

Manual



för hantering av biologiskt material i Neo-ACT studien

Contents

1. Allmänt.....	3
1.1 Transport	3
1.2 Provhantering – allmänna regler	4
Studieschema med provtagningsöversikt.....	5
2. Hantering av färsk tumörvävnad från biopsier och operationspreparatet.....	6
2.1 Generella regler.....	6
2.2 Omhändertagande och hantering av biopsi baseline	6
2.3 Omhändertagande av biopsi från operationspreparatet.....	7
3. HANTERING AV BLOD- OCH PLASMAPROVER.....	8
3.1 Generella regler.....	8
3.2 Helblod (EDTA)	8
3.3 Plasmaprover (EDTA)	8
3.2.1 För immunceller/FACS	8
3.2.2 För ctDNA.....	9
3.2.3 For serum proteomics.....	9
6 A. Arbetsblad för tumörvävnad (biopsi baseline).....	14
6 B. Arbetsblad för tumörvävnad (operationspreparat)	15
8. HANTERING AV VÄVNAD - FLÖDESSCHEMA.....	19

1. ALLMÄNT

Syftet med de translationella studierna i Neo-ACT studien är att undersöka olika mekanismer som kan spela roll i hur fysisk träning påverkar tumören och mikromiljön omkring den, samt vilka systemiska effekter fysisk träning kan ha under pågående neoadjuvant terapi. Den centrala hypotesen i Neo-ACT studien är att fysisk träning kan öka responsen på preoperativ systemisk behandling för bröstcancer.

Följande typer av material samlas in för translationella studier:

- a) Tumörmaterial
- b) Helblod EDTA
- c) Plasmaprover och serum (heparin, EDTA)
- d) Avföring

Patienter som inkluderas på Karolinska Universitetssjukhuset, S:t Görans sjukhus och Södersjukhuset är aktuella för att delta i provinsamling. Observera att en deltagare ska **ej** ha kryssat i nedanstående ruta på samtyckesblanketten, isf får prover **inte** tas:

Jag önskar **avstå** från insamling av biologiska prover som inte är nödvändiga för kvalitetssäkring och bedömningen av min behandling (bara om aktuellt vid ditt sjukhus).

1.1 Transport

		Kontaktuppgifter
VÄVNAD		
RNAlater (prov 1)	Skickas till CCK (Johan Hartmans lab) batchvis	070 782 85 71 Kontaktperson: Emelie Karlsson /Xinsong Chen
Formalin/Paraffin (prov 2)		
Färsk (prov 3)	Hämtas av Dhifaf Sarhan eller doktorand Nerea	070 448 78 30 Dhifaf.sarhan@ki.se Nerea Martín Almazán +34 666 112 628 nerea.martin.almazan@ki.se
BLOD		
Helblod (EDTA)	KI Biobank*	
Plasma		
Genomics	KI Biobank*	World Courier Tel. 859 441 480 ops@worldcourier.se

Immunology	Dhifaf Sarhan	Se ovan
ctDNA	KI Biobank*	World Courier
Proteomics (serum)	KI Biobank*	World Courier

* Skickas batchvis till KI Biobank

Vid utskick till KI Biobank:

- Meddela några dagar i förväg att prover ska komma (till biobank@ki.se)
- Provleveransen behöver vara hos KI Biobanken senast 15:30 vanliga vardagar
- Originallet av KI biobank remissen skickas alltid med proverna (behåll kopian i din pärm)
- Leveransadressen är:

KI Biobank
plan 4, MEB
Karolinska Institutet
Nobels väg 12A
SE-171 65 Solna

Kontaktnummer KI Biobank: 852 482 377

Hur får jag remissblanketter och kryror?

Remisser beställer Sites via KI Biobank – pga. nuvarande tekniskt problem med klister hos KI vänligen beställ din första batch för max. 20 patienter. KI Biobank rekommenderar att säkra etikett med tejp.

