

RIVM rapport 350620001/2003

**Biobank voor onderzoek naar chronische
ziekten**

Overzicht van de opbouw en het gebruik van de
bloedverzamelingen van RIVM-cohorten

E.M. den Hoedt, B. Hoebee, H.B. Bueno de
Mesquita

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de DG van het RIVM, in het kader van project 350620, Richtlijnen Goede Voeding.

Abstract

This report describes the structure and use of the biobank at the RIVM Centres for Nutrition and Health, and Prevention and Health Services Research. Samples for this biobank were collected mainly between 1987 and 1998 for three large-scale epidemiological projects. The blood samples of approximately 60,000 participants were stored at temperatures of -20°C , -86°C and -196°C , with samples divided into fractions (plasma, serum, white blood cells, red blood cells) and stored in 0.5 ml and 1.5 ml vials. These samples have been used for several research projects in the field of chronic diseases. In order to regulate the use of the samples for research into specific chronic diseases, so-called protected cohorts have been imposed. At the moment there are four: cardiovascular diseases, cancer, migraine and deceased participants.

Voorwoord

Dit rapport, dat de opbouw en het gebruik beschrijft van de biobank van de centra CVG en PZO, is geschreven op verzoek van de directeur van de sector Voeding en Consumentenveiligheid, prof. dr. ir. D. Kromhout, met als doel een zo compleet mogelijk beeld te krijgen van de biobank en de uitputting ervan om deze de komende tijd zo goed mogelijk te benutten. Het is geschreven in samenspraak met dr. H.B. Bueno de Mesquita, projectleider van het project *Richtlijnen Goede Voeding* en nauw betrokken bij de opbouw van de biobank. Het project *Richtlijnen Goede Voeding* is ook één van de projecten die de biobank gebruikt voor het beantwoorden van vraagstellingen, net als het project *Voeding en het risico op coronaire hartziekten en het metabole syndroom: de rol van genetische gevoeligheid*.

Het hele proces heeft ongeveer een jaar geduurd, omdat de ideeën aan het begin nog niet geheel waren uitgekristalliseerd. In die tijd zijn er zes bijeenkomsten geweest met Daan Kromhout, Bas Bueno de Mesquita en Ellen den Hoedt om de voortgang te bespreken. Toen het geheel duidelijk vorm had gekregen, is het rapport in groter verband besproken met onderzoekers van CVG en TOX die direct bij de biobank betrokken zijn. Van CVG waren dat dr. ir. E. Feskens en dr. ir. J. Boer. Van TOX waren dat dr. B. Hoebee en dr. ir. E. Jansen. Aan de hand van dit overleg heeft het rapport z'n definitieve vorm gekregen. Dit is echter de eerste versie van dit rapport, waarvan we hopen dat in de toekomst regelmatig updates zullen verschijnen. Ook zal dit rapport op het intranet van het RIVM worden gezet. Omdat het neerzetten van een nieuwe versie op het intranet waarschijnlijk minder voeten in de aarde heeft dan drukken zullen nieuwe versies in eerste instantie op het intranet worden gepubliceerd. Na verloop van tijd zal ook een nieuwe versie in druk verschijnen. Aanvullingen en suggesties ter verbetering zijn welkom.

Inhoud

| | |
|---|-----------|
| SAMENVATTING | 9 |
| SUMMARY | 11 |
| 1. INLEIDING | 13 |
| 2. BESCHRIJVING VAN DE BIOBANK..... | 15 |
| 2.1 INLEIDING | 15 |
| 2.2 PEILSTATIONSPROJECT HART- EN VAATZIEKTEN | 15 |
| 2.2.1 Inleiding..... | 15 |
| 2.2.2 Afgenomen hoeveelheid bloed en verwerking | 15 |
| 2.2.3 Opgeslagen hoeveelheid bloed..... | 16 |
| 2.3 MORGEN-PROJECT | 16 |
| 2.3.1 Inleiding..... | 16 |
| 2.3.2 Afgenomen hoeveelheid bloed en verwerking | 17 |
| 2.3.3 Opgeslagen hoeveelheid bloed..... | 17 |
| 2.4 EPIC-PROJECT | 17 |
| 2.4.1 Inleiding..... | 17 |
| 2.4.2 Afgenomen hoeveelheid bloed en verwerking | 18 |
| 2.4.3 Opgeslagen hoeveelheid bloed..... | 18 |
| 2.5 BESCHERMDE COHORTEN | 18 |
| 2.5.1 Inleiding..... | 18 |
| 2.5.2 Cardiovasculaire aandoeningen | 19 |
| 2.5.3 Kanker..... | 20 |
| 2.5.4 Migraine..... | 20 |
| 2.5.5 Overledenen | 20 |
| 2.6 DNA | 21 |
| 2.7 OPSLAG EN LICHTEN VAN DE MONSTERS | 21 |
| 3. GEBRUIK VAN DE BIOBANK | 23 |
| 3.1 INLEIDING | 23 |
| 3.2 PPHV-PROJECT | 23 |
| 3.3 MORGEN-PROJECT | 23 |
| 3.4 EPIC-PROJECT | 23 |
| 3.5 BESCHERMDE COHORTEN | 24 |
| 3.5.1 Cardiovasculaire aandoeningen | 24 |
| 3.5.2 Kanker..... | 24 |
| 3.5.3 Migraine..... | 24 |
| 3.5.4 Overledenen | 24 |
| 3.6 DNA | 24 |
| LITERATUUR..... | 27 |
| BIJLAGEN..... | 29 |
| BIJLAGE 1 AFKORTINGEN | 31 |
| BIJLAGE 2 FIGUREN PER PROJECT VAN DE BASELINEGEGEVENS EN DE HUIDIGE SITUATIE | 33 |
| BIJLAGE 3 TABELLEN VAN DE BASELINEGEGEVENS EN DE HUIDIGE SITUATIE PER PROJECT..... | 47 |
| BIJLAGE 4 OVERZICHT PER PROJECT VAN HET LICHAAMSMATERIAAL DAT IS AFGENOMEN EN OPGESLAGEN... | 53 |
| BIJLAGE 5 PROTOCOL BLOEDVERWERKING VAN HET PPHV-PROJECT | 55 |
| BIJLAGE 6 PROTOCOL BLOEDVERWERKING VAN HET MORGEN-PROJECT..... | 59 |
| BIJLAGE 7 CZE-BELEID BETREFFENDE DE UITPUTTING VAN BLOEDMONSTERS..... | 65 |
| BIJLAGE 8 HOEVEELHEID BESCHERMD LICHAAMSMATERIAAL VOOR BESCHERMDE COHORTEN | 67 |
| BIJLAGE 9 VERZENDLIJST | 69 |

Samenvatting

Dit rapport behandelt de opbouw en het gebruik van de biobank van het Centrum voor Voeding en Gezondheid (CVG) en het Centrum voor Preventie- en Zorgonderzoek (PZO). De biobank wordt voor het grootste gedeelte gevormd door bloed dat is afgenomen bij de deelnemers aan drie epidemiologische projecten (PPHV-project, Morgen-project, en EPIC-project). Na afname bij de deelnemers is het bloed verdeeld in verschillende fracties (plasma, serum, rode cellen, witte cellen, volbloed) en in kleine porties (0,5 ml en 1,5 ml) opgeslagen in vriezers op het RIVM-terrein. Het opslagmateriaal en de opslagtemperatuur verschillen per project. Het bloed is opgeslagen in buisjes, cupjes en rietjes bij respectievelijk -30 °C, -86 °C en -196 °C.

Het PPHV-project liep van 1987 t/m 1991. Dit bloed is het meest gebruikt voor bepalingen, omdat dit het oudste project is. Van de 36.588 deelnemers is bij 99% bloed afgenomen en opgeslagen. Van ruim 40% is een complete serie opgeslagen, waarvan 66% op dit moment nog compleet is. Van bijna 900 deelnemers zijn zowel de rode als de witte cellen gelicht, circa de helft hiervan heeft ook geen volbloed meer. Van de meesten is er echter nog wel DNA.

Het Morgen-project liep van 1993 t/m 1997. Van de 23.105 deelnemers is bij 98% bloed afgenomen. Hiervan was 89% een complete serie. Op dit moment is daarvan 58% nog compleet. Van 1564 deelnemers zijn zowel de rode als de witte cellen gelicht. Van de meesten van hen is er nog wel DNA.

Het EPIC-project maakt gebruik van dezelfde baselinegegevens als het Morgen-project, maar er is wel extra bloed afgenomen. Er is 87% van de deelnemers (19.702 deelnemers) is bloed afgenomen, en hiervan was 94% een complete serie. Op dit moment is van deze series 99,8% nog compleet, want het EPIC-bloed is nog vrijwel niet gebruikt voor bepalingen.

Om de uitgifte van bloed van deelnemers met een bepaalde ziekte (of ander kenmerk), die van belang is uit oogpunt van volksgezondheidsonderzoek te reguleren, zijn er zogenaamde beschermde cohorten ingesteld. Op dit moment zijn er vier beschermde cohorten: cardiovasculaire aandoeningen, kanker, migraine en overledenen. Deze cohorten bestaan uit respectievelijk 888 deelnemers (cardiovasculaire aandoeningen), 739 deelnemers (kanker), 1505 deelnemers (migraine) en 728 deelnemers (overledenen).

Voor verschillende onderzoeksvraagstellingen is van de monsters van het PPHV- en Morgen-project DNA opgewerkt. In totaal is er van ruim 12,5 duizend deelnemers over beide projecten DNA opgewerkt. Hiervoor waren ruim 17 duizend monsters nodig, omdat niet elk monster voldoende DNA opbracht. Op dit moment is er nog van ruim 15,5 duizend monsters DNA, met een gemiddelde van ruim 28 µg per monster. Voor de beschermde cohorten is er DNA van 716 deelnemers in het cohort cardiovasculaire aandoeningen, van 252 deelnemers in het cohort kanker, van 482 deelnemers in het cohort migraine en van 75 deelnemers in het cohort overleden.

Summary

This report describes the structure and use of the biobank at RIVM's Centre for Nutrition and Health (CVG) and Centre for Research on Prevention and Health Care (PZO). The biobank consists mainly of blood samples collected as part of three epidemiological monitoring projects at national level: the PPHV, focusing on cardiovascular diseases, Morgen, a continuation of PPHV but focusing on chronic diseases in general, and EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). After sampling, the blood was divided into fractions (plasma, serum, white cells, red cells and blood) and stored in freezers at RIVM in vials of 0.5 ml and 1.5 ml. Each project has its own storage material and storage temperature, the storage material consisting of tubes (PPHV), cups (Morgen) and straws (EPIC), stored at -30 °C, -86 °C and -196 °C, respectively.

The collection of data for the PPHV project took place from 1987 to 1992. The blood bank for this project is the most depleted, because it is the oldest project. Ninety-nine per cent of the samples from 36,588 participants was stored. Slightly more than 40% of the supply contained a complete series of 16 vials at baseline; of this number, 66% is still complete.

Data collection for the Morgen project took place from 1993 to 1998. Blood stored represented 98% of the 23,105 participants. Eighty-nine per cent of the samples was stored in a complete series of 13 vials at baseline, of which 58% is still complete.

The EPIC project uses the baseline data from the Morgen project, but extra blood was taken from the participants. Of the 19,702 participants giving blood, 94% of the samples represented a complete series of 14 straws at baseline. At the moment, 99.8% of the series is complete, as it has not been used much for research to date.

Guidelines were developed by CVG and PZO to regulate the use of samples from participants who had developed a disease important from a public health point of view. Included in these guidelines are so-called protected cohorts, at the moment, four: cardiovascular diseases (888 participants), cancer (739 participants), migraine (1505 participants) and the deceased (728 participants).

DNA was also isolated for about 12.5 thousand participants from the PPHV and Morgen projects. For these, about 17 thousand samples were needed, because the yield of DNA was not sufficient in all of them. At the moment there are about 15.5 thousand samples with DNA, with a mean of about 28 µg DNA per sample. DNA was isolated from 716 participants in the protected cohort for cardiovascular diseases. For the protected cohorts for cancer, migraine and the deceased, these numbers are 252, 482 and 75, respectively.

1. Inleiding

Bij het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) bevindt zich een grote verzameling lichaamsmateriaal in vriezers, dat afgenomen is in het kader van epidemiologisch onderzoek naar chronische ziekten. Deze verzameling, die vanaf 1985 is opgebouwd, bestaat voor het grootste deel uit bloed en bloedfracties zoals plasma, serum, erytrocyten, leucocyten en DNA. Dit lichaamsmateriaal is verzameld bij deelnemersⁱ, aan onderzoeksprojecten van het voormalige Centrum voor chronische-ziektenepidemiologie (CZE) en zijn voorgangersⁱⁱ. De hierboven genoemde verzameling lichaamsmateriaal zal hierna worden aangeduid als de “biobank”. Op dit moment is de biobank onder beheer van het Centrum voor Voeding en Gezondheid (CVG) en het Centrum voor Preventie- en Zorgonderzoek (PZO), die beide zijn voortgekomen uit de opsplitsing van CZE. De administratie van de biobank ligt bij CVG. Het doel van de biobank is om aan de hand van bepalingen in het lichaamsmateriaal, met name prospectieve, epidemiologische vraagstellingen op het gebied van chronische ziekten te kunnen beantwoorden.

De biobank is in de loop van bijna 20 jaar opgebouwd in het kader van een aantal verschillende projecten. Een totaaloverzicht van de opzet en het gebruik van deze biobank ontbreekt echter tot nu toe. Dit rapport is geschreven om in deze leemte te voorzien. Deze eerste versie zal zich beperken tot de grootste deelverzamelingen van de biobank, namelijk die van de projecten Peilstationsproject Hart- en Vaatziekten (PPHV), Monitoring Risicofactoren en Gezondheid in Nederland (Morgen) en European Prospective Investigation into Cancer (EPIC). Het is de bedoeling, dat in volgende versies de hele biobank beschreven zal worden.

In dit rapport zal eerst de opzet van de biobank worden beschreven (hoofdstuk 2), waarna het gebruik van de biobank tot heden (1 januari 2003)ⁱⁱⁱ aan bod zal komen (hoofdstuk 3). Alle afkortingen zijn te vinden in Bijlage 1, alle figuren staan in Bijlage 2, en alle tabellen in Bijlage 3. Voetnoten worden aangegeven met een Romeins cijfer in superscript; literatuurverwijzingen worden aangegeven met een Arabisch cijfer in superscript.

ⁱ De deelnemers hebben met een toestemmingsformulier (“informed consent”) aangegeven of ze toestemming gaven voor het doen van bepalingen in hun bloed en of ze toestemming gaven voor het koppelen van hun gegevens aan registratiesystemen van derden, zoals het Centraal Bureau voor de Statistiek (doodsoorzakenstatistiek) en de Landelijke Kankerregistratie. Alleen van deelnemers die toestemming hebben gegeven worden bepalingen in hun bloed of koppelingen met andere registraties uitgevoerd.

ⁱⁱ CZE, opgericht in 1992 als Centrum voor Chronische Ziekten en Milieuepidemiologie (CCM) en per 1 januari 1999 CZE, kwam voort uit het Centrum voor Epidemiologie (EPI) en is op 1 januari 2002 opgesplitst in CVG en een voortzetting van CZE, dat per 1 januari 2003 het centrum voor Preventie- en Zorgonderzoek (PZO) is gaan vormen samen met het Centrum voor Zorgonderzoek (CZO).

ⁱⁱⁱ Dit rapport beschrijft de situatie van de biobank per 1 januari 2003. Telkens wanneer er in dit rapport sprake is van “huidige situatie” of “tot op heden” wordt hiermee 1 januari 2003 bedoeld.

2. Beschrijving van de biobank

2.1 Inleiding

In 1985 is voor het eerst begonnen met het afnemen van lichaamsmateriaal bij deelnemers aan een epidemiologisch project. Dit was in het kader van het Zutphen-onderzoek⁴. Daarna is bij vrijwel alle (monitoring)projecten van CZE bloed en/of ander lichaamsmateriaal afgenomen en opgeslagen in vriezers. Bij vrijwel elk project is hiervoor een andere methode gehanteerd, vanwege nieuwe technologieën en opgedane ervaring. Hieronder volgt daarom per onderzoeksproject wat er aan lichaamsmateriaal is afgenomen en hoe dat is verwerkt en opgeslagen^{iv}.

2.2 Peilstationsproject Hart- en Vaatziekten

2.2.1 Inleiding

Het Peilstationsproject Hart- en Vaatziekten (PPHV-project) is niet het eerste project waarbij lichaamsmateriaal werd verzameld, maar wel het grootste. Daarom komt het in dit rapport als eerste aan de orde. De gegevensverzameling voor het PPHV-project liep van 1987 tot en met 1991. Het was een epidemiologisch monitoringproject in drie Nederlandse plaatsen: Amsterdam, Doetinchem en Maastricht. In vijf jaar zijn ruim 36.000 mannen en vrouwen in de leeftijd van 20-59 jaar onderzocht bij de plaatselijke GGD. Het doel van het project was tweeledig:

1. Inzicht geven in niveaus van risicofactoren voor hart- en vaatziekten in de Nederlandse bevolking en veranderingen in deze niveaus over een periode van vijf jaar.
2. Wetenschappelijk onderzoek naar factoren die een rol spelen bij het ontstaan van chronische ziekten, zoals coronaire hartziekten⁸.

Het onderzoek bestond uit drie vragenlijsten, die thuis konden worden ingevuld (algemene vragenlijst, voedingsvragenlijst, medische vragenlijst) en een lichamelijk onderzoek op de plaatselijke GGD. Elke deelnemer kreeg een oproepnummer (oprnr) op volgorde van uitnodiging. In het kader van het lichamelijk onderzoek is er bij de deelnemers bloed afgenomen.

2.2.2 Afgenomen hoeveelheid bloed en verwerking

Voor het PPHV-project zijn er bij de deelnemers drie moederbuizen van 10 ml afgenomen met EDTA als antistollingsmiddel (EDTA-plasma). Voor het volledige protocol van de bloedafname en-verwerking zie Bijlage 5. De deelnemers hoefden niet nuchter te zijn. Het verwerken van het bloed vond plaats bij de GGD, waar het in buisjes werd opgeslagen en aan het eind van iedere werkdag ingevroren bij -20 °C. Na centrifugeren werd het bloed overgepipetteerd in buisjes (1,5 ml) en ontstond er per deelnemer een serie van 16 buisjes: 8 buisjes plasma, 2 buisjes witte bloedcellen, 2 buisjes rode bloedcellen, en 2 buisjes volbloed. Deze buisjes werden genummerd (zie Bijlage 4). Na uiterlijk drie weken werd het bloed naar een centrale opslagruimte vervoerd, waar het werd opgeslagen. Tot mei 2002 was dit een vrieshal in Nieuw-Vennep met een temperatuur van -20 °C. Daarna is het bloed vervoerd naar het RIVM-terrein waar het in een vrieshal ligt opgeslagen bij -30 °C.

^{iv} Een schematisch overzicht hiervan is te vinden in Bijlage 4.

De buisjes zijn per genummerd monster opgeslagen in doosjes van 10 bij 10 buisjes op volgorde van oproepnummer, waardoor series van 16 doosjes ontstonden (100 oproepnummers per doosje). De positie van een deelnemer is in elk van de 16 doosjes hetzelfde.

Als een deelnemer op een latere datum dan gepland naar de GGD kwam, kon deze vaak niet meer bij de juiste serie worden opgeslagen. De monsters van deze deelnemers zijn terechtgekomen in zogenaamde restdoosjes. Deze zijn voorzien van een plattegrond waarop staat aangegeven welk oproepnummer zich op welke positie bevindt^v.

Eén buisje plasma (monster A) is gebruikt om het bloedcholesterolgehalte te meten bij het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium (CKCL) in Rotterdam^{vi}.

