

Anlage 11 Kurzanleitung zur Asservierung von Tumorgewebe und Liquor

Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
- Molekularbiologische Marker bei embryonalen Tumoren -

Wichtig: Immer mit sterilen Handschuhen arbeiten, steriles Skalpell, anatomische Pinzette etc. verwenden (zum Schutz vor RNAsen und zur Erhaltung der Sterilität)!

Vorgehensweise:

Die Aufteilung des Tumorgewebes hängt von der Größe der Biopsie ab und soll vom **Pathologen/Neuropathologen** vorgenommen werden. Abhängig von der Biopsiegröße einen Teil für die histologische Diagnostik asservieren und restliche Tumorteile tiefrieren oder als Tumorfischmaterial versenden. Bei kleinen Biopsien entscheidet der Pathologen/Neuropathologe, wie viel Gewebe eingefroren oder als Frischmaterial versendet werden kann.

Wenn möglich, sollten zwei repräsentative Proben **A** und **B** entnommen werden.

Von **A** sollte ein Fragment **A1** entnommen werden:

Rest von A und B: in flüssigem Stickstoff einfrieren.

A1: 10 Tupfpräparate für FISH herstellen und dann den Rest von **A1** in 4%iges Formalin für die Bestimmung des Tumoranteiles geben. Tupfpräparate beschriften und lufttrocknen.

Falls bei einem größeren Operationspräparat der Pathologe nicht das gesamte restliche Tumorgewebe zur Diagnostik braucht, übrig gebliebenes Tumorgewebe steril klein schneiden, in sterile Becher/Röhrchen einfrieren und versenden. Darüber hinaus, wenn ausreichend Material verfügbar, nach vorheriger Anmeldung Tumorfischmaterial in Kulturmedium (Neurokulturmedium) asservieren und an ausgewiesene Forschungsgruppen (Modalitäten und Adressen zu erfragen in der Studienzentrale der HIT-REZ-2005-Studie) für in-vivo-Versuche im Tiermodell versenden. Welches Tumorgewebe zusätzlich eingefroren oder für in-vivo-Versuche versendet werden kann, entscheidet der Pathologe/Neuropathologe!

Hinweise zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff:

- 50ml Becher mit flüssigem Stickstoff füllen.
- Mehrere 1,8ml Röhrchen (ROT) beschriften (Name, Geburtsdatum, Lokalisation (**A**, **B**), OP-Datum), aufschrauben und offen im flüssigen Stickstoff vorkühlen.
- Tumorteile wenn sie nicht in die 1,8 ml Röhrchen passen kleinschneiden.
- Schockgefrieren durch Fallenlassen in flüssigen Stickstoff (*NICHT mit der Pinzette in den Stickstoff eintauchen und Stücke NICHT an der Gefäßwand haften lassen!*).
- 1,8 ml Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff nehmen.
- Gefrorene Stücke in 1,8 ml Röhrchen überführen und verschließen (es darf *KEIN* flüssiger Stickstoff mehr in den Röhrchen sein!). Uhrzeit notieren.
- Verschlussene Röhrchen mit Tumorstücken in flüssigem Stickstoff gefroren halten.
- Falls erforderlich: Lagerung bis zum Versand bei mindestens -70 bzw. -80°C oder kühler.

Liquor für molekularbiologische Untersuchungen

2,5 ml Liquor in Portionen a 0,5 ml in sterile Röhrchen aliquotieren, unmittelbar nach Entnahme bei minus $70-80^{\circ}\text{C}$ oder kühler einfrieren und dort lagern bis zum Versand auf Trockeneis. Liquor als lumbalen oder ventrikulären Liquor kennzeichnen.

Vergleichsblut und Normalgewebe:

5-10ml peripheres Blut in Citrat-Monovette (grün) abnehmen und in flüssigem Stickstoff einfrieren.

Versand:

Tiefgefrorene Tumorstücke (in 1,8 ml Röhrchen) und Citratblut bzw. Liquor auf Trockeneis in der Tumorbox per Express versenden. Kammer in der Tumorbox komplett mit Trockeneis füllen. Tumortupfpräparate in den Deckel der Tumorbox (4°C) legen.