Kryror beställas och skickas från CTO till respektive Site.
Kontakta Klinisk Projektledare vid behov av nytt utskick.

1.2 Provhantering – allmänna regler

Undvik degradering – nedbrytning

Resultaten av de olika analyserna är helt beroende på rätt hantering genom hela processen. Nedbrytning påverkar alla analyser, DNA, RNA och proteiner. För användbara resultat är det viktigt att hanteringen är lika på de olika centra; avvikelser på ett center kan i slutändan äventyra resultaten från hela studien. Försök därför ha så kort tid som möjligt från biopsi/operation och provtagning till frysen! Placera proverna på is under transporten om inte annat anges.

Undvik kontaminering

För att undvika kontaminering ska alltid handskar användas under hela hanteringsperioden.

Det finns gott om RNase enzymer på våra fingrar som lätt kan förstöra RNA.

STUDIESCHEMA MED PROVTAGNINGSOÖVERSIKT

SCHEDULE FOR COLLECTION OF BIOLOGICAL SAMPLES		Baseline	Pre-surgery*	Surgery
Visit code		0	1	Op
TISSUE SAMPLES				
3 core biopsies with 14G needle	- 1 freeze in RNAlater - 1 formalin fixed - 1 fresh collected by Sarhan KI	X		
Tissue from surgical specimen 1 sample in 3 parts	- 1 freeze in RNAlater - 1 formalin fixed - 1 fresh collected by Sarhan KI (- fat tissue: SöS and KS)			X
BLOOD SAMPLES				
Genomics WB 1 EDTA tube (a 4 ml)	Freeze	X (one)		
Immunology 2 EDTA tubes (a 10 ml)	2 fresh collected by Sarhan KI	X (two)	X (two)	
ctDNA 2 EDTA tube (a 10 ml)	Into 8 kryotubes freeze -80°C**	X (two)	X (two)	
Proteomics 1 SST tube (a 5 ml, yellow top)	Into 3 kryotubes freeze -80°C**	X (one)	X (one)	
FAECES SAMPLES				
Faeces 1 tube metabolomics 1 DNA/RNA shield tube	Sent directly by the patient to lab Juan Du, KI (return envelope)	X	X	

* Pre-surgery: preferably taken immediately prior to the pre-surgery physical fitness test that is scheduled 7-10 days after the last preoperative chemotherapy course.

** Preferentially -80°C, when not accesible a maximal one month period in -20°C is permitted with subsequent shipment to KI Biobank

2. HANTERING AV FÄRSK TUMÖRVÄVNAD FRÅN BIOPSIER OCH OPERATIONSPREPARATET

2.1 Generella regler

Tre prov samlas per tillfälle, dvs:

- Baseline (3 stycken 14G biopsier från tumören)
- I samband med operation (1 skiva från tumörområdet som delas upp i 3 bitar).

1. Vävnadsproverna bör endast hanteras med handskar för att förhindra kontamination.
2. Placera en biopsi per rör
3. Märk rören med korrekt etikett med:

- Centernamn (K/Sös/StG)
- Patientens studie ID
- Provtagningstillfälle: Baseline/Operation (*kryssa i den ruta som provet gäller*)
- Datum
- klockslag för placering i medium
- klockslag för infrysning.

och fyll i 6.A Arbetsblad Tumörvävnad (*baseline*) eller 6.B Arbetsblad Tumörvävnad (*operation*)

2.2 Omhändertagande och hantering av biopsi baseline

Biopsimaterial hanteras direkt efter biopsitagning av forskningssjuksköterska och passerar inte patologavdelningen.

Skicka förvarning till Dhifaf Sarhan så fort provtagningen är bokad (enligt kontaktuppgifter under punkt 5.) – viktigt för Prov 3, se nedan.

Site får rör och medium av respektive Johan Harmans labb och Dhifaf Sarhan.

Tre biopsiprover med 14G (Gauge 1,6 mm Ø) nål tas före start av behandlingen.