2.2.3 Opgeslagen hoeveelheid bloed

In totaal hebben 36.588 personen deelgenomen aan het PPHV-project. Bij 36.336 deelnemers is er bloed afgenomen (99%), maar niet bij iedereen de geplande 30 ml. Van ruim 40% van de deelnemers bij wie bloed is afgenomen kon een complete serie (alle 16 buisjes) worden opgeslagen. Bij 23% van de deelnemers met bloed (8.321 deelnemers) mist 1 buisje (meestal plasma of volbloed), de overigen missen 2 of meer buisjes. Van 34 deelnemers is er maar 1 plasma afgenomen, dat gebruikt is voor de cholesterolbepaling. Deze baselinegegevens staan ook in Figuur 1 en Tabel 1. Het gemiddeld aantal opgeslagen buisjes voor plasma is 4,4 (max. 8), voor rode cellen 2,1 (max. 3), voor witte cellen 2,1 (max. 3) en voor volbloed 1,7 (max. 2).

2.3 MORGEN-project

2.3.1 Inleiding

Het project Monitoring van Risicofactoren en Gezondheid in Nederland (MORGEN-project) is een voortzetting van het PPHV-project. De periode van gegevensverzameling liep van 1993 tot en met 1997 en vond eveneens plaats in Amsterdam, Doetinchem en Maastricht, en eveneens onder mannen en vrouwen in de leeftijd van 20-59 jaar^{vii}. De doelstellingen van het onderzoek waren echter breder:

1. Het verkrijgen van inzicht in de gezondheidssituatie en vóórkomen van risicofactoren in de Nederlandse bevolking in de leeftijd van 20 tot 59 jaar en veranderingen daarin over de tijd.
2. Het verkrijgen van inzicht in veranderingen in de tijd bij dezelfde individuen, in leefstijlpatronen en biologische risicofactoren over de tijd.
3. Het verkrijgen van inzicht in de voorspellende waarde van risicofactoren voor verschillende chronische ziekten.⁶

De deelnemers kwamen eveneens naar de plaatselijke GGD voor het onderzoek en kregen, net als bij het PPHV-project, een algemene vragenlijst, een voedingvragenlijst, een medische vragenlijst en een lichamelijk onderzoek. De vragenlijsten en het lichamelijk onderzoek zijn in nauwe samenwerking met het EPIC-project (zie §2.4) ontwikkeld. In het kader van het

^v Deze zogenaamde bloedplattegronden zijn onder beheer van de databeheerder van de biobank (CVG). Deze heeft ook de informatie betreffende de locaties van de vriezers op het RIVM-terrein.

^{vi} Huidige naam: Afdeling Klinische Chemie & Lipiden Referentie Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt.

^{vii} Voor Doetinchem: van 20 t/m 64 jaar, omdat het een tweede meting betrof van de deelnemers aan het PPHV-project. Dit in tegenstelling tot Amsterdam en Maastricht waar in principe nieuwe deelnemers zijn geselecteerd.

lichamelijk onderzoek is ook bloed afgenomen. Ook bij dit project kregen de deelnemers een oproepnummer.

2.3.2 Afgenomen hoeveelheid bloed en verwerking

Bij de deelnemers, die niet nuchter hoefden te zijn, zijn twee moederbuizen bloed afgenomen voor het Morgen-project: 1 buisje van 2,7 ml met natriumfluoride (NaF) als antistollingsmiddel en 1 buisje van 10 ml met kalium-EDTA (K-EDTA) als antistollingsmiddel. Net als bij het PPHV-project is het bloed verwerkt op de de GGD waar het bloed is afgenomen (zie Bijlage 6 voor het protocol). Na het centrifugeren is het bloed overgedaan in cupjes van 0,5 ml en ontstond een serie van 13 genummerde cupjes per deelnemer (zie ook Bijlage 4): 2 cupjes NaF-plasma, 7 cupjes EDTA-plasma, 2 cupjes witte bloedcellen (leucocyten) en 2 cupjes rode bloedcellen (erythrocyten). Eén cupje NaF- en één cupje K-EDTA-plasma zijn gebruikt om respectievelijk het bloedglucose- en bloedcholesterolgehalte te meten bij het CKCL in Rotterdam. De rest is vervoerd naar het RIVM en opgeslagen in vriezers. Het NaF-cupje, de witte bloedcellen en één cupje rode bloedcellen zijn opgeslagen bij $-30\text{ }^{\circ}\text{C}^{\text{viii}}$. De rest is opgeslagen bij $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ (zie Bijlage 4). Het bloed is opgeslagen per genummerd cupje in doosjes van 5 bij 20. De volgorde van het bloed van de deelnemers in de doosjes is naar afnametijdstip en daarom zijn er bloedplaattegronden^v van de doosjes. De cupjes van een deelnemer staan in elke doos op dezelfde plaats.

2.3.3 Opgeslagen hoeveelheid bloed

Het Morgen-project had 23.105 deelnemers, waarvan bij 98% (22.608 deelnemers) bloed is afgenomen. Het aantal deelnemers en monsters bij baseline staan in Figuur 2 en Tabel 2. Van 89% van de deelnemers met bloed (20.084 deelnemers) kon een complete serie worden opgeslagen. Het gemiddeld aantal opgeslagen cupjes voor EDTA-plasma is 4,1 (max. 7), voor NaF-plasma 1,8 (max. 2), voor rode cellen 1,6 (max. 2) en voor witte cellen 1,6 (max. 2).

2.4 EPIC-project

2.4.1 Inleiding

EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) is, zoals de naam al aangeeft, een Europese studie naar de relatie tussen voeding, levensstijlfactoren en het risico op kanker. Deze wordt uitgevoerd door 22 centra in tien landen (Denemarken, Duitsland, Frankrijk, Griekenland, Groot-Britannië, Italië, Nederland, Noorwegen, Spanje, Zweden). De coördinatie ligt bij het International Agency for Research on Cancer (IARC) in Lyon. De Nederlandse onderzoekspopulatie wordt gevormd door twee studies: Prospect^{ix} van de Universiteit Utrecht en het Morgen-project van het RIVM¹. De informatie verkregen uit de vragenlijsten van het Morgen-project (algemene vragenlijst, voedingsvragenlijst, medische vragenlijst en lichamelijk onderzoek), die ontwikkeld zijn in interactie met het EPIC-project, vormt de baselinemeting van het RIVM-gedeelte van het EPIC-cohort (hierna kortweg EPIC). Tijdens het lichamelijk onderzoek van het Morgen-project is er voor EPIC extra bloed afgenomen. Dit bloed is apart van het Morgen-bloed verwerkt en opgeslagen (zie Bijlage 4).

^{viii} Tot mei 2002 bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, daarna bij $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^{ix} Prospect: een cohortstudie in Utrecht onder 17.357 vrouwen in de leeftijd van 50-69 jaar, die meededen aan een regionale screening naar borstkanker.

Voor de onderzoekspopulatie van EPIC zijn strengere criteria^x gehanteerd dan voor Morgen, zodat deze iets kleiner is (n = 22.715).

2.4.2 Afgenomen hoeveelheid bloed en verwerking

Voor EPIC zijn bij de deelnemers 4 moederbuizen bloed afgenomen. Eén K-EDTA-plasmabuis van 1,2 ml, één serumbuis van 10 ml, en twee citraatplasmabuizen van 10 ml (zie Bijlage 4). Dit bloed is, in tegenstelling tot het Morgen-bloed, niet verwerkt op de GGD, maar naar het RIVM getransporteerd voor de verwerking (zie het protocol²). Het K-EDTA-plasma is gebruikt voor de bepaling van het bloedbeeld; de andere buizen zijn gecentrifugeerd, afgevuld in rietjes van 0,5 ml en opgeslagen in vloeibare stikstof (-196 °C). Per deelnemer zijn er 8 rietjes serum, 12 rietjes plasma, 4 rietjes leucocyten en 4 rietjes erythrocyten opgeslagen. Deze rietjes zijn opgeslagen in visotubes (gekleurde driehoekige kokertjes), die zijn opgeslagen in goblets (ronde bekertjes) (12 visotubes per goblet). De goblets zijn opgeslagen in een canister, een lange koker met 4 goblets per canister. De rietjes van een deelnemer werden gelijkmatig verdeeld over 2 visotubes van dezelfde kleur, waarvan er één bestemd was voor het RIVM, het andere voor het IARC in Lyon. Deze visotubes zijn elk weer in een andere goblet en een andere canister opgeslagen, zodat er canisters bestemd voor het RIVM en canisters bestemd voor het IARC ontstonden^{xi}. Elke visotube bevat dus 4 rietjes serum, 6 rietjes plasma, 2 rietjes leucocyten en 2 rietjes erythrocyten. In tegenstelling tot het PPHV- en Morgen-project waar het bloed per fractie is opgeslagen, is het bloed van het EPIC-project per deelnemer opgeslagen.

In de loop van het project is besloten plasma dat over was na het afvullen van de rietjes niet weg te gooien, maar ook te bewaren. Dit is het zogenaamde extra plasma. Deze rietjes extra plasma zijn ook gelijkmatig verdeeld over visotubes bestemd voor het RIVM en voor het IARC^{xii}.

2.4.3 Opgeslagen hoeveelheid bloed

Aangezien de afname van bloed pas in mei/juni 1993 is begonnen, is slechts bij 87% van de 22.715 deelnemers (19.702 deelnemers) bloed afgenomen. Van de deelnemers van wie bloed is opgeslagen is van 94% (18.470 deelnemers) een complete serie van 14 rietjes opgeslagen; de rest mist één of meer rietjes, maar van iedereen is tenminste één serumrietje opgeslagen. De baselinegegevens staan in Figuur 3.

Het gemiddeld aantal opgeslagen rietjes voor citraatplasma is 4,4 (max. 6), voor serum 3,1 (max. 4), voor rode cellen 1,9 (max. 2), voor witte cellen 1,9 (max. 2) en voor extra plasma 4,1 (max. 6).

2.5 Beschermde cohorten

2.5.1 Inleiding

Omdat de hoeveelheid verzameld lichaamsmateriaal eindig is, is het zaak dat de uitgifte ervan op een verantwoorde manier gebeurt: niet te snel omdat dan het risico aanwezig is dat er te weinig lichaamsmateriaal overblijft voor toekomstige bepalingen, maar ook niet te langzaam omdat dan het risico aanwezig is, dat bepaalde bepalingen niet meer mogelijk zijn. CZE heeft

^x Van de deelnemer moest zowel een algemene vragenlijst als een toestemmingsformulier aanwezig zijn (besluit genomen op 26 maart 1999 in een overleg tussen Bas Bueno de Mesquita, Anneke Blokstra en Patrick Steinberger).

^{xi} De canisters bestemd voor het IARC zijn vervoerd naar Lyon.

^{xii} Het extra plasma bestemd voor het IARC is tot op heden nog niet naar Frankrijk vervoerd.

daarom een beleid voor de uitputting van de bloedmonsters ontwikkeld, dat weergegeven wordt in Bijlage 7. Voor het onderzoek van CVG en PZO, dat zich richt op de relatie tussen levensstijlfactoren en chronische ziekten, zijn deelnemers die na deelname aan het onderzoek bepaalde ziekten krijgen van extra belang. Deze zogenaamde incident cases kunnen veel informatie opleveren. Van hen is het zaak, dat er voldoende lichaamsmateriaal aanwezig is/blijft om bepalingen te doen die betrekking hebben op de bij hen ontwikkelde ziekte. Het gaat hier met name om ziekten die van belang zijn uit oogpunt van de volksgezondheid. Daarom is afgesproken bij CZE^{xiii} dat onderzoekers een aanvraag kunnen indienen voor een zogenaamd beschermd cohort. Dit houdt in, dat van deelnemers met een bepaalde aandoening of met een bepaald kenmerk lichaamsmateriaal gereserveerd wordt voor onderzoek op dat specifieke terrein. De gezamenlijke Scientific Advisory Group (SAG) van CVG en PZO moet hiervoor wel toestemming geven. Op dit moment zijn er vier beschermde cohorten: voor deelnemers met cardiovasculaire aandoeningen, met kanker, met migraine, en voor overledenen. Het totaal aan oproepnummers in de gezamenlijke cohorten is 3.806. Voor diabetes wordt op dit moment een beschermd cohort aangevraagd, maar dat zal in de eerste versie van dit rapport niet behandeld worden. De intentie is om deze cohorten elke twee jaar te actualiseren. Hieronder zal per beschermd cohort worden aangegeven wat de criteria zijn. Hoeveel er per cohort gereserveerd is staat in Bijlage 8.

2.5.2 Cardiovasculaire aandoeningen

Het beschermde cohort Cardiovasculaire Aandoeningen (CVZ) bestaat uit de volgende soorten deelnemers (totaal: n=888):

1. Deelnemers overleden^{xiv} tot 1 januari 2000 aan een aandoening van het circulaire systeem. Als de deelnemer is overleden vóór 1 januari 1996 is het selectie criterium één van de ICD9-codes^{xv} 390 t/m 459 in de doodsoorzakenrubriek, is de deelnemer erna overleden dan is dit één van de ICD10-codes^{xvi} I00 t/m I99. Plus nog 10% “ruis” vanwege privacy overwegingen (deelnemers overleden tot 1 januari 2000 aan een andere doodsoorzaak dan een van de hierboven genoemde codes)^{xvii}. In het kader van dit beschermde cohort heten deze de fatale cases (n=484).
2. Deelnemers die bij vervolgonderzoek (dus niet bij de baselinemeting) zelf gerapporteerd hebben, dat ze een infarct, bypass of een dotterbehandeling hebben gehad. Dit zijn de niet-fatale cases (n=404).

Oorspronkelijk was het de bedoeling, dat het cohort CVZ zou bestaan uit deelnemers overleden aan coronaire hartziekten (ICD9-codes 410 t/m 414 of ICD10-codes I20 t/m I25) en aan cerebrovasculaire aandoeningen (ICD9-codes 430-439 of ICD10-codes I60 t/m I69) en uit de hierboven onder 2 genoemde niet-fatale cases. Maar omdat individuele doodsoorzaken het CBS niet mogen verlaten, was het niet mogelijk het cohort op deze manier samen te stellen. In overleg met het CBS is toen besloten alle fatale cases genoemd onder 1 te leveren plus daarbovenop de genoemde 10% ruis, zodat individuele doodsoorzaken niet meer te herleiden zouden zijn^{xvii}.

^{xiii} Deze richtlijnen zijn goedgekeurd door de SAG (Scientific Advisory Group) van CZE op 4 september 2000.

^{xiv} Informatie afkomstig van de doodsoorzakenstatistiek van het CBS.

^{xv} ICD9: International Classification of Diseases, 9th revision, WHO, Geneva, 1977. Gehanteerd voor de doodsoorzakenstatistiek tot 1 januari 1996.

^{xvi} ICD10: International Classification of Diseases, 10th revision, WHO, Geneva, 1992. Gehanteerd voor de doodsoorzakenstatistiek vanaf 1 januari 1996.

^{xvii} Zie de overeenkomst tussen het CBS en het RIVM inzake Retrospectief Onderzoek Ischemische Hartziekten getekend op 21 juni 2000 met een aanvulling op 28 augustus 2000.

2.5.3 Kanker

Het beschermd cohort kanker (n=739) wordt gevormd door deelnemers die na deelname kanker hebben gekregen. Het gaat alleen om deelnemers met een vorm van kanker, die van belang is uit oogpunt van de volksgezondheid. Deze vormen zijn: slokdarm-, maag-, colon-, endeldarm-, long-, borst-, en prostaatkanker. De gegevens hiervoor zijn eind 2000 geleverd door de Landelijke Kankerregistratie (LKR) en door drie regionale kankercentra (Amsterdam (IKA), Limburg (IKL), en Oost (IKO)), en beschrijven de incidentie cases tot en met december 1996.

De aantallen per vorm van kanker zijn als volgt:

| ICD-9 | Betekenis | Aantal incidente cases t/m 1996 |
|--------|-----------------|---------------------------------|
| 150 | Slokdarmkanker | 17 |
| 151 | Maagkanker | 33 |
| 153 | Colonkanker | 90 |
| 154 | Endeldarmkanker | 60 |
| 162 | Longkanker | 182 |
| 174 | Borstkanker | 368 |
| 185 | Prostaatkanker | 55 |
| Totaal | | 805 ^{xviii} |

2.5.4 Migraine

Dit cohort (n=1505) bestaat uit migraine cases (n=863) en bijbehorende controles (n=626)^{xix}. Van 16 deelnemers is niet vermeld of het een case of een controle is^{xx}. Verder zijn de cases geclassificeerd van 1 t/m 5.

De verdeling over deze categorieën is als volgt:

| Categorie | Betekenis | Aantal cases |
|-----------|----------------------------------|--------------|
| 1 | migraine zonder aura | 549 |
| 2 | migraine met aura | 166 |
| 3 | migraine met en zonder aura | 109 |
| 4 | mogelijk migraine | 36 |
| 5 | mogelijk migraine ^{xxi} | 3 |
| Totaal | | 863 |

2.5.5 Overledenen

Omdat er niet jaarlijks gekoppeld wordt met de doodsoorzakenstatistiek van het CBS, de LKR of een andere registratie, kan het voorkomen dat iemand aan een hierboven genoemde ziekte overlijdt zonder dat dat bij CVG of PZO bekend is. Daarom is besloten in de SAG^{xxii} dat van alle overledenen die nog niet in een beschermd cohort zitten, DNA wordt gereserveerd over een periode van uiterlijk vijf jaar, totdat duidelijk is of deze deelnemer kan worden ingesloten bij een van de hierboven genoemde cohorten. Dit reserveren zal jaarlijks

^{xviii} Er zijn deelnemers met meer dan één vorm van kanker.

^{xix} Geïdentificeerd door Lenore Launer.

^{xx} Deze zijn toegevoegd op verzoek van Mark Kruit, een onderzoeker van het Academisch Ziekenhuis Leiden.

^{xxi} Lenore Launer kon het verschil niet precies aangeven tussen categorie 4 en 5 (e-mail d.d. 6 maart 2003).

^{xxii} SAG d.d. 19/6/2000.

gebeuren. Per 1 januari 2003 waren er 728 deelnemers in dit cohort (zonder overlap met andere cohorten). In totaal waren er 1480 deelnemers overleden per 21 maart 2000.

2.6 DNA^{xxiii}

Sommige onderzoeksvraagstellingen hebben betrekking op de relatie tussen genetische eigenschappen en de incidentie van chronische ziekten. In dat kader wordt er van de deelnemers DNA opgewerkt uit de opgeslagen witte bloedcellen. Omdat voor het PPHV- en Morgen-project bij het centrifugeren de scheiding van witte en rode bloedcellen niet altijd even goed heeft plaatsgevonden worden in de praktijk voor deze twee projecten zowel de witte als de rode cellen gelicht voor het opwerken van DNA. Dit gebeurt op het RIVM bij het Laboratorium voor Toxicologie, Pathologie en Genetica (TOX; voorheen Laboratorium voor Effectonderzoek (LEO)), waar het ook wordt opgeslagen bij -20 °C. De samenwerking tussen TOX en CZE is begonnen in 1998 met als doel het DNA van de CZE-projecten op gestandaardiseerde en meest optimale wijze te kunnen opwerken en uitgeven. Op deze manier wordt ook voorkomen dat DNA-monsters onnodig over andere laboratoria in Nederland verspreid raken.

Na het uittesten van verschillende commercieel verkrijgbare kits voor DNA-isolatie en van een aantal op andere laboratoria gebruikte protocollen, heeft TOX uiteindelijk voor een eigen, vrij uitvoerig protocol gekozen, omdat dit het beste verontreiniging van het DNA met eiwitten en haemgroepen voorkomt⁷. Voor de monsters van het EPIC-project en voor de Morgen-monsters uit Amsterdam kan ook een commercieel verkrijgbare kit worden gebruikt, die minder arbeidsintensief is (DNA isolation for mammalian blood kit van Boehringer). Na de isolatie wordt de concentratie van het DNA bepaald⁵. Als dit is gebeurd worden de DNA-monsters geëtiketteerd en opgeslagen bij 4 °C totdat alle monsters behorend bij een onderzoeksvraag zijn afgehandeld en uitgepipetteerd. Daarna vindt een permanente opslag plaats bij -20 °C. De gegevens van de opgeslagen DNA-monsters worden verwerkt in de DNA-administratie^{xxiv}.