Anlage 12 Tumorbank-Einsendebogen

Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
- Molekularbiologische Marker bei embryonalen Tumoren -

Patientendaten: Patientenetikett: Name: Vorname: Geburtsdatum: Geschlecht: []w []m
Diagnose: [] Erstdiagnose [] Verlaufskontrolle [] Rezidiv [] nach Chemotherapie [] nach KMT
Therapie-Studie: Bemerkungen (z.B. 2. Rez.):
Untersuchungsmaterial: Entnahme-Datum: Bitte ankreuzen: Lokalisation
0 Tumor
0 Tumortupfpräparate
0 Liquor O ventrikulär O lumbal
0 Blut (Monovette grün) für DNA-Extraktion
0 Blut (Glasmonovette) für Leukozytenisolation und Serum
0 Serum
0 Normalgewebe
0 tumorzellhaltiges Knochenmark für Molekularbiologie
(Ausstriche und Heparinblut für Immunzytologie beim Neuroblastom bitte extra einsenden)
0 Sonstiges:
Ansprechpartner: Telefon-Nr.:
Stempel Datum: Unterschrift:

Adresse:
Hirntumoren:
Prof. Dr. T. Pietsch
Institut für Neuropathologie der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53105 Bonn
Tel.: +49 (0) 228 2871 6606
Fax: +49 (0) 228 2871 4331

Wird vom Labor ausgefüllt:
Eingangsdatum: Patientennummer:
Materialart Menge Lagerort Zustand beim Eintreffen

Anlage 13 Anleitung zu Herstellung und Versand von Liquorpräparaten

Gerät: z.B. Zytocentrifuge der Firma Shandon

Herstellung der Liquorpräparate

1. Rasche Aufbereitung des Liquors nach Entnahme (innerhalb von 30 Minuten).
2. Objektträger mit dem Namen des Patienten, dem Abnahmedatum und Ort der Liquorabnahme (ventrikulär oder lumbal) beschriften
3. Auf den Objektträger 2 Papierfilterstreifen geben (mit der glatten Papierseite auf die Glasfläche des Objektträgers)
4. Ggf. Austrittsöffnung auf der Rückseite des Objektträgers markieren, falls keine Vormarkierung
5. Küvette auf Papierstreifen aufsetzen (Küvettenöffnung auf Papieröffnung)
6. Küvette in den Clip einklemmen und in die Zentrifuge einsetzen
7. 1 (-2) Tropfen Serum-Albumin (z.B. der Fa. Dade Behring, Spez.-Albumin 22% cat-no. 050111) in die vorbereitete Küvette geben und anschließend 0,2 ml Liquor dazugeben, nachdem zuvor die Zellen durch vorsichtiges Schwenken des Liquorröhrchens aufgeschwemmt wurden (Liquor mit sehr hoher Zellzahl von über 200 Zellen/ μ l wird mit NaCl 0,9% verdünnt).
8. Liquor 7 min bei 500 U/min zentrifugieren
9. Liquor gut trocknen lassen und erst dann Färben (panoptische Färbung nach Pappenheim)
10. Auszählung wie beim Differentialblutbild (unter 100 Zellen/ μ l werden alle Zellen gezählt) sowie Durchsicht des gesamten Präparates nach Tumorzellen und Tumorzellverbänden (so genannten Klustern)
11. Mindestens 10 (5-15) ungefärbte und luftgetrocknete Präparate und 1-2 gefärbte, eingedockte Zytocentrifugenpräparate bitte sofort in bruch sicheren Behältnissen für die (immun-)zytochemischen Färbungen an das Referenzlabor schicken.
12. Natives Liquormaterial (min. 2 ml, max. 5-10 ml) sollte nur bei kurzen Transportwegen (< 4 Stunden, telefonische Vorankündigung) versendet werden.

Materialversand

Versenden Sie Material bitte nur in bruch sicheren Behältnissen!

Der Einsendebogen an das Hirntumorreferenzzentrum (Anhang II, Anlage 15) kann für die Einsendung von Liquorpräparaten verwendet werden.

Referenzlabor

Prof. Dr. Torsten Pietsch
Institut für Neuropathologie
Universitätsklinikum Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53105 Bonn
Telefon +49 (0) 228 2871 6606
Telefax +49 (0) 228 2871 4331
E-mail: referenzzentrum@uni-bonn.de
<http://www.meb.uni-bonn.de/neuropath>