Prov 1

1. Sänk ner hela vävnaden i 5 volymer RNAlater-lösning (t.ex. ett 0,5 g prov kräver cirka 2,5 ml RNAlater-lösning)
2. Proverna ska förvaras vid 4°C första dygnet och sedan frysas i –20°C. Om ett prov inkommer fredag, lämna tuben i kylan över helgen och flytta till frysen påföljande måndag.
3. Transport till CCK (Johan Hartmans labb) för förvaring och analys sker i tidsintervaller på ca 1–2 månader (annars kontakta labbet och kom överens om annat tidsintervall). För transport är det viktigt att provet inte tinar, lägg alltid is i paketet. Kontaktuppgifter se punkt 5.

Prov 2

läggs direkt i formalin. Paraffinbäddas efter 24 timmar av FSSK. FFPE block skickas till CCK i samband med transport av RNAlater proverna. Proverna transporteras i rumstemperatur.

Prov 3

ska analyseras färskt hos Dhifaf Sarhan och märks med "Sarhan". Provet kan läggas i rör med RPMI medium och stå i kylskåpet tills hämtning sker.

- Om provet tas **innan** kl 16:00 en vardag kommer provet hämtas samma dag av Dhifaf Sarhan eller någon från hennes grupp (se kontaktuppgifter); ring Dhifaf Sarhan i första hand, doktoranden Nerea i andra hand.
- Tas provet **efter** kl 16, eller kan hämtning av någon anledning inte ske samma dag, läggs provet i särskilt medium (MACS® Tissue Storage Solution, ca. 2ml per prov) och står i kylskåpet över natten. Hämtning sker i så fall dagen därpå.

2.3 Omhändertagande av biopsi från operationspreparatet

Operationspreparatet hanteras enligt rutin på vägen från operationssalen till patologavdelningen.

1. Kontrollera att tid för kirurgi stämmer.
2. Märk rören med korrekt etikett med:
 - Centernamn
 - Patientens studie ID
 - Provtagningstillfälle: Baseline/Operation (kryssa bort)
 - Datum
 - klockslag för placering i medium
 - klockslag för infrysning.

och fyll i **6A Arbetsblad Tumörvävnad (operation)**

3. Tumörområdet identifieras i operationspreparatet
4. En 2–3 mm tjock vävnadsskiva tas från tumörområdet, delas i tre bitar och **hanteras enligt 2.2.**
Om ingen synlig tumör finns kvar tas vävnad från tumörbädden.

Fettvävnad

OBS: följande provsamling gäller enbart KS och SöS (ej StG)

Förvarning till Johan Hartmans labb så snart provtagningen är bokad.

(Meddela Xinsong Chen om denna provtagning snarast **via mobil**: 070–7828571)

Rör förfyllda med PBS skickas från CCK till respektive patologilabb på KS och SöS.

1. Ta tre stora fettvävsbitar dels från fettvävnad nära tumören, dels från fettvävnad belägen längre ifrån tumören.
2. Om ingen synlig tumör finns kvar tas vävnad från tumörbädden.
3. Dessa placeras i två olika rör med PBS:
 - en för den fettväv som plockas nära tumören (markera med "nära")
 - en för den fettväv som plockas längre ifrån tumören (markera med "långt").
4. Ring Johan Hartmans labb (tel: 0707828571) för beställning av omedelbar transport, eftersom proverna ska transporteras färska.

Efter provtagning och före upphämtning, förvara PBS-rören med fettvävnad vid rumstemperatur

3. HANTERING AV BLOD- OCH PLASMAPROVER

3.1 Generella regler

Blodprover för samtliga analyser tas före start av den neoadjuvant behandlingen (baseline) och innan operationen (pre-surgery), minst en vecka efter sista neoadjuvanta behandlingen. Provtagning kan med fördel samordnas med besöket för fysisk testning hos fysioterapeut, men ska ske innan testet påbörjas, inte efter.