2.7 Opslag en lichten van de monsters

Er zijn verschillende soorten vriezers waarin de bloedmonsters zijn opgeslagen: een vrieshal (-30 °C), vrieskasten (-20 °C, -30 °C, en -86 °C), een vrieskist (-86 °C) en stikstoftanks (-196 °C). Deze staan verspreid over het RIVM-terrein^v.

Voor de beveiliging zijn alle vriezers aangesloten op het temperatuurregistratie-systeem van het RIVM: IRAS (InventarisRegistratie- en AlarmeringsSysteem^{xxv}).

Het oudste materiaal ligt opgeslagen bij de hoogste temperaturen (-20 °C en -30 °C), net als het grootste gedeelte van de bloedcellen. Het meeste lichaamsmateriaal van de recentere projecten is bij -86 °C en -196 °C opgeslagen. De manier waarop de monsters zijn opgeslagen verschilt ook per project. Zo geldt, globaal gesproken, hoe recenter het project hoe kleiner het opgeslagen volume (van 1,5 ml naar 0,35 ml). Ook het materiaal is veranderd in de loop van de tijd. Werden in het begin buisjes gebruikt die in kartonnen doosjes van 10 bij 10 buisjes werden opgeslagen, momenteel worden micronicblokken van 8 bij 12 micronicbuisjes^{xxvi} gebruikt. Voor de vloeibare stikstof zijn rietjes gebruikt.

^{xxiii} Mede-auteur van deze paragraaf: Barbara Hoebee (TOX).

^{xxiv} Hiervoor heeft TOX een eigen database ontwikkeld in MS-Access. In deze database kan bekeken worden of de voor een onderzoeksvraag gewenste hoeveelheid DNA aanwezig is. Daarnaast kunnen er reserveringen gemaakt worden voor toekomstige DNA-uitgiften.

^{xxv} Zie ook de SOP LIS/P101: Registratie en en bewaking van de temperatuur m.b.v. het PRIVA- systeem

^{xxvi} Dit is voor het Regenboogproject, dat in de eerste versie van dit rapport niet wordt behandeld.

Deels zijn deze veranderingen het gevolg van een verbetering van de techniek en deels het gevolg van ervaring die bij het RIVM is opgebouwd in het verwerken en opslaan van bloed en het later weer gebruiken (lichten) ten behoeve van bepalingen.

Om de administratie bij te houden van al het lichaamsmateriaal is een databeheerder bij CVG aangesteld, die de administratie bijhoudt van het lichaamsmateriaal van elk project afzonderlijk en van de inhoud van de vriezers. Voor het dagelijkse (fysieke) beheer van de vriezers is een beheerder aangesteld bij het Laboratorium voor Infectieziekten Screening (LIS)^{xxvii}.

Voor het lichten van bloed is een procedure opgesteld³. Deze houdt in, dat een aanvraag altijd moet worden ingediend bij de SAG door of via een onderzoeker van CVG of PZO. De SAG beslist of een aanvraag wordt gehonoreerd. In geval van toestemming, kan de lijst met te lichten oproepnummers worden doorgegeven aan de databeheerder van de biobank. Deze gaat na of er nog voldoende lichaamsmateriaal aanwezig is en maakt een lichtlijst. De onderzoeker licht zelf de monsters, waarna het lichtverslag aan de databeheerder wordt gegeven. Deze verwerkt het lichtverslag in de administratie van de biobank.

^{xxvii} Zie SOP CZE/101 versie 1: Regeling toegang en opslag CZE-vriezers en stikstofvaten.

3. Gebruik van de biobank

3.1 Inleiding

Sinds 1990 is er regelmatig bloed gelicht voor verschillende vraagstellingen. Het meeste is gelicht van het PPHV-project, omdat dit het oudste is; het EPIC-project is nog nauwelijks gebruikt. Per project wordt hieronder aangegeven wat het aantal deelnemers was, van hoeveel deelnemers er hoeveel monsters bij baseline zijn opgeslagen en van hoeveel deelnemers er per 1 januari 2003 er nog monsters aanwezig waren. De gegevens zijn afkomstig uit de administratie van de biobank. Voor elk project is daarin een bestand waarin op monsterniveau is aangegeven wat de status van het monster is (nooit aanwezig geweest, aanwezig, gelicht). Als een monster gelicht is, zijn de lichtgegevens bewaard (onderzoeker, datum lichten, doel van het onderzoek). In het kader van dit rapport wordt alleen volstaan met de status “gelicht”; een overzicht van de onderzoeken waarvoor gelicht is wordt niet gegeven.

3.2 PPHV-project

Van het PPHV-project is het tot nu toe het meeste bloed gelicht. In Figuur 1 staat aangegeven hoe groot het aantal deelnemers was, van hoeveel deelnemers de verschillende monsters bij baseline zijn opgeslagen en van hoeveel deelnemers deze monsters nog aanwezig waren op 1 januari 2003.

Tabel 1 geeft de uitputting weer van het PPHV-bloed naar aantal oorspronkelijk opgeslagen buisjes. Van de 15.623 complete series^{xxviii} bij baseline is op dit moment 66% nog steeds compleet (10.288 deelnemers) over, dit wil zeggen met een serie van nog 7 buisjes plasma. Er is geen enkele deelnemer van wie alle monsters uitgeput zijn. Van 603 deelnemers is het plasma op, van 1564 de rode cellen, van 2754 de witte cellen en van 6572 is er geen volbloed. Van 1241 deelnemers zijn zowel de rode als de witte cellen op, hiervan hebben er 826 ook geen volbloed. Er zijn 364 deelnemers waarvan zowel het plasma, de rode als de witte cellen uitgeput zijn; van 10 van hen is er nog wel volbloed.

3.3 MORGEN-project

In Figuur 2 staan voor het Morgen-project dezelfde gegevens als in Figuur 1 voor het PPHV-project. Tabel 2 geeft de uitputting weer van het Morgen-bloed: het huidige aantal cupjes per fractie naar het oorspronkelijke aantal cupjes.

Van de 20.084 complete series^{xxviii} bij baseline is 58% (11.639 series) nog steeds compleet, dat wil zeggen met 5 EDTA-plasma's en 1 NaF-plasma, omdat 2 EDTA-plasma's zijn gebruikt voor de cholesterolbepaling en 1 NaF-plasma voor de glucosebepaling. Van 673 deelnemers is al het EDTA-plasma op, van 1932 alle rode cellen, van 2204 alle witte cellen en van 4060 al het NaF-plasma. Van 1920 deelnemers zijn zowel de witte als de rode cellen op en hiervan is van 644 deelnemers ook het EDTA-plasma uitgeput.

3.4 EPIC-project

In Figuur 3 staan dezelfde gegevens voor het EPIC-project als in Figuur 1 voor het PPHV-project en in Figuur 2 voor het Morgen-project. Van de 18.470 complete series^{xxviii} bij baseline is op dit moment 99,8% (18.441 series) nog steeds compleet (hierbij is het extra

^{xxviii} De informatie over complete series wordt niet weergegeven in de tabellen.

plasma niet meegerekend). Er is geen tabel voor de uitputting, omdat het EPIC-bloed nog niet veel gebruikt is.

3.5 Beschermde cohorten

3.5.1 Cardiovasculaire aandoeningen

Voor het cohort CVZ zijn tot nu toe de meeste bepalingen gedaan. Dit betekent ook, dat er van dit cohort het meeste gelicht is. In Figuur 4 is te zien hoeveel er per genummerd monster nog aanwezig is voor het PPHV-project. Hieruit blijkt, dat van het plasma de monsters B en C vrijwel uitgeput zijn. Van de rode cellen is RIII ook een groot deel uitgeput, net als WIII van de witte cellen. Figuur 5 geeft aan hoeveel monsters er nog zijn voor het Morgen-project: er is nog vrijwel geen uitputting.

Er is op dit moment van 716 deelnemers DNA opgewerkt.

3.5.2 Kanker

Figuur 6 geeft het aantal deelnemers, het aantal deelnemers per genummerd monster bij baseline en het huidige aantal nog aanwezige monsters voor het PPHV-project. Figuur 7 geeft deze gegevens voor het Morgen-project en Figuur 8 voor het EPIC-project. Hieruit blijkt, dat er nog geen uitputting is. Van 252 deelnemers is er DNA opgewerkt.

3.5.3 Migraine

Het aantal deelnemers in het cohort Migraine, het aantal deelnemers per genummerd monster bij baseline en het huidige aantal deelnemers per genummerd monster zijn voor het PPHV-project te vinden in Figuur 9 en voor het Morgen-project in Figuur 10. Er is nog vrijwel geen uitputting van de monsters. Voor het beschermde cohort Migraine als zodanig is er nog geen DNA opgewerkt, maar er is wel van 482 deelnemers DNA aanwezig.

3.5.4 Overledenen

Het aantal deelnemers in het cohort Overledenen, het aantal deelnemers per genummerd monster bij baseline en het huidige aantal deelnemers per genummerd monster zijn voor het PPHV-project te vinden in Figuur 11 en voor het Morgen-project in Figuur 12. Vergeleken met het hele PPHV-project is het B-monster van het plasma meer gelicht, maar het is nog niet uitgeput. De uitputting van het Morgen-project komt overeen met de algehele uitputting van het Morgen-project. Voor het beschermde cohort Overledenen als zodanig is ook geen DNA opgewerkt, maar er is van 75 overledenen DNA.

3.6 DNA

Er zijn tot nu toe ruim 17000 monsters opgewerkt van het PPHV- en Morgen-project (zie Tabel 3). De meeste hiervan zijn opgewerkt bij TOX, maar in de periode voordat TOX bij het opwerken betrokken was zijn er ook monsters elders opgewerkt^{xxix} (ruim 700). De monsters die gebruikt worden om DNA uit te isoleren zijn voor het PPHV-project de drie witte-celfracties en de drie rode-celfracties en eventueel de twee monsters volbloed. Voor het Morgen-project worden de twee witte-celfracties en de twee rode-celfracties gebruikt. Omdat

^{xxix} Deze monsters zijn opgewerkt bij het Amsterdams Medisch Centrum (AMC) en het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMC, destijds nog Academisch Ziekenhuis Utrecht (AZU)).

het genetisch materiaal van een persoon niet verandert, is het voor DNA niet van belang hoe lang de cellen al zijn opgeslagen en dus bij welk project het bloed is afgenomen. Als een deelnemer zowel aan het PPHV-project als aan het Morgen-project heeft deelgenomen, dan kunnen van beiden projecten de cellen gelicht worden en zijn er tien monsters (eventueel twaalf met het volbloed meegerekend) beschikbaar.

Voor het opwerken van het DNA is het echter wel van belang te weten bij welk project het bloed is afgenomen en verwerkt, want zoals Tabel 3 en Tabel 4 laten zien zitten er opmerkelijke verschillen in de opbrengst per monster en in het gemiddeld aantal keren dat er van een oproepnummer een monster moet worden opgewerkt om voldoende DNA te krijgen. Zo levert voor Amsterdam het eerste monster in gemiddeld 84% van de gevallen al voldoende DNA, terwijl die percentages voor Doetinchem en Maastricht respectievelijk 74% en 76% zijn (Tabel 3). Ook de opbrengst verschilt per peilstation en per project. Zo is voor de monsters uit Amsterdam de gemiddelde opbrengst voor het PPHV- en het Morgen-project respectievelijk 46,9 µg en 32,8 µg. Voor Doetinchem is dat respectievelijk 31,1 µg en 15,0 µg en voor Maastricht respectievelijk 31,1 µg en 26,3 µg (Tabel 4). De opbrengst van het PPHV-project is dus beduidend hoger dan van het Morgen-project. Voor beide projecten geeft Amsterdam de hoogste opbrengst. Doetinchem geeft, vooral bij het Morgen-project, de laagste opbrengst. Voor een polymorfismebepaling is tegenwoordig meestal 20 ng tot 50 ng nodig, dus zelfs bij een lage opbrengst kunnen in de meeste gevallen nog een of meerdere bepalingen worden gedaan. In Tabel 4 zijn de monsters die geen DNA hebben opgeleverd niet meegeteld, daarom komt het totaal aantal monsters lager uit dan in Tabel 3.

Per project en per jaar verschilt de opbrengst ook nog per bloedfractie. Op grond hiervan heeft TOX een strategie ontwikkeld voor het bloed van beide projecten welke bloedfractie het best als eerste kan worden gelicht en welke daarna (zie Tabel 5). Voor het Morgen-project kan de witte-celfractie altijd het beste als eerste worden gelicht. Voor het PPHV-project verschilt het per peilstation en per jaar. Vanwege de slechte opbrengst van de Doetinchem-monsters in het Morgen-project gaat voor Doetinchem de voorkeur uit naar het lichten van de PPHV-monsters.

Literatuur

1. Boker LK, PAH van Noord, YT van der Schouw et al. Prospect-EPIC Utrecht: Study design and characteristics of the cohort population. *European Journal of Epidemiology* 2001; 17:1047-53.
2. CCM-Cryolab. Verwerking EPIC bloedmonsters. Bilthoven, 1997. (Standard Operating Procedure).
3. Hoedt E den, C van Rossum. Gebruik van lichaamsmateriaal. Handleiding voor het gebruik van lichaamsmateriaal van CZE. Versie 1. Bilthoven: CZE, 2000.
4. Kromhout D, GL Obermann-de Boer. Zutphen 1985: epidemiologisch onderzoek naar voedselconsumptie, leefgewoonten en chronische ziekten. Leiden: Instituut voor Sociale Geneeskunde, Rijksuniversiteit Leiden, 1986.
5. LEO. Voorschrift voor de DNA concentratie bepaling met behulp van PicoGreen. Bilthoven, 2002; LEO/1084 (Standard Operating Procedure).
6. Smit HA, WMM Verschuren, HB Bueno de Mesquita, JC Seidell. Monitoring van Risicofactoren en Gezondheid in Nederland (MORGEN-project): Doelstellingen en werkwijze. Bilthoven: RIVM, 1994; RIVM-rapport 263200001.
7. TOX. Isolatie van genomisch DNA uit ingevroren bloedfracties van de PEILSTATION, MORGEN en EPIC studie. Bilthoven, 2003; TOX/1083 (Standard Operating Procedure).
8. Verschuren WMM, HA Smit, EM van Leer et al. Prevalentie van risicofactoren voor hart- en vaatziekten en veranderingen daarin in de periode 1987-1991. Eindrapportage Peilstationsproject Hart- en Vaatziekten 1987-1991. Bilthoven: RIVM, 1994; RIVM-rapport 528901011.

BIJLAGEN

Bijlage 1 Afkortingen

| | |
|--------|--|
| CBS | Centraal Bureau voor de Statistiek |
| CKCL | Centraal Klinisch-Chemisch Laboratorium ^{vi} |
| CVG | Centrum voor Voeding en Gezondheid ⁱⁱ |
| CVZ | Cardiovasculaire Aandoeningen |
| CZE | Centrum voor Chronische-Ziektenepidemiologie ⁱⁱ |
| EPIC | European Prospective Investigation into Cancer (1993 - heden) |
| GGD | Gemeentelijke Geneeskundige Dienst |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| ICD | International Classification of Diseases ^{xv-xvi} |
| IKA | Integraal Kankercentrum Amsterdam |
| IKL | Integraal Kankercentrum Limburg |
| IKO | Integraal Kankercentrum Oost |
| LIS | Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en -Screening |
| MORGEN | Monitoring Risicofactoren en Gezondheid in Nederland (1993 - 1997) |
| PPHV | Peilstationsproject Hart- en Vaatziekten (1987 - 1991) |
| PZO | Centrum voor Preventie- en Zorgonderzoek ⁱⁱ |
| RIVM | Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu |
| SAG | Scientific Advisory Group (CZE, CVG, PZO) |
| TOX | Laboratorium voor Toxicologie, Pathologie en Genetica (2002 - heden) |
| VCV | Sector Voeding en Consumentenveiligheid (2002 – heden) |

Bijlage 2

Figuren per project van de baselinegegevens en de huidige situatie

Figuur 1

PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003 34

Figuur 2

Morgen-project: Absolute aantallen genummerde cupjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003..... 35

Figuur 3

EPIC-project: Absolute aantallen genummerde rietjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/200336

Figuur 4

Beschermd cohort CVZ

PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/200337

Figuur 5

Beschermd cohort CVZ

Morgen-project: Absolute aantallen genummerde cupjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003..... 38

