvoter ska förvaras i -70 °C eller lägre. Under dessa betingelser är de flesta biomarkörer stabila. Men lagringstiden ska alltid beaktas som en faktor när prov ska användas (Enroth et al. 2016, Grankvist et al. 2019, Wagner-Golbs et al. 2019).

Temporär förvaring vid -20°C kan accepteras under en begränsad tid, max 2 månader.

## 16. Transport

Transport av prov till laboratoriet alternativt till biobanken kan ske på olika sätt, via interna system, budbilar eller postas som brev i kuvert avsedda för medicinska prov. Att skicka prov med post i RT innebär kvalitetsrisker med undantag av prov för antikroppserologi, DNA extraktion, kryopreservering av PBMC samt för kommersiella provtagningsrör/kit för saliv, RNA, faeces och fritt cirkulerande tumör-DNA (se tabell 1).

Rekommenderade riktlinjer:

- a) Undvik att skicka prov via interna rör-post system eftersom detta transportsätt inte kan standardiseras.
- b) Om tiden för transport till laboratoriet/biobanken överstiger 3 timmar från provtagning till centrifugering bör man eftersträva kall transport (se punkt 4.c)
- c) Packa och transportera prov på sätt som minimerar årstidsskillnader i temperatur.

Prov som skickas med post ska packas enligt folkhälsomyndighetens föreskrifter. Se <https://www.folkhalsomyndigheten.se/globalassets/laboratorieanalys/information-for-bestallare/packa-provet-ratt.pdf>

Vätskebaserade prov tagna från människor hos vilka det är minimal sannolikhet att smittämnen förekommer omfattas inte av samma bestämmelser som för smittförande substanser.

För transport av frysta prov, som bör skickas i kolsyreis, hänvisas till logistiska distributionsföretag (World Courier, DHL m.fl.).

## 17. Omformatering av prov

I största möjliga utsträckning ska upprepade tina/frysa cykler undvikas eftersom det innebär en risk för negativ påverkan på provkvalitet. I de fall frysta prov ska randomiseras innan analys, tex i en fall-kontroll studie eller att prov är nationellt distribuerade i olika format, kan det bli nödvändigt att tina prov som sedan överförs till ett nytt format. Omformatering ska genomföras med strikt standardiserade processer för hur prov tinas för att få minsta möjliga batchvariation i tid och temperatur. Omformatering och randomisering bör därför inte genomföras på olika biobanker.

## 18. Dokumentation

En förutsättning för att bedöma provets värde och användbarhet är att det lagrade provet kan kopplas till relevant information om provgivaren och provets historik. Att kunna selektera prov baserat på vissa kvalitetsindikatorer leder till förbättrade möjligheter att selektera prov såväl i det aktuella projektet som för framtida forskning.

Beroende på lokala förutsättningar och tillgång till LIS/LIMS system är det inte i dagsläget möjligt att få all önskvärd information på provnivå. För vissa variabler är det viktigt att ha information på provnivå medan andra variabler kan vara på provsamlingsnivå. En minsta acceptabel nivå är att ha tillgång till information om exakt provtyp och inom vilket tidsintervall prov är alikvoterade och infrysta.

Tabell 4: Preanalytiska variabler som bör dokumenteras.

<i>Provtagning*</i>	datum, tidpunkt, Prov-ID
<i>Prov typ Primärrör*</i>	se tabell 1
<i>Transport</i>	temperatur
<i>Ankomstregistrering*</i>	datum, tidpunkt
<i>Centrifugering</i>	datum, tidpunkt, g-tal, tid, temperatur
<i>Hemolys</i>	
<i>Alikvotering*</i>	datum, tidpunkt, alikvot-ID, volym
<i>Infrysning</i>	datum, tidpunkt, temperatur
<i>Prov typ*</i>	EDTA blod EDTA-plasma EDTA-plasma gel EDTA-plasma dubbel-centrifugerad Heparin-plasma Heparin-plasma gel Citrat-plasma Serum Serum gel buffy coat PAXrör Tempusrör celler viabla urin CSF
<i>Upprepad tining*</i>	Antal gånger