1. Proverna hanteras direkt, senast inom 60 minuter.
2. Förbered med att sätta de färdiga etiketterna från KI Biobank och för proverna för Dhifaf Sarhan. **Efterfråga projektledare om utskrivna etiketter eller skriv ut själv – använd mallen "Etiketter_Blod Sarhan"**
3. **Fyll i relevanta uppgifter på Arbetsblad** för blodprover. Notera under "Kommentar" om det var några problem, t.ex. hemolys.

3.2 Helblod (EDTA)

Helblod tas i ett 4 milliliter EDTA rör med lila propp, märk med klisteretikett från KI Biobanken och fyll i **6A. Arbetsblad för blodprover. Vänligen använd lämplig KI Remiss med klisteretiketterna.**

Röret fryses i -70°C på respektive site (om inte tillgängligt -20°C under kortare tidsperioder <1 månad).



Proverna förvaras primärt på site och skickas sedan batchvis till KI biobank. Transporten beställs av Site. Transporteras på is.

3.3 Plasmaprover (EDTA)

Använd fyra EDTA-rör med lila propp à 10 ml.

3.2.1 För immunceller/FACS

- använd två 10 ml EDTA-rör
- viktigt att vända röret tio gånger för att fördela antikoagulans
- etiketten ska markeras med
 - studie-ID
 - datum och klockslag för provtagning
 - provtagningstillfället (baseline eller pre-surgery, *välj*).

Datum: __/__/__ (DDMMÅÅ) FACS 1/2	Datum: __/__/__ (DDMMÅÅ) FACS 2/2
Patientens studie ID: _____ Tid __: __	Patientens studie ID: _____ Tid __: __
Provtagningstillfälle:	Provtagningstillfälle:
Baseline <input type="checkbox"/> Pre-surgery <input type="checkbox"/>	Baseline <input type="checkbox"/> Pre-surgery <input type="checkbox"/>
SARHAN 	SARHAN 

Rör förvaras i kyl tills de hämtas Dhifaf Sarhan.

Vid baseline hämtas blod- och tumörmaterial samtidigt, vid pre-surgery tillfället hämtas blod och tumörmaterial vid separata tillfällen.

Sitena kommer få mallen för etiketterna för egen utskrift. **Vänligen kontakta klinisk provningsledare vid önskemål att få utskrivna etiketter.**

Obs att det finns inget Arbetsblad för immunceller/FACS.

3.2.2 För ctDNA

Använd två 10 ml EDTA-rör. Viktigt att vända röret tio gånger för att fördela antikoagulans.

1. Notera tid och datum för insamlingen på arbetsbladen (vg. se 7B)
2. Placera rören på is
3. Centrifugering vid 1500g, +4C° i 10 minuter
4. Pipettera försiktigt plasma (övre "gul" del) till ett nytt rör (*Falcon red-cap-tube*). Använd en 1000 µL pipett och undvik att blanda blodkroppar. Notera om hemolys har inträffat (rosa eller röd). Blanda eller slå **aldrig ihop** icke-hemolyserade och hemolyserade prover.

Notera graden av hemolys; ingen =0, liten (svagt rosa) = +, mellanliggande = ++ och kraftigt (röd) = +++

5. Överför "buffy coat" (vit mellandel) till ett Nunc Kryo rör från **Sarstedt (0,5mL, artikelnummer: 72.730.007, beställs av klinisk provningsledare)**
6. Centrifugering vid 3000g, +4C° i 10 min., för att säkerställa att plasma är filament- och cellfri.
7. Överför plasma till kryo-rör, alikvoter på 0,5 ml vilket resulterar i ungefär tre rör; undvik celler/utfällningar i botten av rören.
8. Markera tuberna med etiketter från KI Biobank - **Vänligen använd lämplig KI Remiss med klisteretiketterna.**
9. Förvaras i -70C° (om inte tillgängligt – 20C° under kortare tidsperioder <1 månad) på site och skickas till KI biobank. Transport beställas av Site.