Figuur 6

Beschermd cohort Kanker

PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/200339

Figuur 7

Beschermd cohort Kanker

Morgen-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003..... 40

Figuur 8

Beschermd cohort Kanker

EPIC-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003.....41

Figuur 9

Beschermd cohort Migraine

PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/200342

Figuur 10

Beschermd cohort Migraine

Morgen-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003..... 43

Figuur 11

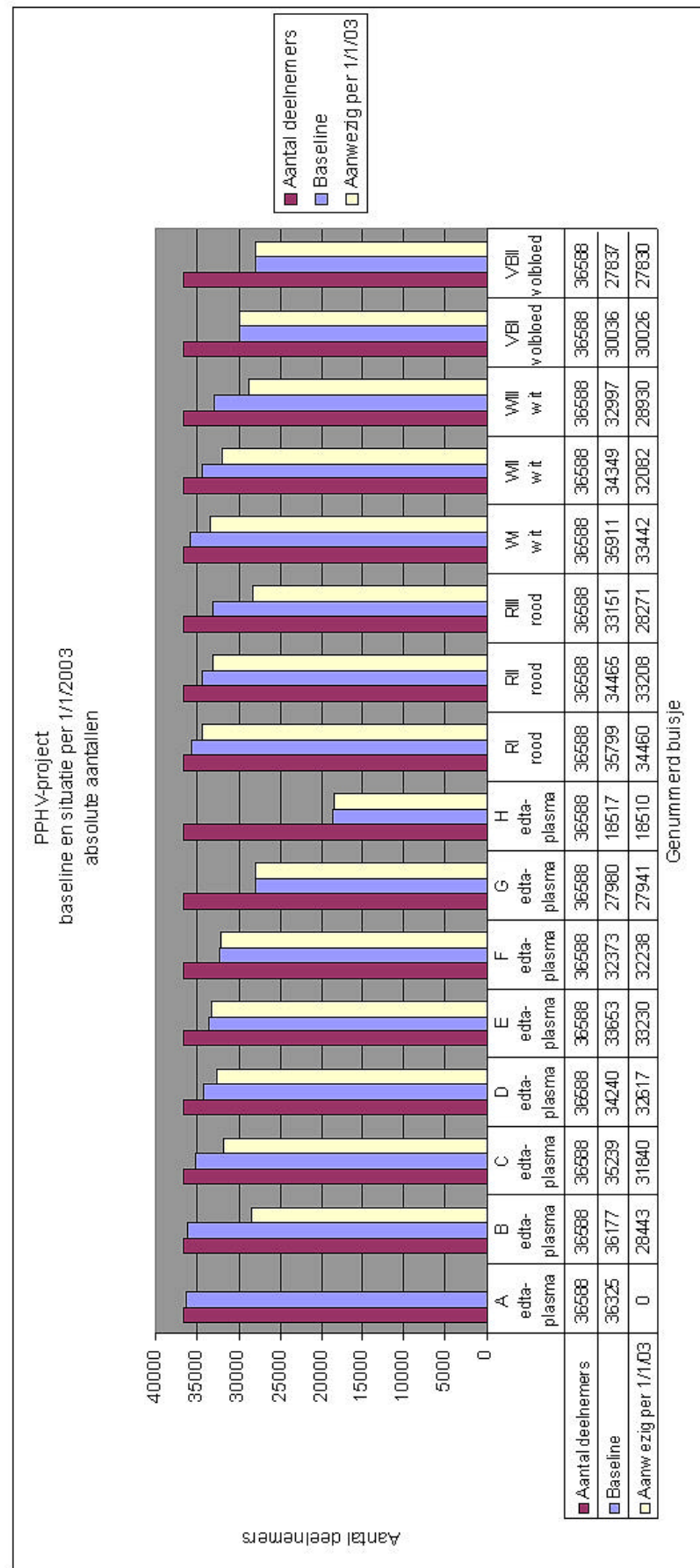
Beschermd cohort Overledenen

PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/200344

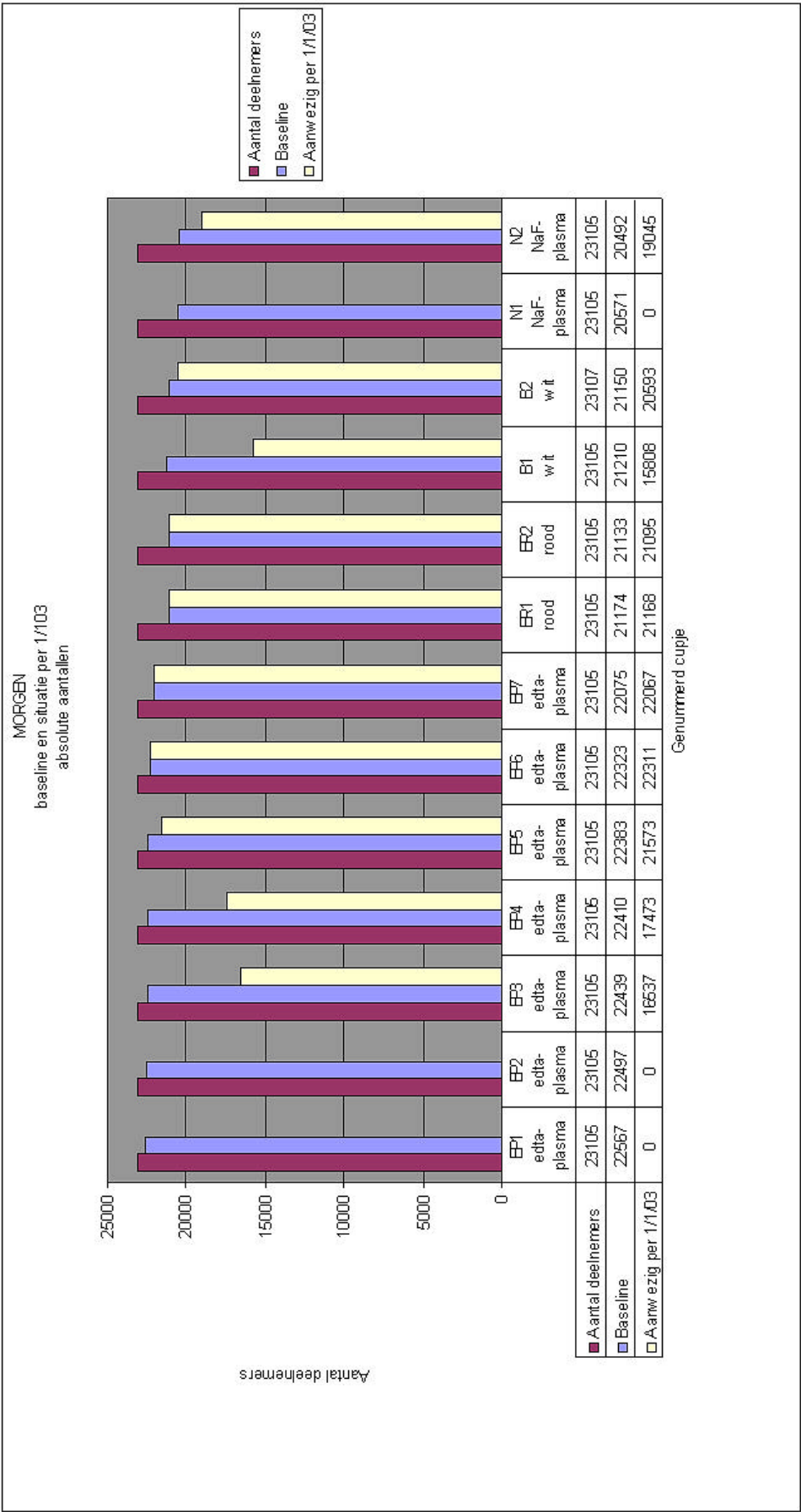
Figuur 12

Beschermd cohort Overledenen

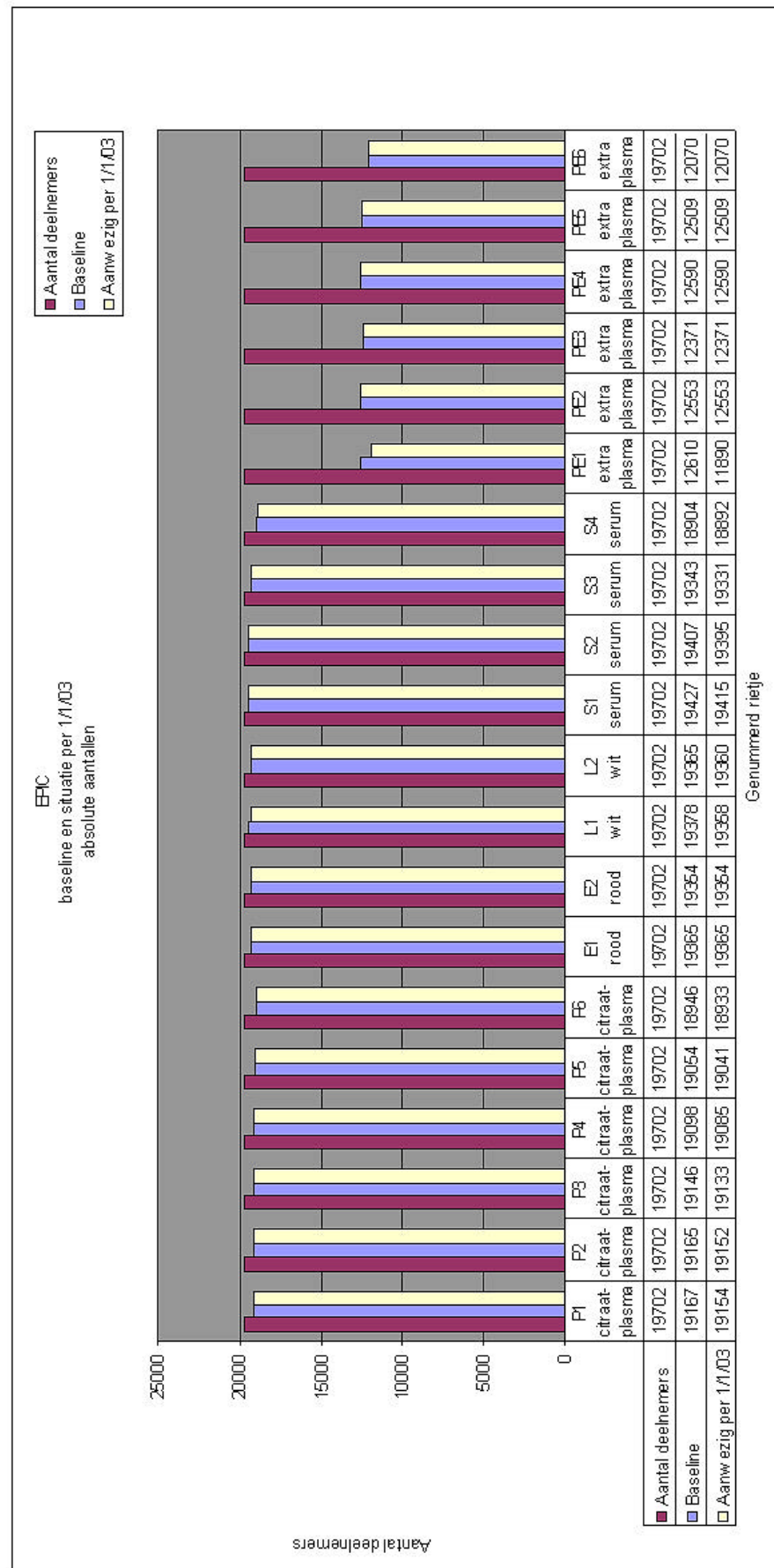
Morgen-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003..... 45



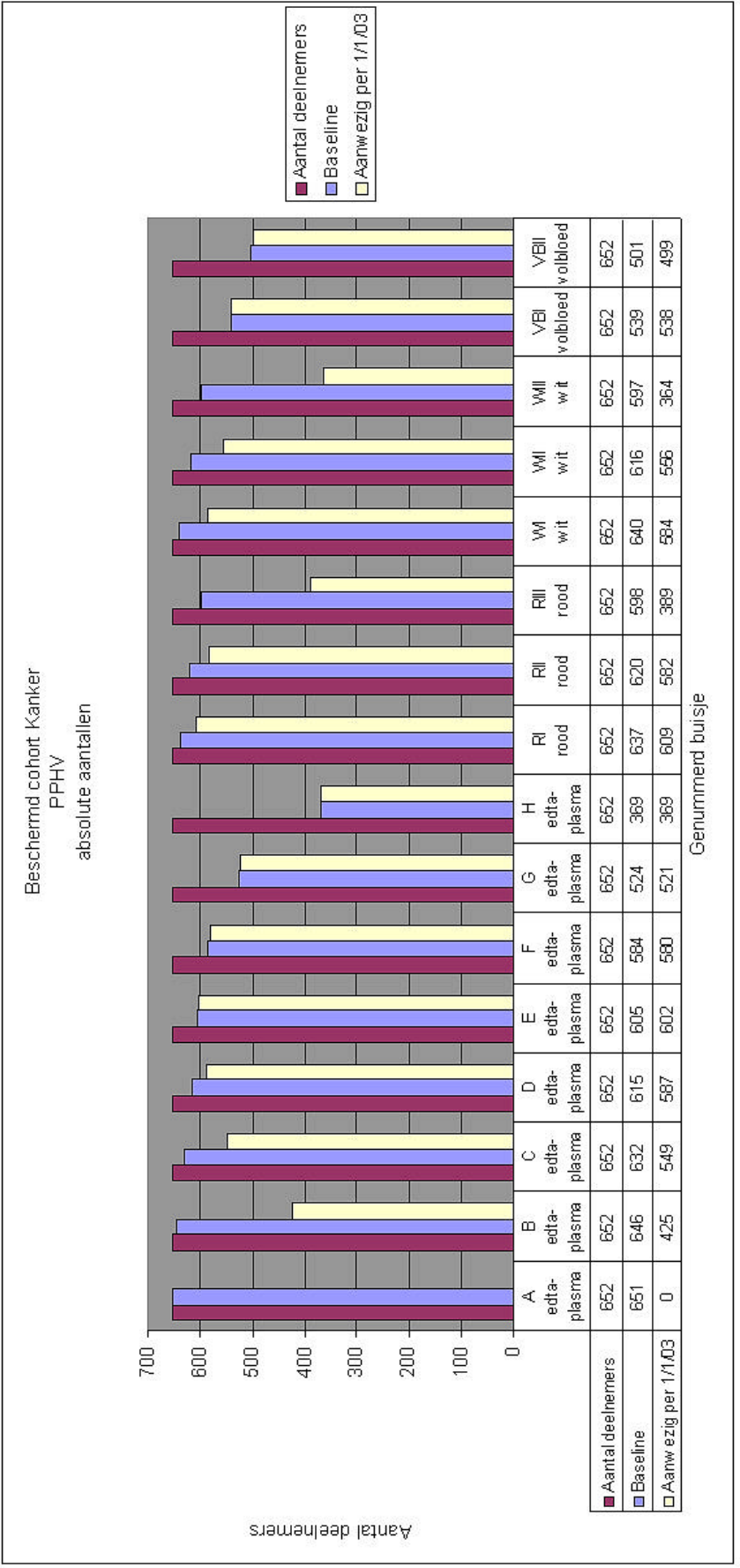
Figuur 1
PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



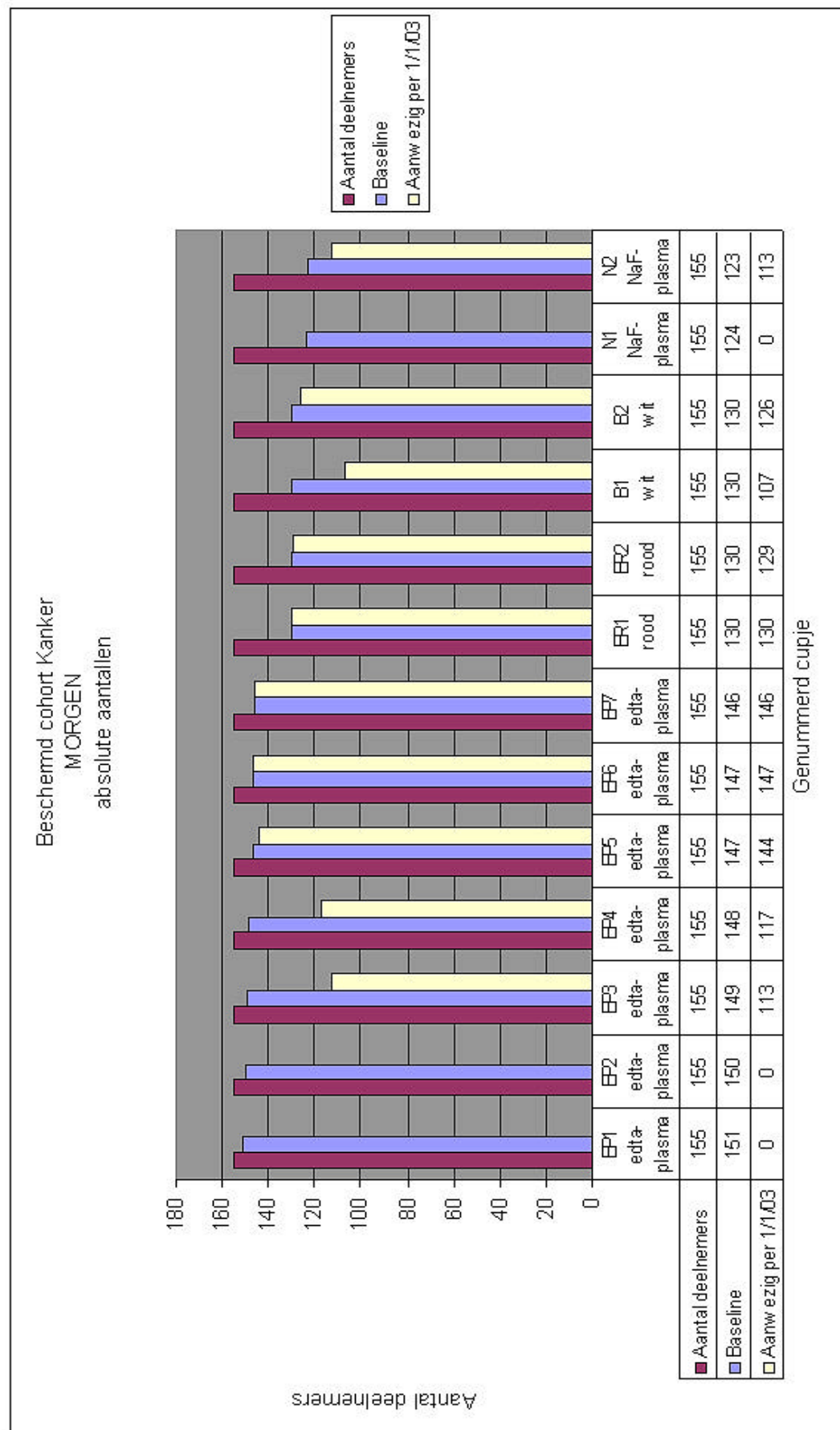
Figuur 2
Morgen-project: Absolute aantallen genummerde cupjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



Figuur 3
EPIC-project: Absolute aantallen genummerde rietjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



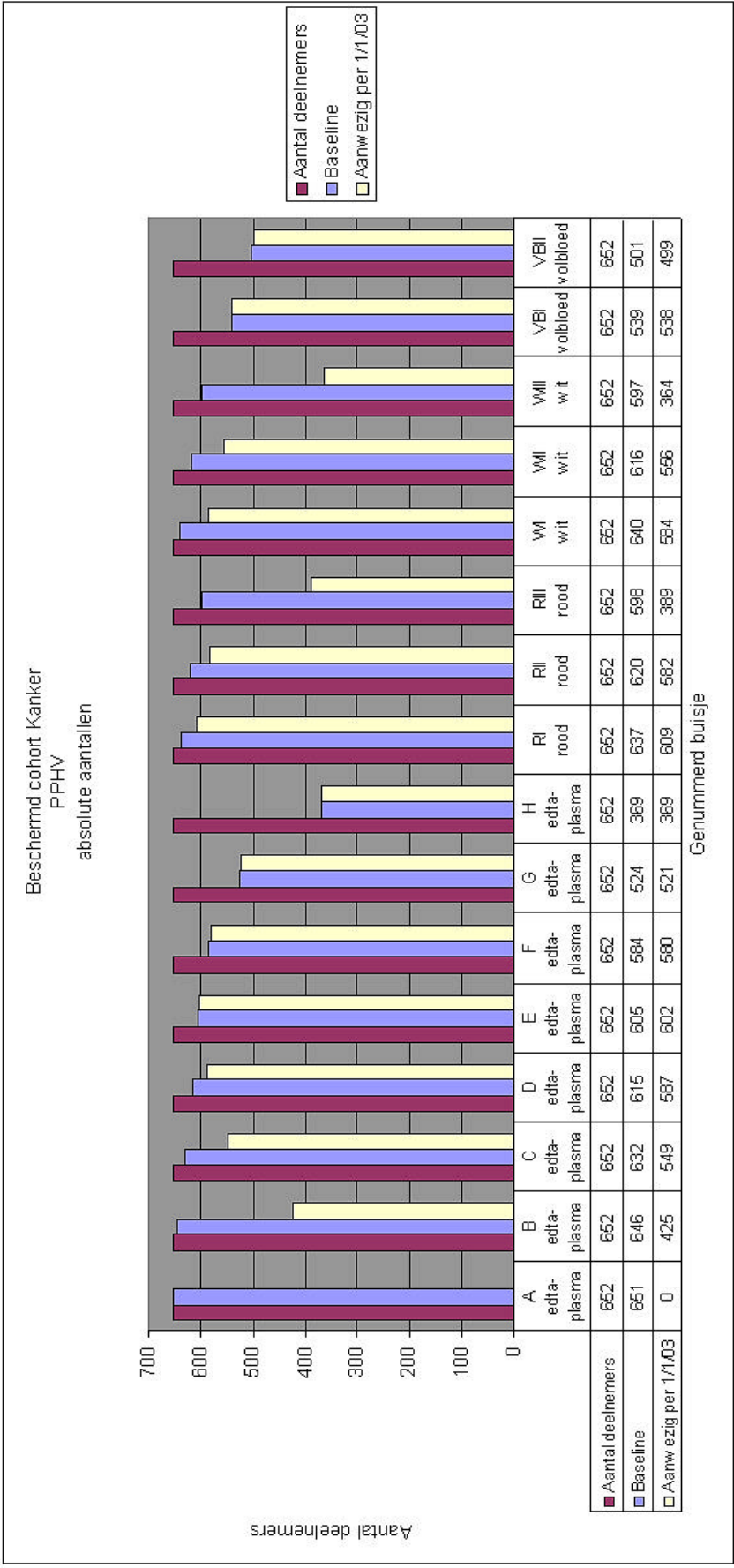
Figuur 4
Beschermd cohort CVZ
PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



Figuur 5

Beschemd cohort CVZ

Morgen-project: Absolute aantallen genummerde cupjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