\*rekommenderad information på provnivå

## 19. Referenser

- Alidousty, C., D. Brandes, C. Heydt, S. Wagener, M. Wittersheim, S. C. Schäfer, B. Holz, S. Merkelbach-Bruse, R. Büttner, J. Fassunke & A. M. Schultheis (2017) Comparison of Blood Collection Tubes from Three Different Manufacturers for the Collection of Cell-Free DNA for Liquid Biopsy Mutation Testing. *The journal of molecular diagnostics : JMD.*, 19, 801-804.
- Bulla, A., B. De Witt, W. Ammerlaan, F. Betsou & P. Lescuyer (2016) Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. *Biopreservation and biobanking.*, 14, 29-38.
- Cao, Z., B. Kamlage, A. Wagner-Golbs, M. Maisha, J. Sun, L. K. Schnackenberg, L. Pence, T. C. Schmitt, J. R. Daniels, S. Rogstad, R. D. Beger & L.-R. Yu (2019) An Integrated Analysis of Metabolites, Peptides, and Inflammation Biomarkers for Assessment of Preanalytical Variability of Human Plasma. *Journal of proteome research.*, 18, 2411-2421.
- Daniels, J. R., Z. Cao, M. Maisha, L. K. Schnackenberg, J. Sun, L. Pence, T. C. Schmitt, B. Kamlage, S. Rogstad, R. D. Beger & L.-R. Yu (2019) Stability of the Human Plasma Proteome to Pre-analytical Variability as Assessed by an Aptamer-Based Approach. *Journal of proteome research.*
- Enroth, S., G. Hallmans, K. Grankvist & U. Gyllensten (2016) Effects of Long-Term Storage Time and Original Sampling Month on Biobank Plasma Protein Concentrations. *EBioMedicine.*, 12, 309-314.
- Grankvist, K., R. Gomez, M. Nybo, G. Lima-Oliveira & A. von Meyer (2019) Preanalytical aspects on short- and long-term storage of serum and plasma. *Diagnosis.*, 6, 51-56.
- Hamot, G., W. Ammerlaan, C. Mathay, O. Kofanova & F. Betsou (2015) Method validation for automated isolation of viable peripheral blood mononuclear cells. *Biopreservation and biobanking.*, 13, 152-163.
- Häntzsch, M., A. Tolios, F. Beutner, D. Nagel, J. Thiery, D. Teupser & L. M. Holdt (2014) Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and MiRNA profiles. *PLoS one.*, 9, e113298.
- Kamlage, B., S. G. Maldonado, B. Bethan, E. Peter, O. Schmitz, V. Liebenberg & P. Schatz (2014) Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clinical chemistry.*, 60, 399-412.
- Kamlage, B., S. Neuber, B. Bethan, S. González Maldonado, A. Wagner-Golbs, E. Peter, O. Schmitz & P. Schatz (2018) Impact of Prolonged Blood Incubation and Extended Serum Storage at Room Temperature on the Human Serum Metabolome. *Metabolites.*, 8.
- Kofanova, O. A., K. Mommaerts & F. Betsou (2015) Tube Polypropylene: A Neglected Critical Parameter for Protein Adsorption During Biospecimen Storage. *Biopreservation and biobanking.*, 13, 296-298.

- 
- Lee, J.-E. & Y.-Y. Kim (2017) Impact of Preanalytical Variations in Blood-Derived Biospecimens on Omics Studies: Toward Precision Biobanking? *Omics : a journal of integrative biology.*, 21, 499-508.
- Lippi, G., F. Betsou, J. Cadamuro, M. Cornes, M. Fleischhacker, P. Fruekilde, M. Neumaier, M. Nybo, A. Padoan, M. Plebani, L. Sciacovelli, P. Vermeersch, A. von Meyer & A.-M. Simundic (2019) Preanalytical challenges - time for solutions. *Clinical chemistry and laboratory medicine.*, 57, 974-981.
- Malm, L., G. Tybring, T. Moritz, B. Landin & J. Galli (2016) Metabolomic Quality Assessment of EDTA Plasma and Serum Samples. *Biopreservation and biobanking.*, 14, 416-423.
- Sciacovelli, L., M. Panteghini, G. Lippi, Z. Sumarac, J. Cadamuro, C. A. D. O. Galoro, I. G. D. Pino Castro, W. Shcolnik & M. Plebani (2017) Defining a roadmap for harmonizing quality indicators in Laboratory Medicine: a consensus statement on behalf of the IFCC Working Group "Laboratory Error and Patient Safety" and EFLM Task and Finish Group "Performance specifications for the extra-analytical phases". *Clinical chemistry and laboratory medicine.*, 55, 1478-1488.
- Shen, Q., J. Björkstén, J. Galli, D. Ekman, J. Broberg, N. Nordberg, A. Tillander, M. Kamali-Moghaddam, G. Tybring & U. Landegren (2018) Strong impact on plasma protein profiles by precentrifugation delay but not by repeated freeze-thaw cycles, as analyzed using multiplex proximity extension assays. *Clinical chemistry and laboratory medicine.*, 56, 582-594.
- Stellino, C., G. Hamot, C. Bellora, J. Trouet & F. Betsou (2019) Preanalytical robustness of blood collection tubes with RNA stabilizers. *Clinical chemistry and laboratory medicine.*
- Tang, R., Q. She, Y. Lu, R. Yin, P. Zhu, L. Zhu, M. Zhou & C. Zheng (2019) Quality Control of RNA Extracted from PAXgene Blood RNA Tubes After Different Storage Periods. *Biopreservation and biobanking.*
- Trigg, R. M., L. J. Martinson, S. Parpart-Li & J. A. Shaw (2018) Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. *Heliyon*, 4, e00699.
- Wagner-Golbs, A., S. Neuber, B. Kamlage, N. Christiansen, B. Bethan, U. Rennefahrt, P. Schatz & L. Lind (2019) Effects of Long-Term Storage at -80 °C on the Human Plasma Metabolome. *Metabolites.*, 9.