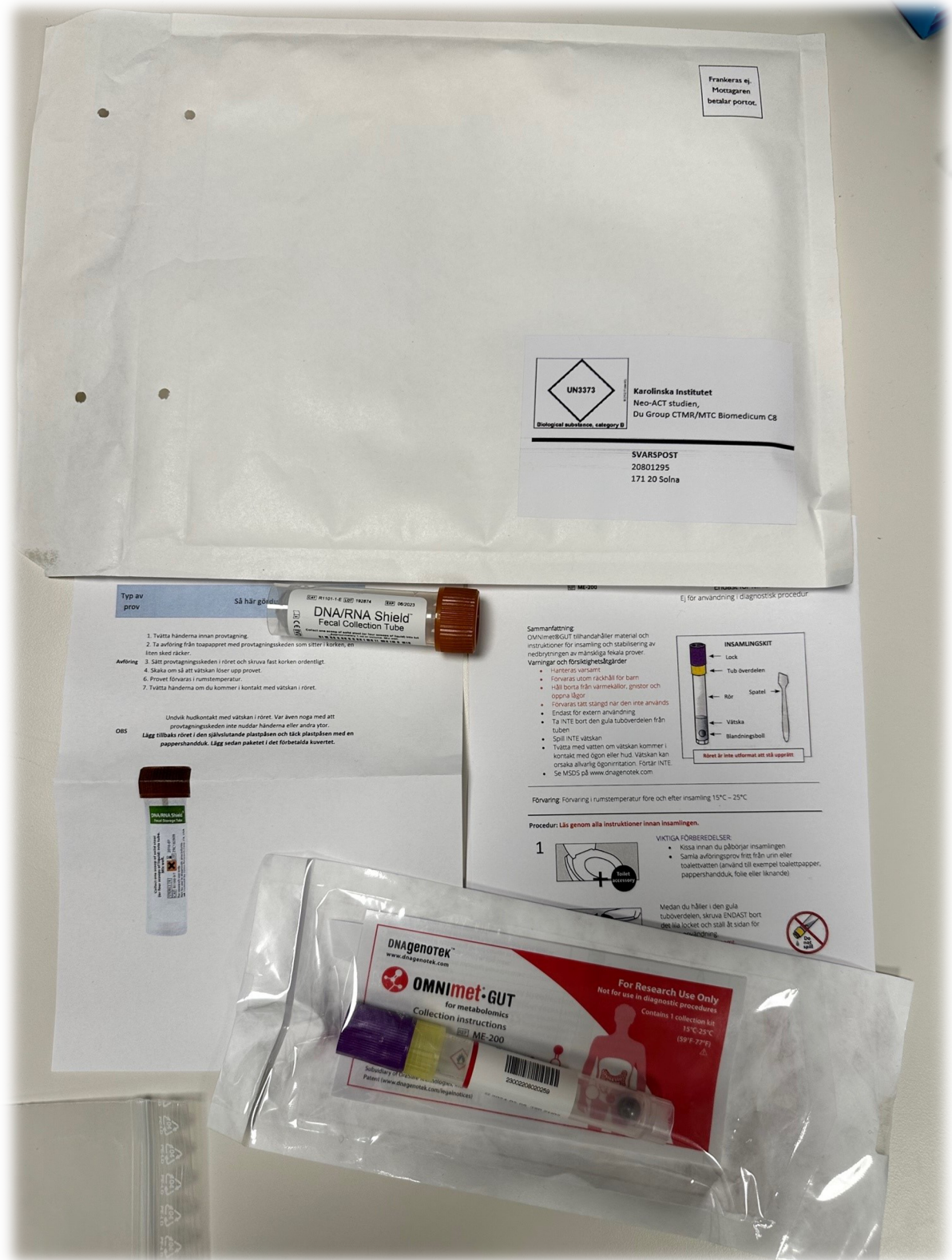
3.2.3 For serum proteomics

För serum används ett 5 ml SST-rör (gul propp, dvs med gel). Serumrör innehåller koagulationsaktivator för att påskynda koagulationen och skall fyllas till dess vakuum upphör. Efter provtagning, vänd röret försiktigt 8 - 10 ggr.