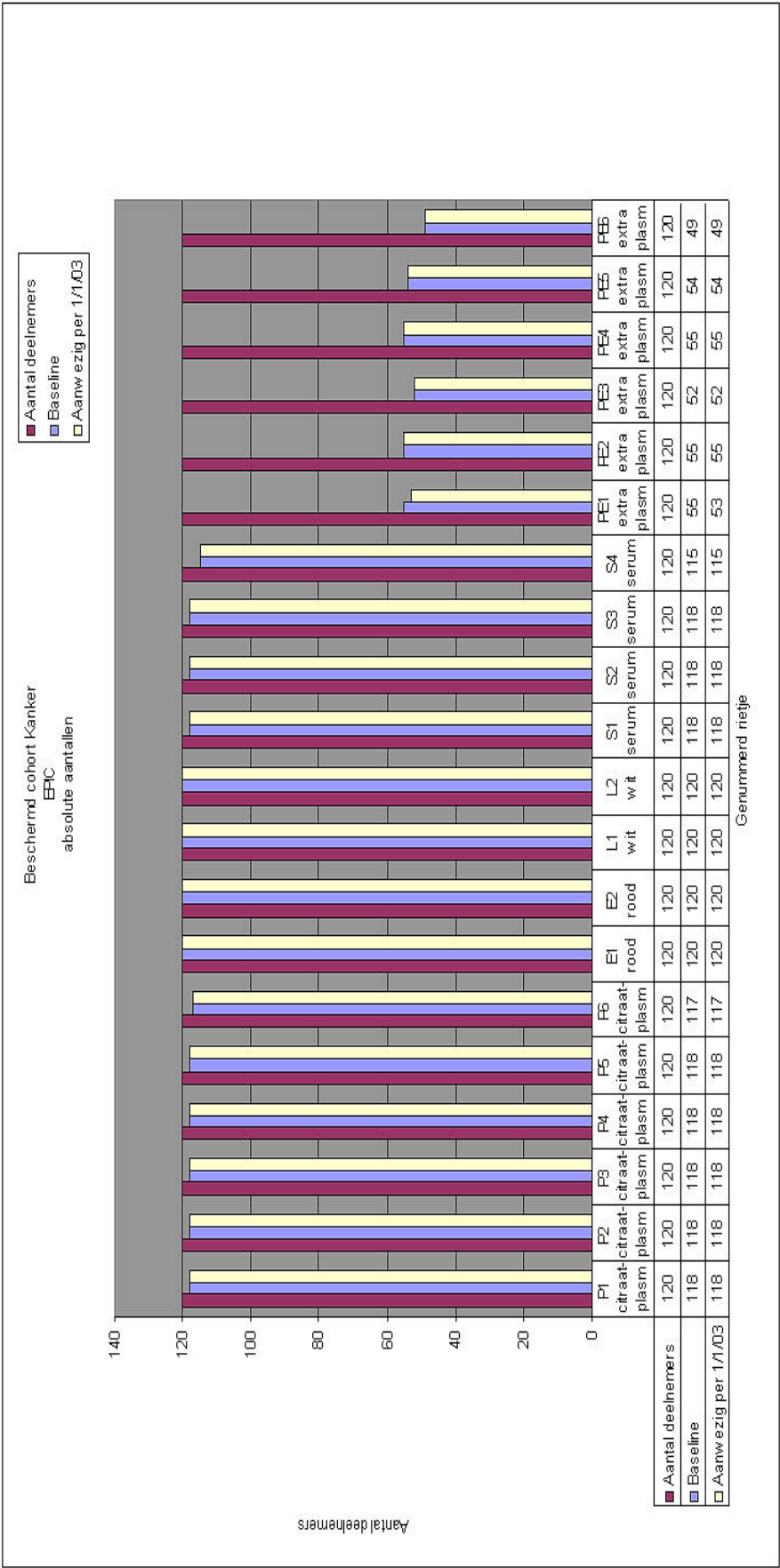
Figuur 6
Beschermd cohort Kanker
PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



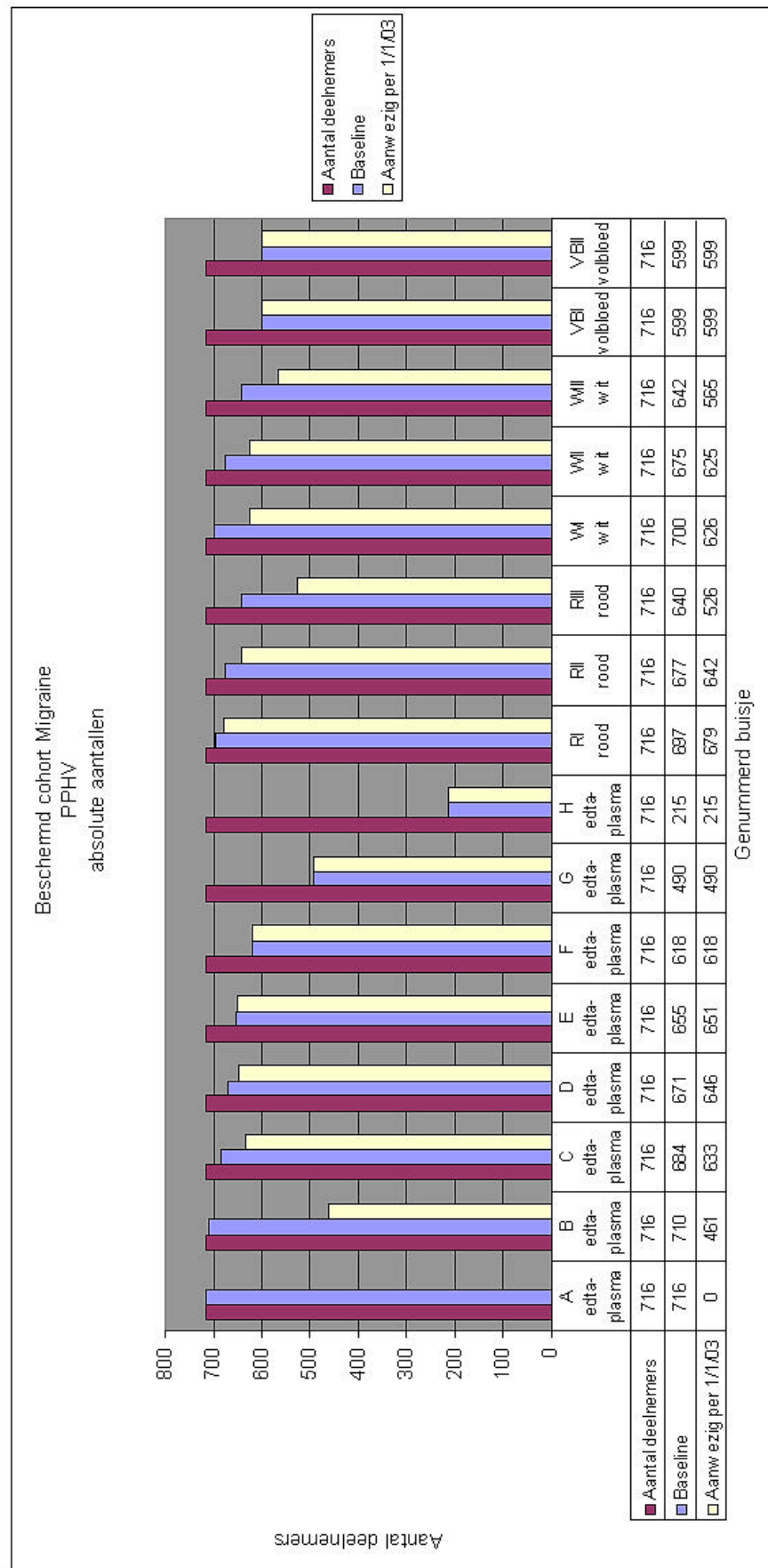
Figuur 7

Beschermd cohort Kanker

Morgen-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



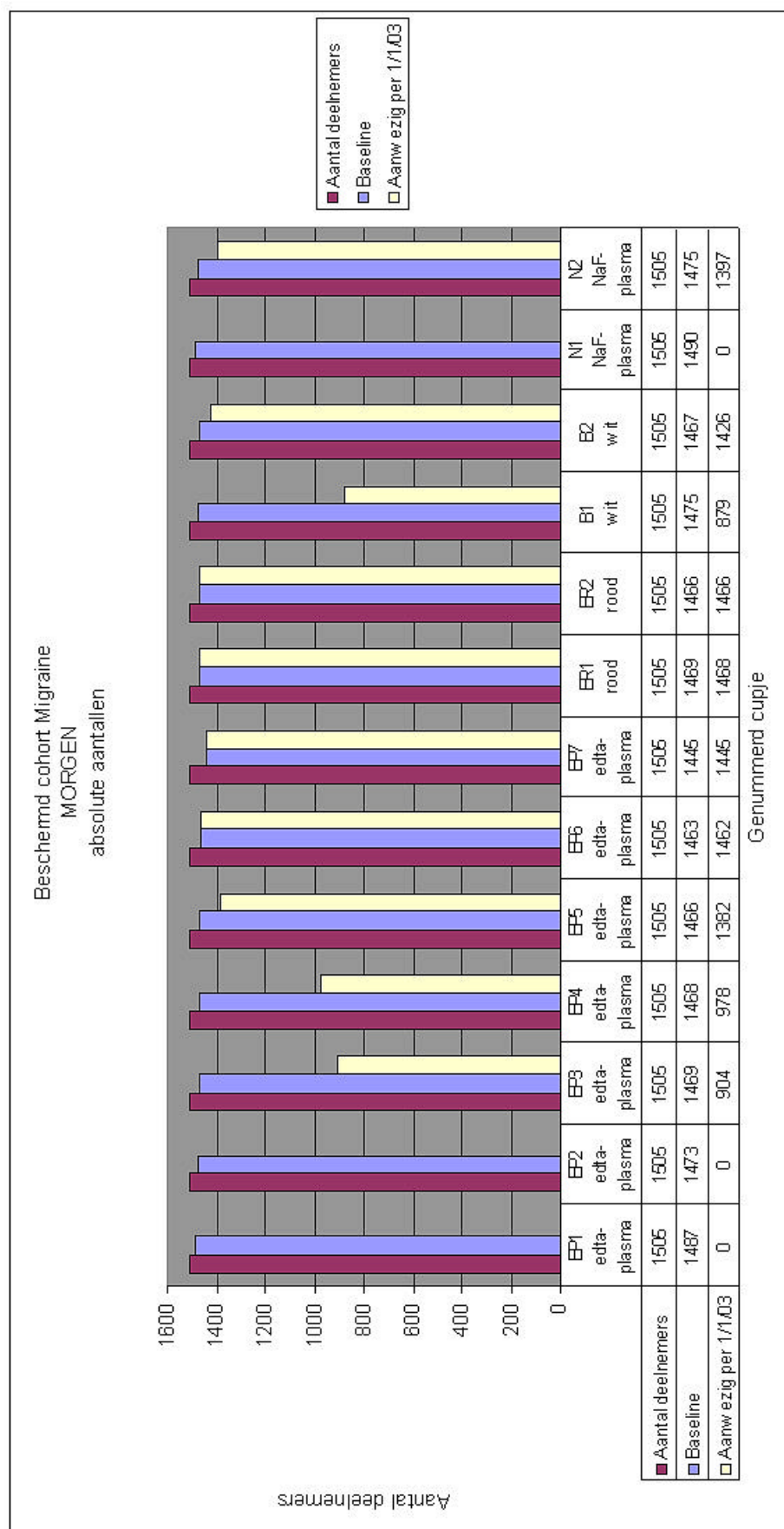
Figuur 8
Beschermd cohort Kanker
EPIC-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



Figuur 9

Beschermd cohort Migraine

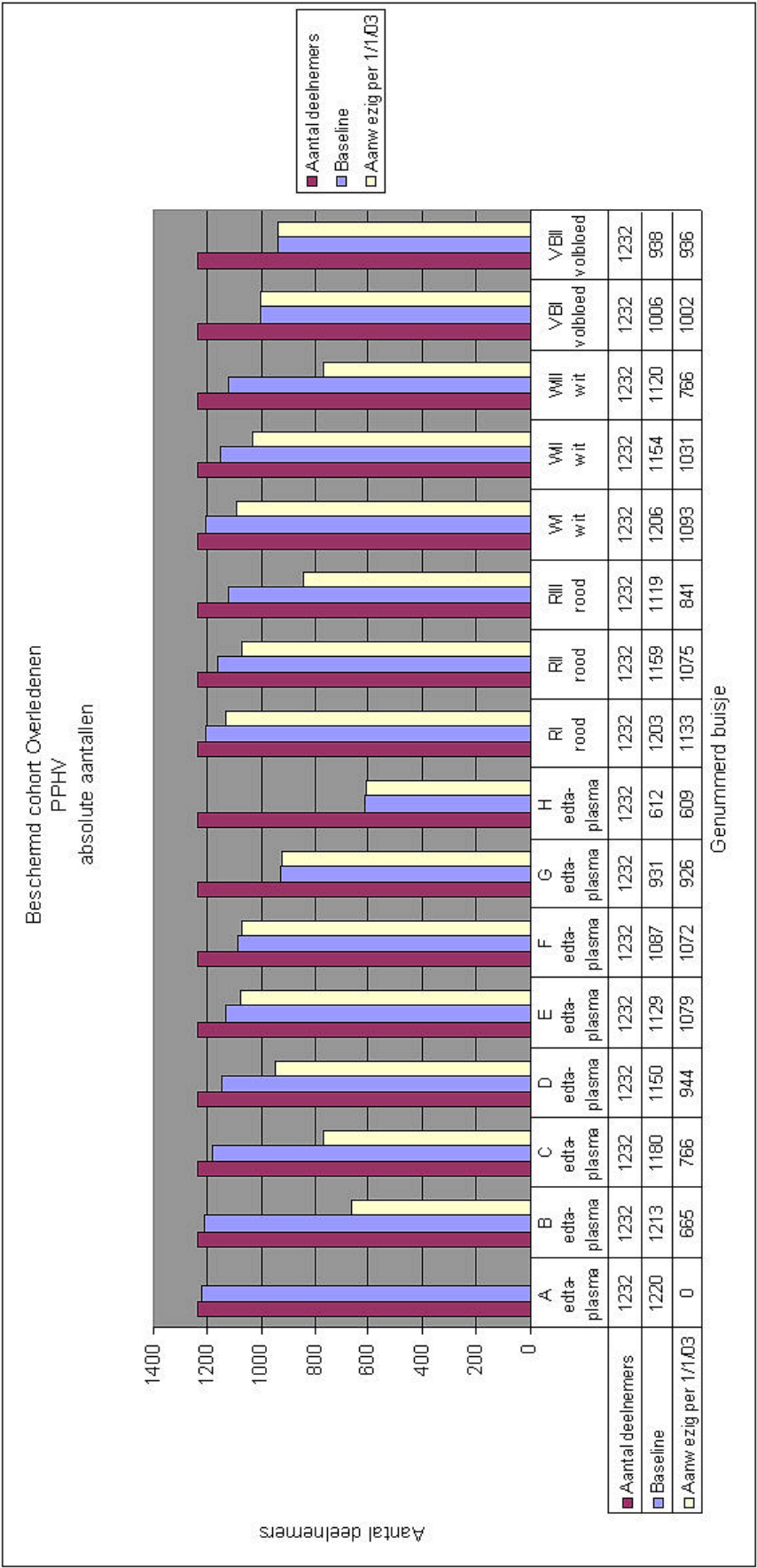
PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



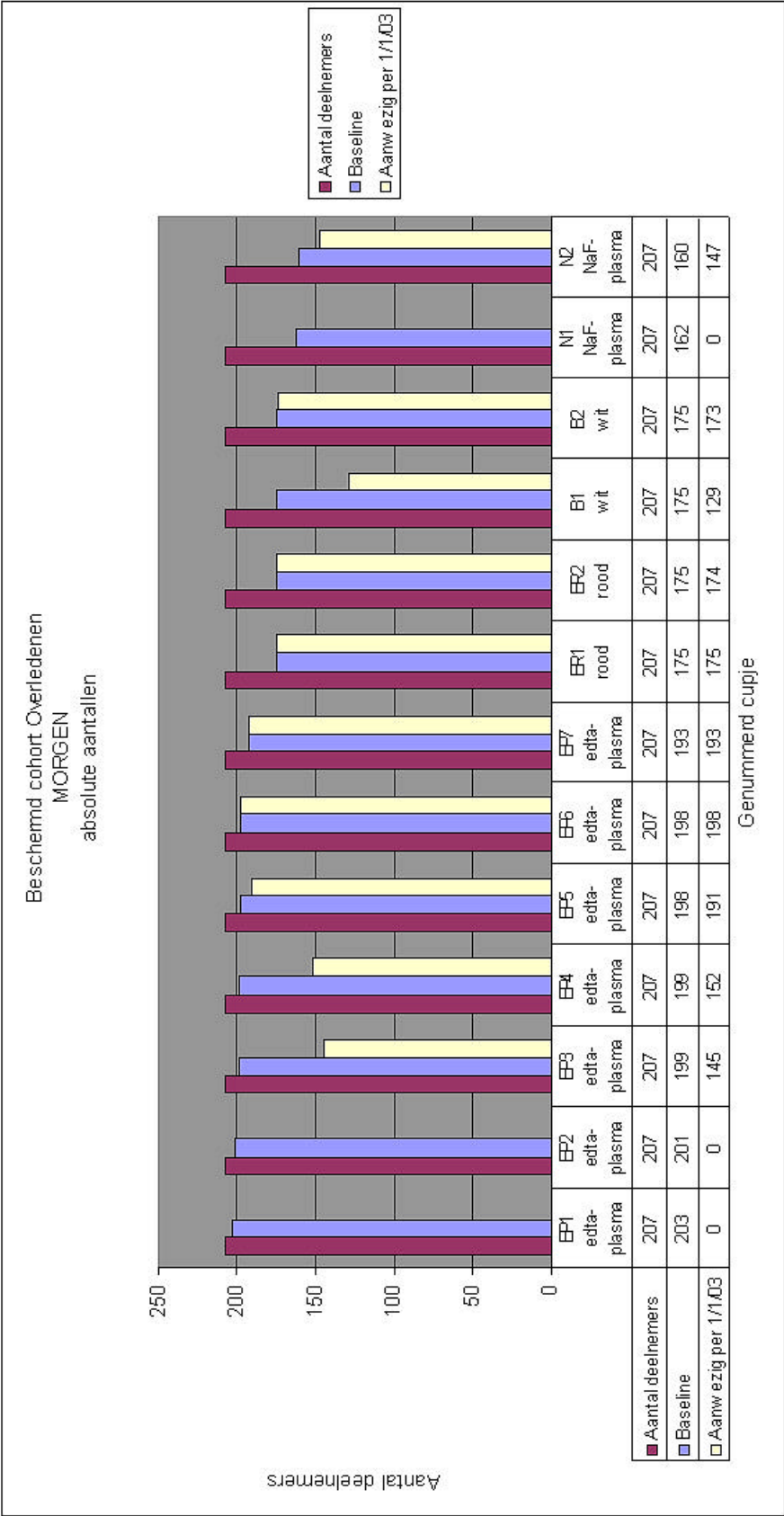
Figuur 10

Beschermd cohort Migraine

Morgen-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



Figuur 11
Beschermde cohort Overledenen
PPHV-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003



Figuur 12
Beschermd cohort Overledenen
Morgen-project: Absolute aantallen genummerde buisjes bloed aanwezig bij baseline en per 1/1/2003

Bijlage 3

Tabellen per project van de baselinegegevens en de huidige situatie

Tabel 1

Uitputting PPHV-bloed

Huidige aantal opgeslagen buisjes naar het oorspronkelijk aantal opgeslagen buisjes 48

Tabel 2

Uitputting Morgen-bloed

Huidige aantal opgeslagen buisjes naar het oorspronkelijk aantal opgeslagen buisjes 49

Tabel 3

Opgewerkt DNA

Aantal opgewerkte monsters DNA bij TOX op 1 maart 2003 50

Tabel 4

Opgewerkt DNA

Overzicht van de DNA-opbrengst en de op 1 maart 2003 nog aanwezige hoeveelheid DNA bij TOX.....51

Tabel 5

Opgewerkt DNA

Volgorde van te lichten bloedfracties voor het opwerken van DNA voor het PPHV- en Morgen-project met verwachte en gemiddelde DNA-opbrengst..... 52