1. Provet skall koagulera stående i rumstemperatur minst 30 min efter provtagning. Blod från patienter som står på antikoagulantibehandling, kan behöva stå längre för att uppnå koagulering.
2. Centrifugering skall ske inom 2 timmar.
3. Centrifugera röret i 10 mi. på 2000g i rumstemperatur. Använd endast centrifug med *swingout*-rotor.

4. Överför serum till kryo-rör, alikvoter på 0,5 ml vilket resulterar i ungefär tre rör; undvik celler/utfällningar i botten av rören.
5. Markera tuberna noggrant med etiketterna från KI Biobank. **Vänligen använd lämplig KI Remiss med klisteretiketterna och fyll i Arbetsblad 7 C.**
6. Förvaras i -70C° (om inte tillgängligt – 20C° under kortare tidsperioder <1 månad) på site och skickas till KI biobank. Transport beställas av Site

4. Avföring – Mikrobiomkits



Varje Site kommer få sina Mikrobiomkits levererade. Vänligen fyll i *Acknowledgement of Receipt* (finns i paketet) och skanna till natalia.pohl@regionstockholm.se

Varje Mikrobiomkit innehåller:

- Returkuvert
- 1 tub med strekkod, **brun** lock + bruksanvisning för patienten = proteinanalys/metabolomics
- 1 tub med strekkod, **lila** lock + bruksanvisning för patienten = DNA/RNA rör

Mikrobiomkits lämnas ut till patienten i sin helhet.

Första utlämningen: Baseline (0)

Andra utlämningen: Pre-Surgery (1)

Vid varje utlämning Patiennummer och Tillfälle ska kopplas till provtagningsrör i kiten

– detta är det ända sättet för oss att tracka vilken kit tillhör vilken patient.

Vänligen fyll eCRF vid utlämning.

StG	Tracker för Du Group StG 15DEC2022.xlsx
KS	Tracker för Du Group KS 15DEC2022.xlsx
SöS	Tracker för Du Group SöS 15DEC2022.xlsx

Varje tub får man skanna för automatisk inmatning av rör kod.

Vid frågor kring eCRF vänligen kontakta Projektledaren på CTO.

5. Kontaktpersoner och adresser

Koordinator translationella studier

Renske Altena
Karolinska Universitetssjukhuset
ME Bröst-, Endokrina tumörer och Sarkom
Renske.altena@ki.se

Johan Hartmans labb

Cancer Centrum Karolinska
Visionsgatan 56, Gamla Karolinska Sjukhuset,
R8:04.
17176, Stockholm
070 782 85 71
Kontaktperson: Emelie Karlsson (emelie.karlsson.2@ki.se) eller Xinsong Chen
(xinsong.chen@ki.se)

Färska prover för direktanalys (blod och tumör)

Dhifaf Sarhan
Karolinska Institutet
Department of Laboratory Medicine
Division of Pathology, Alfred Nobels allé 8, 8th floor
141 52 Huddinge
070 448 78 30
Dhifaf.sarhan@ki.se

Nerea Martín Almazán
+34 666 112 628
nerea.martin.almazan@ki.se

Mikrobiom avföring

Juan Du
Karolinska Institutet
Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC)
Solnavägen 9
171 77 Stockholm
Juan.du@ki.se

Klinisk provningsledare, Clinical Trial Office

Natalia Pohl
Karolinska Universitetssjukhuset
Eugeniavägen 23, plan 3 (Elite Hotel Carolina Tower)
natalia.pohl@regionstockholm.se

Om projektledaren inte är tillgängligt, vänligen kontakta:
ctokpe.karolinska@regionstockholm.se



6 A. Arbetsblad för tumörvävnad (biopsi baseline)

Center: _____

Patientnummer (studieID): _____

Biopsiförfarande

1. Provtagningsdatum (ÅÅMMDD): _____

2. Provtagningsstid (TT:MM): _____

3. Biopsi lagd i RNAlater (TT:MM):
*(endast **Prov 1**)* _____

4. Tidpunkt för infrysning (TT:MM):
*(endast **Prov 1**)* _____

5. Tidpunkt i formalin (TT:MM):
*(endast **Prov 2**)* _____

6. Tidpunkt för paraffinbäddning (ÅÅMMDD:TT):
*(endast **Prov 2**)* _____

7. Antal använda rör: _____

Kommentar

Underskrift av provtagare



6 B. Arbetsblad för tumörvävnad (operationspreparat)

Center: _____

Patientnummer (studie ID): _____

Biopsiförfarande

1. Provtagningsdatum (ÅÅMMDD): _____

2. Provtagningstid (TT:MM): _____

3. Biopsi lagd i RNAlater (TT:MM):
*(endast **Prov 1**)* _____

4. Tidpunkt för infrysning (TT:MM):
*(endast **Prov 1**)* _____

5. Tidpunkt i formalin (TT:MM):
*(endast **Prov 2**)* _____

6. Tidpunkt för paraffinbäddning (ÅÅMMDD:TT):
*(endast **Prov 2**)* _____

7. Antal använda rör: _____

Kommentar

Underskrift av provtagare



7 A: Arbetsblad för blodprover: Helblod

ett 4 milliliter EDTA rör med lila propp

Center: _____

Patientnummer (studieID): _____

Tillfälle (ringa in)

Baseline (innan behandlingsstart) (0)

Pre-surgery (efter sista kur men innan operation) (1)

Blodprov

1. Provtagningsdatum (ÅÅMMDD):

2. Provtagningsstid (TT:MM):

3. Tidpunkt för infrysning – 70° (TT:MM):

4. Tidpunkt för infrysning –20° (TT:MM):

(om -20°C: förvaring < 1 månad)

Kommentar

Underskrift av provtagare

Underskrift av person som lagt proverna i frysen –70° (om inte samma som ovan)



7 B: Arbetsblad för blodprover (ctDNA)

Center: _____

Patientnummer (studieID): _____

Tillfälle (ringa in)

Baseline (innan behandlingsstart) (0)

Pre-surgery (efter sista kur men innan operation) (1)

Blodprov

1. Provtagningsdatum (ÅÅMMDD):

2. Provtagningsstid (TT:MM):

3. Tidpunkt för infrysning – 70° (TT:MM):

4. Tidpunkt för infrysning –20° (TT:MM):

(om -20°C: förvaring < 1 månad)

Kommentar

Underskrift av provtagare

Underskrift av person som lagt proverna i frysen –70° (om inte samma som ovan)



7 C: Arbetsblad för blodprover (proteomics)

Center: _____

Patientnummer (studieID): _____

Tillfälle (ringa in)

Baseline (innan behandlingsstart) (0)

Pre-surgery (efter sista kur men innan operation) (1)

Blodprov

1. Provtagningsdatum (ÅÅMMDD): _____

2. Provtagningsstid (TT:MM): _____

3. Tidpunkt för infrysning – 70° (TT:MM): _____

4. Tidpunkt för infrysning –20° (TT:MM):
(om -20°C: förvaring < 1 månad) _____

Kommentar

Underskrift av provtagare

Underskrift av person som lagt proverna i frysen–70° (om inte samma som ovan)

8. HANTERING AV VÄVNAD - FLÖDESSHEMA

8. HANTERING AV VÄVNAD - ARBETSFLÖDE

Mark rören med korrekt etikett med:

- Centernamn
- Patientens studie ID
- Provtagningsställe: Baseline eller Operation
- Datum
- Klockslag för placering i medium
- Klockslag för infrysning