Tabel 1

Uitputting PPHV-bloed

Huidige aantal opgeslagen buisjes naar het oorspronkelijk aantal opgeslagen buisjes

| # opmrs | | HuidigAanwezig | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | Eindtotaal |
|-----------------|----------------|----------------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|------------|
| Fractie | OorsprAanwezig | 0 | | | | | | | | 262 |
| plasma | | 262 | | | | | | | | 149 |
| | 1 | 149 | | | | | | | | 938 |
| | 2 | 100 | 838 | | | | | | | 999 |
| | 3 | 55 | 130 | 814 | | | | | | 587 |
| | 4 | 10 | 37 | 91 | 449 | | | | | 1280 |
| | 5 | 9 | 49 | 64 | 167 | 991 | | | | 4393 |
| | 6 | 9 | 25 | 138 | 274 | 573 | 3374 | | | 9464 |
| | 7 | 5 | 23 | 50 | 264 | 535 | 1430 | 7157 | | 18516 |
| | 8 | 4 | 3 | 13 | 78 | 354 | 941 | 3045 | 14078 | 36588 |
| Totaal plasma | | 603 | 1105 | 1170 | 1232 | 2453 | 5745 | 10202 | 14078 | 786 |
| rood | 0 | 786 | | | | | | | | 1305 |
| | 1 | 214 | 1091 | | | | | | | 1381 |
| | 2 | 25 | 198 | 1158 | | | | | | 33116 |
| | 3 | 539 | 572 | 4347 | 27658 | | | | | 36588 |
| Totaal rood | | 1564 | 1861 | 5505 | 27658 | | | | | 676 |
| wit | 0 | 676 | | | | | | | | 1559 |
| | 1 | 147 | 1412 | | | | | | | 1361 |
| | 2 | 41 | 73 | 1247 | | | | | | 32992 |
| | 3 | 1890 | 311 | 2303 | 28488 | | | | | 36588 |
| Totaal wit | | 2754 | 1796 | 3550 | 28488 | | | | | 6552 |
| volbloed | 0 | 6552 | | | | | | | | 2199 |
| | 1 | 1 | 2198 | | | | | | | 27837 |
| | 2 | 19 | 6 | 27812 | | | | | | 36588 |
| Totaal volbloed | | 6572 | 2204 | 27812 | | | | | | |

Tabel 2

Uitputting Morgen-bloed

Huidige aantal opgeslagen buisjes naar het oorspronkelijk aantal opgeslagen buisjes

| # opmrs | | HuidigAanwezig | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Eindtotaal |
|------------------------|----------------|----------------|-------|-------|------|------|-------|------------|
| Fractie | OorsprAanwezig | 0 | | | | | | 538 |
| EDTA-plasma | | 538 | | | | | | 70 |
| | 1 | 70 | | | | | | 58 |
| | 2 | 58 | | | | | | 29 |
| | 3 | 4 | 25 | | | | | 27 |
| | 4 | 2 | 3 | 22 | | | | 60 |
| | 5 | | 2 | 12 | 46 | | | 248 |
| | 6 | | 9 | 62 | 20 | 157 | | 22075 |
| Totaal EDTA-plasma | 7 | 1 | 11 | 792 | 4055 | 936 | 16280 | 23105 |
| NaF-plasma | | 673 | 50 | 888 | 4121 | 1093 | 16280 | 2529 |
| | 0 | 2529 | | | | | | 89 |
| | 1 | 89 | | | | | | 20487 |
| Totaal NaF-plasma rood | 2 | 1442 | 19045 | | | | | 23105 |
| | | 4060 | 19045 | | | | | 1931 |
| | 0 | 1931 | | | | | | 41 |
| | 1 | | 41 | | | | | 21133 |
| Totaal rood wit | 2 | 1 | 42 | 21090 | | | | 23105 |
| | | 1932 | 83 | 21090 | | | | 1895 |
| | 0 | 1895 | | | | | | 62 |
| | 1 | 35 | 27 | | | | | 21148 |
| Totaal wit | 2 | 274 | 5374 | 15500 | | | | 23105 |
| | | 2204 | 5401 | 15500 | | | | |

Tabel 3

Opgewerkt DNA

Aantal opgewerkte monsters DNA bij TOX op 1 maart 2003^{xxx}

| DNA opgewerkt voor PPHV- en Morgenproject | # oproep- nummers (opnrs) | Totaal # monsters opgewerkt | Aantal monsters per oproepnummer dat moest worden opgewerkt om voldoende DNA te krijgen | | | | | | | |
|---|---------------------------------|-----------------------------------|---|-----------------|------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | 1 | 2 ¹⁾ | 3 | 4 | 5 | 6 ²⁾ | 7 ³⁾ | 8 ³⁾ |
| Amsterdam | | | | | | | | | | |
| Opgewerkt (#) | 1671 | 2181 | 1405 | 117 | 95 | 30 | 7 | 17 | | |
| % van #opnrs | | 130,5 | 84,1 | 7,0 | 5,7 | 1,8 | 0,4 | 1,0 | | |
| Geen DNA of DNA op ⁴⁾ | | 130 | | | | | | | | |
| DNA aanwezig | | 2051 | | | | | | | | |
| % DNA aanwezig | | 93,7 | | | | | | | | |
| Doetinchem | | | | | | | | | | |
| Opgewerkt (#) | 2949 | 4259 | 2183 | 375 | 308 | 51 | 16 | 16 | 2 | 1 |
| % van #opnrs | | 144,4 | 74,0 | 12,7 | 10,4 | 1,7 | 0,5 | 0,5 | 0,1 | 0,0 |
| Geen DNA of DNA op ⁴⁾ | | 448 | | | | | | | | |
| DNA aanwezig | | 3811 | | | | | | | | |
| % DNA aanwezig | | 88,2 | | | | | | | | |
| Maastricht | | | | | | | | | | |
| Opgewerkt (#) | 7921 | 10585 | 6035 | 1318 | 441 | 84 | 24 | 19 | 3 | |
| % van #opnrs | | 133,6 | 76,2 | 16,6 | 5,6 | 1,1 | 0,3 | 0,2 | 0,0 | |
| Geen DNA of DNA op ⁴⁾ | | 804 | | | | | | | | |
| DNA aanwezig | | 9781 | | | | | | | | |
| % DNA aanwezig | | 91,8 | | | | | | | | |
| Totaal | | | | | | | | | | |
| Opgewerkt (#) | 12541 | 17025 | 9623 | 1810 | 844 | 165 | 47 | 52 | 5 | 1 |
| % van #opnrs | | 135,8 | 76,7 | 14,4 | 6,7 | 1,3 | 0,4 | 0,4 | 0,0 | 0,0 |
| Geen DNA of DNA op ⁴⁾ | | 1382 | | | | | | | | |
| DNA aanwezig | | 15643 | | | | | | | | |
| % DNA aanwezig | | 91,2 | | | | | | | | |
| Totaal zijn er 738 monsters niet bij TOX opgewerkt, maar bij het AMC en UMC | | | | | | | | | | |

1) van de Morgen studie zijn er slechts 2 buffycoats aanwezig

2) van 6 nummers per stad zijn alle 6 monsters opgewerkt om het optimale DNA isolatie protocol uit te zoeken

3) van de Peilstation studie zijn 3 rode en 3 witte monsters per nummer aanwezig, maar in sommige gevallen is ook het volbloedmonster opgewerkt

4) Geen DNA betekent dat er na de DNA opwerking geen DNA aanwezig was, DNA op betekent dat van dit monster geen DNA meer aanwezig is.

^{xxx} De kosten voor het opwerken van DNA worden op dit moment geraamd op 40 euro per monster.

Tabel 4

Opgewerkt DNA

Overzicht van de DNA-opbrengst en de op 1 maart 2003 nog aanwezige hoeveelheid DNA bij TOX

| Hoeveelheid DNA | PPHV en Morgen | | | | Opbrengst | | | | Morgen in % | | Nog aanwezig | |
|-----------------|----------------|--|--------------|--|-----------|------------|------------|------------|-------------|------------|--------------|--------------|
| | # monsters | | % van totaal | | PPHV in % | | Maastricht | | Doetinchem | | Maastricht | |
| | | | | | Amsterdam | Doetinchem | Amsterdam | Doetinchem | Amsterdam | Doetinchem | Amsterdam | % van totaal |
| < 1 ug | 1075 | | 6,9 | | 4,7 | 9,2 | 9,2 | 3,9 | 11,1 | 3,2 | 1315 | 8,4 |
| 1-5 ug | 1376 | | 8,8 | | 7,4 | 9,3 | 10,3 | 1,8 | 14,4 | 7,2 | 1802 | 11,5 |
| 5-10 ug | 1507 | | 9,6 | | 6,7 | 10,0 | 9,3 | 4,8 | 17,0 | 10,0 | 1593 | 10,2 |
| 10-20 ug | 3088 | | 19,7 | | 11,6 | 17,0 | 17,6 | 25,6 | 29,9 | 24,2 | 3013 | 19,2 |
| 20-30 ug | 2596 | | 16,6 | | 12,3 | 13,9 | 14,6 | 19,3 | 15,6 | 22,1 | 2395 | 15,3 |
| 30-40 ug | 1867 | | 11,9 | | 10,3 | 11,1 | 10,9 | 19,6 | 7,1 | 14,6 | 1710 | 10,9 |
| 40-50 ug | 1195 | | 7,6 | | 7,9 | 8,3 | 7,1 | 9,5 | 3,0 | 8,0 | 1052 | 6,7 |
| 50-100 ug | 2431 | | 15,5 | | 30,2 | 18,4 | 17,1 | 12,5 | 1,5 | 9,6 | 2306 | 14,7 |
| 100-200 ug | 533 | | 3,4 | | 8,5 | 2,8 | 3,9 | 2,4 | 0,3 | 1,0 | 454 | 2,9 |
| > 200 ug | 12 | | 0,1 | | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,1 | 12 | 0,1 |
| Totaal | 15680 | | 100,0 | | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 15652 | 100,0 |
| Gemiddeld in ug | | | 30,6 ug | | 46,9 ug | 31,1 ug | 31,1 ug | 32,8 ug | 15,0 ug | 26,3 ug | | 28,6 ug |

Tabel 5

Opgewerkt DNA

Volgorde van te lichten bloedfracties voor het opwerken van DNA voor het PPHV- en Morgen-project met verwachte en gemiddelde DNA-opbrengst

| Studie | Stad | Jaar | Aanbevolen bloedfractie voor een 1e lichting | Verwacht % monsters met een DNA opbrengst < 1 ug | Gem. opbrengst | Aanbevolen bloedfractie voor een 2e lichting |
|-------------|------------|-------------|--|--|----------------|--|
| Peilstation | Amsterdam | 1987-1991 | Buffy coat | < 5% | > 30 µg | Buffy coat |
| | Doetinchem | 1987-1989 | Buffy coat of Ery fractie | 15 - 25% | 20-25 µg | Andere fractie |
| | | 1990, 1991 | Ery fractie | < 5% | 30 µg | Buffy coat |
| MORGEN | Maastricht | 1987 | Buffy coat | 25 - 30% | 30 µg | Ery fractie |
| | | 1988 - 1990 | Ery fractie | 10 - 20% | 30 µg | Buffy coat |
| | | 1991 | Ery fractie | < 5% | 30 µg | Buffy coat |
| | Amsterdam | 1993 - 1997 | Buffy coat | < 5% | > 25 µg | Buffy coat |
| | Doetinchem | 1993 - 1996 | Peilstation of Buffy coat | 15 - 25% | 15 µg | Peilstation |
| | | 1997 | Buffy coat | 5% | 15 µg | Buffy coat |
| | Maastricht | 1993 - 1997 | Buffy coat | 3 - 7% | 25 µg | Buffy coat |

Bijlage 4

Overzicht per project van het lichaamsmateriaal dat is afgenomen en opgeslagen^{xxxi}

PPHV-project (1987-1991):

- Afgenomen: 3 x 10 ml bloed in EDTA-buis.
- Bewaard na overpipetteren in buisjes⁸

| Fractie | Monster | Kleur etiket | Volume | Opslagtemp | Bijzonderheden |
|---------------------|---------|--------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| Volbloed | VBI | oranje | 1,5 ml | -30 °C | |
| | VBII | oranje | 1,5 ml | -30 °C | |
| Plasma | A | geel | 1,5 ml | | CKCL ^{xxxii} |
| | B | geel | 1,5 ml | -30 °C | |
| | C | geel | 1,5 ml | -30 °C | |
| | D | blauw | 1,5 ml | -30 °C | |
| | E | blauw | 1,5 ml | -30 °C | |
| | F | blauw | 1,5 ml | -30 °C | |
| | G | groen | 1,5 ml | -30 °C | |
| | H | groen | 1,5 ml | -30 °C | |
| Witte cellen | WI | wit | 1,5 ml in 4 ml buisje | -30 °C | |
| | WII | wit | 1,5 ml in 4 ml buisje | -30 °C | |
| | WIII | wit | 1,5 ml in 4 ml buisje | -30 °C | |
| Rode cellen | RI | rood | 1,5 ml in 4 ml buisje | -30 °C | |
| | RII | rood | 1,5 ml in 4 ml buisje | -30 °C | |
| | RIII | rood | 1,5 ml in 4 ml buisje | -30 °C | |

MORGEN/EPIC (1993-1997):

- Afgenomen (zie Bijlage 6):

| | Volume | Soort | Kleur dop | Bepaling | Project | Afgenomen vanaf |
|----|--------|---------------------------|-----------|-------------|---------|--|
| 1. | 2,7 ml | NaF-plasmabuis | Geel | glucose | MORGEN | A'dam en Doet: 10/5/93; Maastricht: 1/6/93 |
| 2. | 10 ml | Kalium(K)-EDTA-plasmabuis | Rood | cholesterol | MORGEN | 1/4/93 |
| 3. | 1,2 ml | K-EDTA-plasmabuis | Rood | bloedbeeld | EPIC | 22/5/95 |
| 4. | 10 ml | Serumbuis (stolbuis) | Wit | | EPIC | 1/4/93: 9 ml buis met korrels 28/3/94: zonder korrels 16/12/94: 10 ml buis |
| 5. | 10 ml | citraat-plasmabuis | Groen | | EPIC | zie NaF-plasma |
| 6. | 10 ml | citraat-plasmabuis | Groen | | EPIC | zie NaF-plasma |

^{xxxi} De locaties waar deze monsters zijn opgeslagen zijn bekend bij de databeheerder van het biobank.

^{xxxii} CKCL: Afdeling Klinische Chemie & Lipiden Referentie Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt. Dit laboratorium heeft de cholesterol- en glucosewaarden bepaald in het bloed van de deelnemers; de cupjes zijn geheel gebruikt voor de bepalingen.

• Bewaard na overpipetteren voor MORGEN in cupjes^{xxxiii}:

| | Fractie | Monster | Volume | Kleur dop | Opslagtemp | Bijzonderheden |
|----------|-------------|---------|--------|-----------|------------|--------------------|
| ad 1.NaF | Plasma | N1 | 0,5 ml | geel | | CKCL; platte bodem |
| | | N2 | 0,5 ml | geel | -30 °C | reserve CKCL |
| ad 2. | Plasma | EP1 | 0,5 ml | rood | | CKCL; platte bodem |
| K-EDTA | | EP2 | 0,5 ml | rood | | CKCL; platte bodem |
| | | EP3 | 0,5 ml | rood | -86 °C | reserve CKCL |
| | | EP4 | 0,5 ml | rood | -86 °C | |
| | | EP5 | 0,5 ml | rood | -86 °C | voor alle -86°C: |
| | | EP6 | 0,5 ml | rood | -86 °C | wanneer van |
| | | EP7 | 0,5 ml | rood | -86 °C | -20°C naar -86 |
| | Leucocyten | B1 | 0,5 ml | blauw | -30 °C | °Covergebracht? |
| | | B2 | 0,5 ml | blauw | -30 °C | |
| | Erytrocyten | ER1 | 0,5 ml | groen | -86 °C | |
| | | ER2 | 0,5 ml | groen | -30 °C | |

• Bewaard in Nederland^{xxxiv} na overpipetteren voor EPIC in rietjes^{xxxv 2}:

| | Fractie | Monster | Volume | Kleur hoesje | Opslagtemp. | Bijzonderheden |
|------------|------------------------------|---------|--------|---------------|-------------|----------------|
| Ad 4. | Serum | 1 | 0,5 ml | geel | -196 °C | |
| Serum | | 2 | 0,5 ml | geel | -196 °C | |
| | | 3 | 0,5 ml | geel | -196 °C | |
| | | 4 | 0,5 ml | geel | -196 °C | |
| | Bloedklont | 51C... | | oranje krat | -20 °C | v.a. 3/1/95 |
| Ad 5.en 6. | Plasma | 1 | 0,5 ml | rood | -196 °C | |
| citraat- | | 2 | 0,5 ml | rood | -196 °C | |
| Plasma | | 3 | 0,5 ml | rood | -196 °C | |
| | | 4 | 0,5 ml | rood | -196 °C | |
| | | 5 | 0,5 ml | rood | -196 °C | |
| | | 6 | 0,5 ml | rood | -196 °C | |
| | Leucocyten | 1 | 0,5 ml | blauw | -196 °C | |
| | | 2 | 0,5 ml | blauw | -196 °C | |
| | Erytrocyten | 1 | 0,5 ml | groen | -196 °C | |
| | | 2 | 0,5 ml | groen | -196 °C | |
| | Extra plasma | 1 | 0,5 ml | oranje of wit | -196 °C | |
| | even: wit | 2 | 0,5 ml | oranje of wit | -196 °C | |
| | oneven: oranje | 3 | 0,5 ml | oranje of wit | -196 °C | |
| | | 4 | 0,5 ml | oranje of wit | -196 °C | |
| | | 5 | 0,5 ml | oranje of wit | -196 °C | |
| | | 6 | 0,5 ml | oranje of wit | -196 °C | |
| | Spoelrietje ^{xxxvi} | | | | -196 °C | v.a. 1993 |

^{xxxiii} Jantine Steenbrink; *Protocol voor het lichten van bloeddoozjes/-cupjes uit de -86 °C vrieskasten en de -20 °C vriescel, MORGEN-project*; RIVM; 23 mei 1996

^{xxxiv} Van elke deelnemer zijn ook 4 rietjes serum, 6 rietjes plasma, 2 rietjes leucocyten, en 2 rietjes erytrocyten opgeslagen bij het IARC in Lyon.

^{xxxv} H.B. Bueno de Mesquita; *Guidelines for use of the EPIC biobank, The Netherlands, 1993-1997*; 13 mei 1996

^{xxxvi} Het rietje gebruikt tussen het pipetteren van het serum en het plasma om de afzuigcanule van de rietjesmachine te spoelen. Deze rietjes zijn opgeslagen zonder identificerende gegevens; alleen de afnamedatum is bewaard.

Bijlage 5

Protocol bloedverwerking van het PPHV-project^{xxxvii}

Protocol voor 1987 t/m 1990

Venapunctie

Voor dit onderdeel werkt men met oproepnummers in verband met het opbergen van de monsters. Dit zijn de nummers die met een 4 beginnen. Van elke deelnemer worden 3 buisjes bloed van 10 ml afgenomen uit de vena.

Wanneer er minder dan 3 buizen zijn afgenomen dan maakt de medewerker géén vol bloed monsters. Men gebruikt vacutainer buizen gevuld met EDTA (buisen met paarse dop).

- De met bloed gevulde en afgesloten buizen worden nadat zij voorzien zijn van het oproepnummer 5 maal gezwenkt d.w.z. op de kop houden en weer terug. De EDTA buizen blijven in de onderzoeksruijnte staan en worden niet in de koelkast geplaatst. Omstreeks 12 uur, nadat deelnemer 7 is geprikt, en om 15 uur wordt het bloed naar het laboratorium gebracht. De etiketten van de betreffende personen worden bij de buizen gevoegd.

Bloedafwerking

- Uit één van de buizen wordt na 5 maal zwenken m.b.v. een pipet bloed opge-zogen en in porties van 1,5 ml in 2 kleine plastic buisjes gedaan. Zij worden van het oproepnummer van de deelnemer voorzien en in de koelkast geplaatst.
- De 3 EDTA buizen: het restant van het bloed en de 2 volle EDTA buizen worden in de centrifuge geplaatst en gedurende 10 minuten afgedraaid. (NB. let er bij de plaatsing van de buizen in de centrifuge op dat de half gevulde buizen tegenover elkaar staan!)
- De doppen worden er afgehaald en het plasma (de bovenstaande vloeistof) van de drie buizen wordt m.b.v. een pipet overgebracht in een grote buis, voorzien van oproepnummer. NB. let er op dat nog een dun laagje plasma boven de cellaag achterblijft.
- Het plasma in de grote buis wordt gemengd door 5x te zwenken en daarna in porties van 1,5 ml overgepipetteerd in plastic buisjes **van 2 ml**. Op elk buisje komt een etiket met het oproepnummer van de deelnemer. De plastic buisjes worden in verzameldoosjes geplaatst en wel zodanig dat van elke deelnemer één buisje per verzameldoosje zit. De doosjes dragen een letter van de serie waartoe zij behoren (serie A t/m H). Zowel op het deksel als op de voorkant van het doosje wordt een etiket -geel voor serie A, B, C, blauw voor serie D, E, F en groen voor overige series- geplakt waarop de serie letter en het eerste oproepnummer staat genoteerd. Elk doosje heeft (10x10) 100 plaatsen. De oproepnummers **400.001-400.100** komen in één doosje. De plaatsen bestemd voor opgeroepen die niet aan het onderzoek deelnemen, blijven open. De nummering begint steeds **links boven**, de oproepnummers 400.001-400.010 komen op de **bovenste horizontale rij**. De volgende horizontale rij is bestemd voor de oproepnummers 400.011-400.020 etc. Door deze wijze van opbergen is het niet nodig een plattegrond te maken. De volgorde van het alfabet wordt aangehouden bij het opruimen van de buisjes. Zijn er bijvoorbeeld 7 buisjes met plasma van deelnemer 400.064 dan komen zij, steeds op dezelfde plaats, 6e rij, plaats 4 te staan in de doosjes van serie A, B, C, D, E, F en G. Het

^{xxxvii} Bijlage D uit het draaiboek van het Project Preventie Hart- en Vaatziekten voor de locatie Amsterdam, januari 1987.

aantal buisjes dat van een bepaalde deelnemer aanwezig is, schrijft men op het ponsconcept peilstation. De doosjes van serie A t/m H worden ingevroren bij -20 °C.

- Van de drie buizen waaruit het plasma is verwijderd wordt het dunne laagje plasma en de bovenste cellaag (1,5 ml), die o.a. de witte cellen bevat, overgepipetteerd in een plastic buisje **van 2 ml**. Deze 3 buisjes krijgen het oproepnummer opgeplakt.
- Deze buisjes worden in de kartonnen doosjes van serie WI, WII en WIII geplaatst, op hun eigen plaats. Het aantal buisjes met witte cellen noteert men op het ponsconcept peilstation. Zowel op deksel als op voorkant plakt men een wit etiket met de serie aanduiding en het eerste oproepnummer. De doosjes van serie WI, WII en WIII worden ingevroren bij -20 °C.
- Uit de drie buizen waaruit de bovenste cellaag is verwijderd, worden per buis porties van 1,5 ml, die o.a. rode cellen bevat, overgepipetteerd in de kleine plastic buisjes. De buisjes worden voorzien van oproepnummer en in verzameldoosjes van de serie RI, RII en RIII geplaatst. Op het ponsconcept peilstation schrijft men het aantal buisjes met rode cellen. Zowel op deksel als op voorkant plakt men een rood etiket met de serie aanduiding en het eerste oproepnummer. De doosjes van serie RI, RII en RIII worden ingevroren bij -20 °C.
- De 2 kleine buisjes met vol bloed worden **uit de koelkast gehaald** en op hun eigen plaats in de verzameldoosjes van de serie VBI en VBII gedaan. Men schrijft het aantal buisjes vol bloed op het ponsconcept peilstation. Zowel op het deksel als op de voorkant plakt men een oranje etiket met de serie aanduiding en het eerste oproepnummer. De doosjes van serie VBI en VBII worden ingevroren bij -20 °C.

Verzending van de buisjes

Een keer per 3 weken -op maandag- komt een medewerker langs om o.a. de bloedmonsters op te halen, die naar Dr. Boerma en naar Leiden worden gebracht. De oproepnummers van alle buisjes die naar Dr. Boerma worden gebracht, schrijft men op een lijst (bijlage H). De lijst stelt men samen op de vrijdag voorafgaande aan de maandag dat het bloed wordt gehaald. Voor de samenstelling van de lijst gebruikt men de ponsconcepten peilstation. De nummers komen in volgorde onder elkaar te staan. Voor het transport is droogijs nodig. Hier zorgt de transportmedewerker voor. Het kan voorkomen dat het niet mogelijk is om een persoon te onderzoeken in de periode dat hij/zij aan de beurt is. Dat betekent dat de doosjes waarin deze deelnemer "hoort" al weg zijn. De bloedmonsters van deze deelnemer komen in de "rest" serie. Voor deze doosjes moet wel een plattegrond (zie bijlage J) gemaakt worden. Wanneer de doosjes van de restserie voor ruim de helft vol zijn, worden zij meegenomen en kan men zo nodig een nieuwe restserie gaan inrichten. De transportmedewerker neemt wel steeds de inhoud van restserie doosje A mee voor Dr. Boerma.

Protocol voor 1991^{xxxviii}

Venapunctie

Voor dit onderdeel werkt men met oproepnummers in verband met het opbergen van de monsters. Dit zijn de nummers die met een 4 beginnen. Van elke deelnemer worden 3 buisjes bloed van 10 ml afgenomen uit de vena. Wanneer er 3 buizen zijn afgenomen die niet

^{xxxviii} Ook voor Amsterdam, d.d. 22 januari 1991. Te vinden in het draaiboek PPHV d.d. januari 1987.

volledig zijn gevuld dan maakt de medewerker één vol bloed monsters. Zijn er twee buizen of slechts één buis afgenomen dan vervalt het volbloed. Men gebruikt vacutainer buizen gevuld met EDTA (buizen met paarse dop).

- De met bloed gevulde en afgesloten buizen worden nadat zij voorzien zijn van het oproepnummer 5 maal gezwenkt d.w.z. op de kop gehouden en weer terug. De EDTA buizen blijven in de onderzoeksruijme staan en worden niet in de koelkast geplaatst. Omstreeks 12 uur, nadat deelnemer 7 is geprikt, en om 15 uur wordt het bloed naar het laboratorium gebracht. De etiketten van de betreffende personen worden bij de buizen gevoegd.

Bloedafwerking

- Uit één van de buizen wordt na 5 maal zwenken m.b.v. een pipet bloed opgezogen en in porties van 1,5 ml in 2 kleine plastic buisjes gedaan. Zij worden van het oproepnummer van de deelnemer voorzien.
- De 3 EDTA buizen: één buis met het restant van het bloed en de 2 volle EDTA buizen worden in de centrifuge geplaatst en gedurende 10 minuten afgedraaid. (NB. let er bij de plaatsing van de buizen in de centrifuge op dat de half gevulde buizen tegenover elkaar staan!)
- De doppen worden er af gehaald en het plasma (de bovenstaande vloeistof) van de drie buizen wordt m.b.v. een pipet overgebracht in een grote buis, voorzien van oproepnummer. NB. let er op dat nog een dun laagje plasma boven de cellaag achterblijft. Het plasma in de grote buis wordt gemengd door 5x te zwenken en daarna in porties van 1,5 ml overgepipetteerd in plastic buisjes. Op elk buisje komt een etiket met het oproepnummer van de deelnemer. De plastic buisjes worden in verzameldoosjes geplaatst en wel zodanig dat van elke deelnemer één buisje per verzameldoosje zit. De doosjes dragen een letter van de serie waartoe zij behoren (serie A t/m H). Zowel op het deksel als op de voorkant van het doosje wordt een etiket -geel voor serie A, B, C, blauw voor serie D, E, F en groen voor overige series- geplakt waarop de serie letter en het eerste oproepnummer staat genoteerd. Elk doosje heeft (10x10) 100 plaatsen. De oproepnummers 432.001-432.100 komen in één doosje. De plaatsen bestemd voor opgeroepen die niet aan het onderzoek deelnemen, blijven open. De nummering begint steeds **rechts onder**, de oproepnummers 432.001 - 432.010 komen op de **onderste horizontale rij**. De volgende horizontale rij is bestemd voor de oproepnummers 432.011 - 432.020 etc. Door deze wijze van opbergen is het niet nodig een plattegrond te maken. De volgorde van het alfabet wordt aangehouden bij het opruimen van de buisjes. Zijn er bijvoorbeeld 7 buisjes met plasma van deelnemer 430.064 dan komen zij, steeds op dezelfde plaats, 6e rij, plaats 4 te staan in de doosjes van serie A, B, C, D, E, F en G. Het aantal buisjes dat van een bepaalde deelnemer aanwezig is, schrijft men op het ponsconcept peilstation. De doosjes van serie A t/m H worden ingevroren bij - 20 °C.
- Van de drie buizen waaruit het plasma is verwijderd wordt het dunne laagje plasma en de bovenste cellaag (1,5 ml), die o.a. de witte cellen bevat, overgepipetteerd in een plastic buisje. Deze 3 buisjes krijgen het oproepnummer opgeplakt. Deze buisjes worden in de kartonnen doosjes van serie WI, WII en WIII geplaatst, op hun eigen plaats. Het aantal buisjes met witte cellen noteert men op het ponsconcept peilstation. Zowel op deksel als op voorkant plakt men een wit etiket met de serie aanduiding en het eerste oproepnummer. De doosjes van serie WI, WII en WIII worden ingevroren bij -20 °C.

- Uit de drie buizen waaruit de bovenste cellaag is verwijderd, worden per buis porties van 1,5 ml, die o.a. rode cellen bevat, overgepipetteerd in de kleine plastic buisjes. De buisjes worden voorzien van oproepnummer en in verzameldoosjes van de serie RI, RII en RIII geplaatst. Op het ponsconcept peilstation schrijft men het aantal buisjes met rode cellen. Zowel op deksel als op voorkant plakt men een rood etiket met de serie aanduiding en het eerste oproepnummer. De doosjes van serie RI, RII en RIII worden ingevroren bij -20 °C.
- De 2 kleine buisjes met vol bloed worden op hun eigen plaats in de verzameldoosjes van de serie VBI en VBII gedaan. Men schrijft het aantal buisjes vol bloed op het ponsconcept peilstation. Zowel op het deksel als op de voorkant plakt men een oranje etiket met de serie aanduiding en het eerste oproepnummer. De doosjes van serie VBI en VBII worden ingevroren bij -20 °C.

Verzending van de buisjes

Een keer per 3 weken -op maandag- komt een medewerker langs om o.a. de bloedmonsters op te halen, die naar Dr. Boerma en naar Leiden worden gebracht. De oproepnummers van alle buisjes die naar Dr. Boerma worden gebracht, schrijft men op een lijst (bijlage H). De lijst stelt men samen op de vrijdag voorafgaande aan de maandag dat het bloed wordt gehaald. Voor de samenstelling van de lijst gebruikt men de ponsconcepten peilstation. De nummers komen in volgorde onder elkaar te staan. Voor het transport is droogijs nodig. Hier zorgt de transportmedewerker voor. Het kan voorkomen dat het niet mogelijk is om een persoon te onderzoeken in de periode dat hij/zij aan de beurt is. Dat betekent dat de doosjes waarin deze deelnemer "hoort" al weg zijn. De bloedmonsters van deze deelnemer komen in de "rest" serie. Voor deze doosjes moet wel een plattegrond (zie bijlage J) gemaakt worden. Wanneer de doosjes van de restserie voor ruim de helft vol zijn, worden zij meegenomen en kan men zo nodig een nieuwe restserie gaan inrichten. De transportmedewerker neemt wel steeds de inhoud van restserie doosje A mee voor Dr. Boerma.

Bijlage 6

Protocol bloedverwerking van het Morgen-project

PROTOCOL : BLOEDAFNAME, VERWERKING EN TRANSPORT VERSIE 29 mei 1995

NB. Bijgaand protocol is 1 april 1993 van start gegaan met uitzondering van de met * aangegeven onderdelen die pas 10 mei (Amsterdam en Doetinchem) of 1 juni (Maastricht) 1993 van start zijn gegaan. Met de introductie van serumbuizen ZONDER korreltjes (@) op 28 maart 1994, de herintroductie van 10 ml (ipv. 9 ml) serumbuizen op 16 december 1994 en de 6e bloedbuis voor het bloedbeeld (#) op 22 mei 1995 is tevens een nieuwe versie van het protocol beschikbaar gekomen.

1. Contactpersoon Sarstedt

Dhr. M(arcel) Kroeze van Sarstedt - het bedrijf dat het Monovette systeem levert - is te bereiken onder tel. 01608 - 17550.

2. Venapunctie

Leg de 6 monovettes in de juiste volgorde klaar. Trek vervolgens de 6 monovettes vacuum tot en met de klikstand (!) en breek de stangetjes af. Plaats vervolgens de speciale monovette-naald op de eerste NaF buis. Iedere deelnemer wordt in zittende positie éénmaal aangeprikt. Daarna de 6 monovettes 'aanklikken' in de volgende volgorde:

| | Nr. | Type monovette | Kleur dop | Bepaling |
|---|-----|--------------------------------|-----------|-------------|
| * | 1. | 2.7 ml NaFluoride-plasma buis | geel | glucose |
| | 2. | 10 ml Kalium EDTA-plasma buis | rood | cholesterol |
| # | 3. | 1.2 ml kleine EDTA-plasma buis | rood | bloedbeeld |
| @ | 4. | 10 ml Serum buis | wit | EPIC |
| * | 5. | 10 ml Citraat-plasma buis | groen | EPIC |
| * | 6. | 10 ml Citraat-plasma buis | groen | EPIC |

Indien de venapunctie in de ene elleboog niet lukt, uitwijken naar de andere elleboog. Indien het hier ook niet lukt, kan op de handrug worden geprikt. Indien de venapunctie lukt en de monovette zich vult, dan stuwband direct losmaken. Indien de venapunctie lukt, maar het vullen van de monovettes stagneert, kan de stuwband aangespannen blijven. Deze procedure moet echter zoveel mogelijk vermeden worden.

Alle 6 buizen worden voorzien van een barcode etiket met het oproepnummer. Plak het etiket in de lengte richting op de buizen. Zorg ervoor dat het laatste cijfer van het oproepnummer aan de kant van de gekleurde dop zit.

Uitgezonderd de 1.2 ml EDTA buis (!), worden alle overige 5 buizen direct na afname **voorzichtig** (!) 5 maal gezwenkt, dwz. op de kop gehouden en weer terug. De kleine EDTA-buis moet direct na afname **slechts 2 (!) maal** voorzichtig worden gezwenkt, omdat te ruw en te lang zwenken de cellen kapot kan maken met als gevolg dat de bepaling van het bloedbeeld niet meer betrouwbaar is. Het zwenken dient direct na afname - binnen enkele seconden - te worden uitgevoerd teneinde het anti-stollingsmiddel onmiddellijk met het bloed te laten reageren. Als er teveel tijd verloopt tussen afname en zwenken kan toch nog stolling optreden (nastolling) die onder de microscoop zichtbaar is en storend is voor latere bepalingen.

Alhoewel de serum buis in principe niet gezwenkt hoeft te worden kan dit geen kwaad (Sarstedt) en ligt het voor de hand deze buis eveneens te zwenken. Een ervaren prikster kan met de linker hand zwenken terwijl de rechterhand de volgende monovette laat vollopen met bloed.

3. Tijdelijke opslag NaF- en grote EDTA-bloedbuizen voorafgaand aan het centrifugeren/transport

Aangezien de remming van de stofwisseling door NaF niet 100% is, moeten de NaF buizen na afname en zwenken **direct in een doosje en onderin** een koelkast worden bewaard totdat monsters worden afgewerkt. Mag niet bovenin de koelkast en ook niet vlak onder het vriesgedeelte, aangezien bij daling van temperatuur onder de 4^o C lysis van de cellen optreedt (Boerma). Alhoewel de grote EDTA-plasma buizen in de onderzoeksruijnte kunnen blijven staan en niet in de koelkast geplaatst hoeven te worden (Boerma), toch - bij voldoende ruimte in de koelkast - handiger om de EDTA buizen ook onderin de koelkast te bewaren (Boerma).

In Amsterdam worden omstreeks 12 uur en om 15 uur de EDTA buizen en de NaF buizen naar het laboratorium gebracht. De etiketten en medische formulieren van de betreffende personen worden bij de buizen gevoegd. **In Doetinchem en Maastricht** worden aan het eind van iedere ochtend en middag de EDTA buizen en de NaF buizen afgewerkt.

4. Tijdelijke opslag kleine EDTA buis

Het kleine 1.2 ml EDTA buisje moet tenminste een half uur na afname (langer is geen probleem !) bij kamertemperatuur blijven staan om de cellen te laten wennen aan EDTA. EDTA doet de cellen in het eerste half uur iets zwellen, waarna de grootte stabiliseert en een goede meting van het bloedbeeld mogelijk wordt. Als de monsters direct na afname in de koelkast worden geplaatst, vindt dit proces onvoldoende plaats en is de bepaling van het bloedbeeld onbetrouwbaar. Zorg ervoor dat het buisje rechtop blijft staan. Bescherming tegen licht is niet nodig. De ochtendmonsters (= tot 12 uur afgenomen) kunnen tegelijk met de ochtend sera (zie paragraaf 5) in de koelkast worden geplaatst. De middagmonsters (= na 12 uur afgenomen) kunnen NIET tegelijk met de middagsera in de koelkast, maar moeten dus eerst tenminste een half uur bij kamertemperatuur staan en mogen daarna pas in de koelkast worden gezet.

5. Tijdelijke opslag serum en citraat buizen

De serum- en citraat-plasma-buizen worden onmiddellijk tegen licht beschermd door plaatsing in een (kartonnen) doos. Voor het bepalen van het moment van koelen van de **serumbuis** (witte dop) moet onderscheid gemaakt worden tussen serum dat in de ochtend afgenomen wordt (tot 12 uur = ochtendserum) en het serum dat in de middag afgenomen wordt (na 12 uur = middagserum). Het **ochtend serum**, dat tot 12 uur is afgenomen, moet na afname en zwenken **direct in een doosje** geplaatst worden en **3 uur** buiten de koelkast staan, waarna het pas in de koeling wordt geplaatst. Hierbij geldt dus dat elk serummonster 3 uur in het donker buiten de koeling moet staan: een buisje dat om 8 uur afgenomen is, gaat om 11 uur in de koeling; een buisje dat om 11 uur afgenomen is, gaat om 14 uur in de koeling. Het **middagserum**, dat na 12 uur is afgenomen, wordt na afname en zwenken ook **direct in een doosje** geplaatst maar kan wel **direct in de koeling** (de middagsera worden namelijk de volgende dag op ons Cryolaboratorium alsnog eerst 3 uur bij kamertemperatuur geplaatst alvorens te worden afgewerkt).

De **citraat buis** (met groene dop) wordt na afname en zwenken **direct in een doosje** geplaatst (ook tijdens transport van de ene kamer naar de andere kamer waar de koelkast staat). In het bloed dat in deze buis zit worden stoffen bepaald (anti-oxidant vitamines) die zeer gevoelig voor licht zijn. Daarna deze buis samen met de gele NaF buis en de **grote** rode EDTA buis **direct in de koelkast** plaatsten.

De temperatuur van de kleine EDTA, serum- en citraat monovettes mag niet lager dan 4⁰ C zijn, want anders gaan de cellen kapot, en niet hoger dan 10⁰ C ter voorkoming van een daling in het gehalte aan anti-oxidanten. De temperatuur van de nieuwe koelkast (met zogenaamde geforceerde koeling) moet ingesteld worden op + 5⁰ celsius.

TABEL - SAMENVATTING VAN DE BEHANDELING VAN DE BLOEDBUIZEN

| Soort bloed | Aantal keren zwenken | Wanneer in doos om tegen het licht te beschermen | Wanneer in koelkast |
|---------------------------|----------------------|--|--|
| Gele NaF buis | 5 | Direct | Direct |
| Grote rode EDTA buis | 5 | Direct | Direct |
| Kleine rode EDTA buis | 2 | Niet nodig | Ochtendmonsters na 3 uur Middagmonsters na half uur |
| Witte serum buis | 5 | Direct | Ochtendmonsters na 3 uur Middagmonsters direct |
| Twee groene citraatbuizen | 5 | Direct | Direct |

6. Noteren van gegevens

Op het Formulier Medische gegevens worden de gegevens genoteerd die direct verband houden met de bloedmonsters, te weten de tijdstippen dat er voor het laatst iets is gegeten en gedronken, de datum van de laatste menstruatie, het tijdstip van afname en welke buizen zijn afgenomen.

Verder wordt genoteerd: het gebruik van medicamenten, mineralen of vitaminen in de afgelopen week en het roken in de afgelopen week en de afgelopen 24 uur. Een aantal van deze gegevens worden overgenomen van het medicijnformuliertje dat, voorafgaand aan het bezoek aan het peilstation, naar de deelnemers wordt opgestuurd samen met de vragenlijsten.

7. Centrifugeren van NaF-buizen

Aangezien ondanks de toevoeging van natriumfluoride (NaF) het glucose gehalte toch nog kan zakken, worden eerst de NaF-buizen afgewerkt. Om een goede scheiding te krijgen moet er minimaal een half uur verlopen tussen het moment van bloedafname en het moment van centrifugeren. Pas zonodig de centrifuge aan voor het centrifugeren van dit kleine buisje zoals aangegeven in bijlage 16c *Standaardisatie g-waarden*. Een even aantal (ivm. gelijkwaardige belading) NaF-buizen wordt in de centrifuge geplaatst en met toerental zoals aangegeven in bijlage 16c *Standaardisatie g-waarden* gedurende 10 minuten afgedraaid. De kleine NaF-buizen mogen nooit tegelijkertijd afgedraaid worden met de EDTA-plasma buizen!

De dop wordt eraf gehaald en het plasma (de bovenstaande vloeistof) van de buis wordt in porties van 0.5 ml overgepipetteerd (Eppendorf pipet met vast volume nl. 500 microliter) in 2 plastic cupjes met gele dop (waarvan 1 met platte bodem). Het cupje **met de platte bodem** is bestemd voor Rotterdam (=N1).

Op elk cupje komt een etiket met het oproepnummer van de deelnemer. Let op dat dit gelijk is aan het oproepnummer op de Algemene Vragenlijst en op het Formulier

Medische Gegevens. Op het formulier medische gegevens worden de vragen onder het kopje 'Laboratoriumonderzoek op de GG&GD' ingevuld.

8. Centrifugeren van EDTA-plasma buizen

Vervolgens worden de EDTA buizen afgewerkt. Om een goede scheiding te krijgen moet er minimaal een half uur verlopen tussen het moment van bloedafname en het moment van centrifugeren. Pas zonodig de centrifuge aan voor het centrifugeren van de 10 ml EDTA buizen. Een even aantal (ivm. gelijkwaardige belading) EDTA-buizen wordt in de centrifuge geplaatst en met toerental zoals aangegeven in de bijlage 16c *Standaardisatie g-waarden* gedurende 10 minuten afgedraaid. De grotere EDTA-plasma buizen mogen nooit tegelijkertijd met de kleinere NaF-buizen afgedraaid worden! Men noteert op het formulier Medische gegevens of het plasma al dan niet hemolytisch is geworden.

De dop wordt eraf gehaald en het plasma (de bovenstaande vloeistof) van de buis wordt met behulp van een Eppendorf pipet met vast volume van 500 microliter in porties van 0.5 ml overgepipetteerd in 7 plastic cupjes met rode dop (waarvan 2 met platte bodem). De twee cupjes **met de platte bodem** zijn bestemd voor Rotterdam (dwz. EP1 en EP2). Omdat er in een aantal gevallen niet genoeg buffy coat is, wordt de buffy coat met behulp van een Pasteurse pipet in een portie van 1 ml overgepipetteerd in een 1 ml plastic buisje (na gebruik weggooien). Let op: als de Pasteurse pipetpunt niet precies in de buffy coat terecht komt, komt er geen buffy coat in de pipet. Hierna wordt weer verder gewerkt met de Eppendorf pipet met vast volume nl. 500 microliter. Na goed mengen met de punt van de Eppendorf pipet, wordt de buffy coat overgepipetteerd in porties van 0.5 ml in 2 plastic cupjes met blauwe dop. Tenslotte worden 2 x 0.5 ml cupjes met groene dop gevuld met erythrocyten.

Op elk cupje komt een etiket met het oproepnummer van de deelnemer. Let op dat dit gelijk is aan het oproepnummer op de Algemene Vragenlijst en op het Formulier Medische Gegevens. Op het formulier medische gegevens worden de vragen onder het kopje 'Laboratoriumonderzoek op de GG&GD' ingevuld.

9. Codering en opslag NaF-, EDTA-, Buffy coat- en Ery-buizen bij -20⁰ C

Van iedere deelnemer worden 2 x 0.5 ml NaF-plasma (geel), 7 x 0.5 ml EDTA-plasma (rood), 2 x 0.5 ml buffy coat (blauw) en 2 x 0.5 ml erythrocyten (groen) op het peilstation opgeslagen. Het gaat in het totaal dus om 13 x 0.5 ml cupjes per persoon. Deze plastic cupjes worden in langwerpige piepschuim verzamelendozen geplaatst en wel zodanig dat één verzameldoos slechts één monster per deelnemer bevat. Er zijn dus 13 types dozen. Op deze wijze hoeven er zo min mogelijk dozen geopend te worden voor het terugvinden van monsters voor toekomstige bepalingen. De dozen worden ingevroren bij -20⁰. Bij ontbreken van een of meerdere plastic cupjes van een deelnemer (om welke reden dan ook) moeten de hiervoor bestemde plaatsen in de piepschuimdoos **open** worden gehouden.

Er zijn dus 13 type verzamelendozen, één per cupje van één proefpersoon. Met andere woorden: in één doos zitten bv. 100 monsters van ery's van 100 deelnemers. De dozen krijgen de volgende unieke codering:

| |
|---|
| jaar – peilstation - batchnummer – type |
|---|

Het jaar 1993 wordt afgekort tot '93'. De codes voor het peilstation zijn: 4=Amsterdam, 5=Doetinchem en 6=Maastricht. Een serie van 13 doosjes die bij elkaar horen wordt een

batch genoemd. Het type staat voor het soort bloed dat in het cupje is opgeslagen en het nummer van het buisje, namelijk:

GEEL

N1 = NaF-plasma (1e cupje) Rotterdam
 N2 = NaF-plasma (2e cupje) Bilthoven / reserve Rotterdam

ROOD

| | | |
|-------------------|------------|-------------------------------|
| EP1 = EDTA-plasma | (1e cupje) | Rotterdam |
| EP2 = EDTA-plasma | (2e cupje) | Rotterdam |
| EP3 = EDTA-plasma | (3e cupje) | Bilthoven / reserve Rotterdam |
| EP4 = EDTA-plasma | (4e cupje) | Bilthoven |
| EP5 = EDTA-plasma | (5e cupje) | Bilthoven |
| EP6 = EDTA-plasma | (6e cupje) | Bilthoven |
| EP7 = EDTA-plasma | (7e cupje) | Bilthoven |

BLAUW

| | | |
|----------------------|------------|-----------|
| B1 = EDTA-buffy coat | (1e cupje) | Bilthoven |
| B2 = EDTA-buffy coat | (2e cupje) | Bilthoven |

GROEN

| | | |
|-------------------------|------------|-----------|
| ER1 = EDTA-erythrocyten | (1e cupje) | Bilthoven |
| ER2 = EDTA-erythrocyten | (2e cupje) | Bilthoven |

Bovenop EN aan beide lange zijanten EN aan de korte zijkant komen stickers met de unieke code van de verzameldoos. De 13 cupjes van één proefpersoon worden in de 13 dozen steeds op dezelfde positie gezet. Op de bijgaande plattegrond (zie bijlage 16d) staan de nummers van de posities in de verzameldoos aangegeven. Op deze plattegrond wordt door de peilmedewerker het barcode etiket met het oproepnummer van de deelnemer op die plaats geplakt als waar het cupje in de doos is geplaatst. Het unieke codenummer van de doos in combinatie met het nummer van de positie in de doos maakt dat het cupje precies terug te vinden is in de juiste doos.

10. Dagelijks transport kleine EDTA, serum- en citraat monovettes naar Bilthoven

De kleine EDTA en de serum- en citraat monovettes van *de laatste deelnemer* moeten tenminste 45 minuten in de koelkast hebben gestaan om de temperatuur van 5⁰ Celcius te kunnen bereiken alvorens over te pakken in de grote piepschuimdoos met koelelementen.

Aan het eind van iedere middag worden de kleine EDTA, serum en citraat monovettes, de koelelementen, de watten en de thermometer uit de koelkast gehaald en in de grote piepschuimdoos geplaatst. Zie bijgaande handleiding voor het juist vullen van een koeldoos (zie bijlage 16b). Ieder kleine EDTA buis wordt afzonderlijk omwikkeld in een stuk watten en tussen de ander buizen geplaatst, zodat het enigzins stevig staat. De watten moeten in de koelkast bewaard worden, zodat de temperatuur in de koeldoos zo min mogelijk wordt beïnvloed. Eventueel mogen meerdere omwikkelde buisjes met een elastiek bij elkaar gedaan worden, als ze maar rechtop blijven staan en als er maar geen kans op breuk is. Daarna wordt het bijbehorende koeldoosformulier (zie bijlage 16a) - na het plakken van de barcode sticker met het oproepnummer en het noteren van de tijd van afname en het aantal serum- en citraat-monovettes - in de koeldoos gelegd. Ook moet

aangegeven worden of er wel of niet (!) een kleine EDTA buis is afgenomen. Zorg er steeds voor een kopie van dit formulier achter te houden.

Vervolgens wordt de piepschuimdoos goed dichtgebonden met touw en naar het dichtsbijzijnde postkantoor gebracht voor verzending via EMS Express naar het volgende adres: H.B. Bueno de Mesquita, RIVM, Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, Postbus 1, 3720 BA, Bilthoven.

11. Transport EDTA-plasma en NaF-plasma buizen met bode naar Rotterdam

Een keer per 3 weken - op maandag - komt een bode (Mevr. Leppink of een van haar zonen, tel. 071-414637) langs om o.a. de NaF-plasma en EDTA-plasma monsters op te halen, die naar Mw. Drs. C(hrista).M. Cobbaert (Afd. Klinische Chemie & Lip. Ref. Lab., AZR-Dijkzigt, 3015 GD Rotterdam, tel. 010 - 463 34 93) worden gebracht voor de glucose- en cholesterol-bepalingen. De piepschuim verzameldoosjes worden rondom geheel dichtgetaped. Zorg ervoor dat de tape NIET over de stickers heen wordt geplakt. Van iedere deelnemer worden 1 x 0.5 ml NaF-plasma (type N1) en 2 x 0.5 ml EDTA-plasma (types EP1 en EP2) naar Rotterdam vervoerd. Om te zorgen dat alle deelnemers op dezelfde tijd de uitslag te horen krijgen, worden ook piepschuimdoosjes die niet geheel gevuld zijn naar Rotterdam gebracht. Indien de bepaling in Rotterdam mislukt, kunnen types N2 en EP3 als reserve worden opgestuurd.

12. Transport NaF-, EDTA-, buffy coat- en ery-cupjes naar Bilthoven

Een keer per 3 weken - op dezelfde maandag - komt de bode langs om de overige NaF en EDTA-bloedmonsters op te halen, die naar Bilthoven worden gebracht voor opslag. Er worden alleen **volledig** gevulde piepschuimdozen naar Bilthoven getransporteerd. De piepschuim verzameldoosjes worden rondom geheel dichtgetaped. Van iedere deelnemer worden 1 x 0.5 ml NaF-plasma (type N2), 5 x 0.5 ml EDTA-plasma (types EP3 t/m EP7), 2 x 0.5 ml buffy coat (types B1 en B2) en 2 x 0.5 ml ery's (types ER1 en ER2) naar Bilthoven vervoerd. De oproepnummers van alle cupjes die naar Bilthoven worden gebracht, staan op de plattegrond die mee wordt gestuurd.

De monsters worden opgeslagen in een -20⁰ C vriescel in de hal van gebouw Y (contactpersoon Mevr. Jacqueline Heykoop, RIVM, Bilthoven, tel. 030-743996). Elk type bloed (N2 t/m E2) wordt in een apart vak gestapeld met de lange zijkant naar voren (staat immers etiket op!) in volgorde van batchnummer.

13. Bijlagen^{xxxix}

| | |
|-------------|--|
| Bijlage 12 | Formulier medische gegevens |
| Bijlage 16a | Koeldoosformulier |
| Bijlage 16b | Beschrijving voor het vullen van de koeldoos |
| Bijlage 16c | Standaardisatie g-waarden |
| Bijlage 16d | Plattegrondformulier voor verzameldozen |

^{xxxix} Deze bijlagen zijn niet opgenomen in dit rapport.

Bijlage 7

CZE-beleid betreffende de uitputting van bloedmonsters

Te lichten en minimaal te bewaren hoeveelheid bloed/DNA per project^{xl,xli}

Afgenomen en opgeslagen hoeveelheid bloed:

De hoeveelheid afgenomen en opgeslagen bloed van het Peilstations-, MORGEN-, en EPIC-project staat weergegeven in Bijlage 4.

Te lichten aantallen opslageenheden:

Per steekproef^{xlii} mag per fractie het hierna genoemde aantal opslageenheden worden gelicht:

- Plasma: 1 opslageenheid; voor het lichten van een volgende moet opnieuw toestemming aan de SAG worden gevraagd.
- Serum: idem plasma.
- Leucocyten: alle opslageenheden mogen worden gelicht, als het oproepnummer in een steekproef voorkomt. In principe wordt per steekproef wordt 1 opslageenheid gelicht, tenzij een 2e of 3e nodig is i.v.m. het opwerken van DNA.
- Erytrocyten: idem leucocyten.
- Volbloed: idem plasma.

Te bewaren aantallen opslageenheden:

Hieronder staat per project weergegeven hoeveel opslageenheden per fractie nog aanwezig zouden moeten zijn na een aantal gegeven jaren, nadat de laatste bloedmonsters in het kader van dat project afgenomen zijn.

Peilstationsproject: Aantal buisjes dat nog aanwezig is na een bepaald aantal jaren:

| | plasma | leucocyten | Erytrocyten | volbloed |
|---|--------|---------------------------------|---------------------------------|----------|
| Oorspronkelijk aantal opgeslagen buisjes ^{xliii} | 7 | 3 | 3 | 2 |
| nog aanwezig na 15 jaar | 1 | 0, wel 1 µg DNA ^{xliv} | 0, wel 1 µg DNA ^{xliv} | 1 |
| nog aanwezig na 20 jaar | 0 | 0 | 0 | 0 |

MORGEN-project: Aantal cupjes dat nog aanwezig is na een bepaald aantal jaren:

| | EDTA-plasma | NaF-plasma | Leucocyten | Erytrocyten |
|---|-------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Oorspronkelijk aantal opgeslagen cupjes ^{xliiii} | 5 | 1 | 2 | 2 |
| nog aanwezig na 15 jaar | 1 | 1 | 0, wel 1 µg DNA ^{xliv} | 0, wel 1 µg DNA ^{xliv} |
| nog aanwezig na 20 jaar | 0 | 0 | 0 | 0 |

^{xl} Dit is de inhoud van Bijlage 5 van de Handleiding voor het Gebruik van Lichaamsmateriaal van CZE

³

^{xli} Goedgekeurd door de SAG in september 1999

^{xlii} Steekproef: de steekproef waarvoor toestemming is verleend door de SAG a.d.h.v. het formulier "Aanvragen toestemming voor het gebruiken van monsters van lichaamsmateriaal"

^{xliiii} De monsters waarin bepalingen zijn gedaan bij het CKCL zijn hier niet bij opgenomen.

^{xliv} Zie hierboven bij "Te lichten aantallen opslageenheden".

EPIC: Aantal rietjes dat nog aanwezig is na een bepaald aantal jaren^{xlv}.

| | serum | citraat-plasma | leucocyten | Erytrocyten | extra plasma |
|--|-------|----------------|------------|-------------|--------------|
| Oorspronkelijk aantal opgeslagen rietjes | 4 | 6 | 2 | 2 | 6 |
| nog aanwezig na 5 jaar | 3 | 5 | 2 | 2 | 4 |
| nog aanwezig na 10 jaar | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 |
| nog aanwezig na 15 jaar | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| nog aanwezig na 20 jaar | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

DNA: Van het opgewerkte DNA van alle projecten wordt per opgewerkt monster 1 µg bewaard.

^{xlv} H.B. Bueno de Mesquita; *Guidelines for use of the EPIC biobank, The Netherlands, 1993-1997*; 13 mei 1996

Bijlage 8

Hoeveelheid beschermd lichaamsmateriaal voor beschermde cohorten^{xlvi}

Plasma

| Project | Beschermd cohort | Hoeveelheid beschermd | Einddatum |
|--------------|------------------|-----------------------|-----------|
| PPHV-project | CVZ | n.v.t. | |
| | Kanker | 3 buisjes | 12/2015 |
| | Migraine | n.v.t. | |
| | Overledenen | n.v.t. | |
| MORGEN | CVZ | 2 cupjes | 12/2015 |
| | Kanker | 2 cupjes | 12/2015 |
| | Migraine | n.v.t. | |
| | Overledenen | n.v.t. | |
| EPIC | CVZ | n.v.t. | |
| | Kanker | 2 rietjes | 12/2015 |
| | Migraine | n.v.t. | |
| | Overledenen | n.v.t. | |

Serum

| Project | Beschermd cohort | Hoeveelheid beschermd | Einddatum |
|--------------|------------------|-----------------------|-----------|
| PPHV-project | n.v.t. | | |
| MORGEN | n.v.t. | | |
| EPIC | CVZ | n.v.t. | |
| | Kanker | 2 rietjes | 12/2015 |
| | Migraine | n.v.t. | |
| | Overledenen | n.v.t. | |

^{xlvi} Afkomstig uit Bijlage 3 van de Handleiding Gebruik van Lichaamsmateriaal van CZE, versie 1 d.d. november 2000.

DNA

| Beschermd cohort | Project | Hoeveelheid beschermd | Einddatum |
|---|----------------|------------------------------|------------------|
| CVZ | PPHV-project | Totaal 10 µg | 12/2015 |
| | MORGEN | | |
| | EPIC | n.v.t. | |
| | | | |
| Kanker | PPHV-project | Totaal 10 µg | 12/2015 |
| | MORGEN | | |
| | EPIC | | |
| | | | |
| Migraine | PPHV-project | Totaal 10 µg | 12/2003 |
| | MORGEN | | |
| | EPIC | n.v.t. | n.v.t. |
| | | | |
| Overledenen | PPHV-project | Totaal 5 µg | niet vastgesteld |
| | MORGEN | | |
| | EPIC | n.v.t. | n.v.t. |
| | | | |
| Bovendien geldt voor elk DNA-monster | | 1 µg | niet vastgesteld |

Bijlage 9 Verzendlijst

- 1 Dr. M.J.W. Sprenger, directeur-generaal RIVM
- 2 Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
- 3 Prof.dr.ir. D. Kromhout, directeur sector Voeding en Consumentenveiligheid
- 4 Dr. A.J.A.M. Sips, waarnemend hoofd Centrum voor Voeding en Gezondheid
- 5 Dr. A. Opperhuizen, hoofd Laboratorium voor Toxicologie, Pathologie en Genetica
- 6 Dr. ir. H.A. Smit, hoofd Centrum voor Preventie- en Zorgonderzoek
- 7 Dr. H.B. Bueno de Mesquita, projectleider Richtlijnen Gezonde Voeding (CVG)
- 8 Dr.ir. E.J.M. Feskens, projectleider Gen-omgevingsinteracties in relatie tot hart- en vaatziekten en diabetes (CVG)
- 9 Dr.ir. J.M.A. Boer (CVG)
- 10 Dr. B. Hoebee (TOX)
- 11 Ir. E.M. den Hoedt (CVG)
- 12 Dr.ir. E.H.J.M. Jansen (TOX)
- 13 Dr.ing. H.J. van Kranen (TOX)
- 14 SBC, afdeling Communicatie
- 15 Bureau Rapportenregistratie
- 16 Bibliotheek RIVM
- 17-21 Bureau Rapportenbeheer
- 22-50 Reserve-exemplaren