

Dominik Lermen, Martina Bartel-Steinbach, Nicole Jost

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT
Josef-von-Fraunhofer-Weg 1, 66280 Sulzbach

Inhaltsverzeichnis

1	Umweltprobenbank des Bundes	2
2	Zielsetzung dieser Richtlinie.....	2
3	Funktion der Probe	2
4	Probandenkollektiv	2
5	Probenahmezeitraum und -häufigkeit.....	2
6	Geräte, Reagenzien und Materialien	3
7	Vorbereitungen zur Probenahme	3
7.1	Infrastruktur	3
7.2	Kontaminationsrisiken.....	3
7.3	Reinigung von Probengefäßen	4
7.4	Kennzeichnung der Probengefäße	4
8	Durchführung der Probenahme.....	4
8.1	Bestimmung klinisch-physikalischer Parameter	4
9	Probenaliquotierung.....	5
10	Kryokonservierung von Archivproben	5
11	Entnahme von Proben für retrospektive Analysen.....	6
12	Literatur	6

Anhang: Auszug aus dem Probenahmeprotokoll - Urin

**Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische
Charakterisierung von Umwelt- und Humanproben**

Stand: September 2015, V 3.0

1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMUB) unter fachlicher und administrativer Koordination des Umweltbundesamtes (UBA). Die UPB sammelt ökologisch repräsentative Umweltproben sowie Humanproben, lagert sie ein und untersucht sie auf umweltrelevante Stoffe (BMUB 2008).

Die Langzeitlagerung erfolgt unter Bedingungen, die eine Zustandsveränderung oder einen Verlust chemischer Eigenschaften über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten weitestgehend ausschließen. Damit stellt das Archiv Proben für die retrospektive Untersuchung solcher Stoffe bereit, deren Gefährdungspotential für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit heute noch nicht bekannt ist.

Umfassende Informationen zur UPB sind unter www.umweltprobenbank.de verfügbar.

2 Zielsetzung dieser Richtlinie

In dieser Richtlinie werden alle notwendigen Arbeitsschritte zur standardisierten Gewinnung von 24h-Sammelurinproben definiert. Sie beschreibt Vorkehrungen und Maßnahmen, um Fremdkontamination der Proben auf ein Minimum zu reduzieren und den chemischen Informationsgehalt jeder einzelnen Probe, auch während der Lagerung über unbestimmte Zeiträume, sicherzustellen. 2014 wurde für den vom Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) betriebenen Bereich der UPB, der die Sammlung, Lagerung und Eingangscharakterisierung der Humanproben umfasst, ein umfassendes Qualitätsmanagementsystem nach DIN EN ISO/IEC 17025 etabliert (Lermen et al. 2014). Folgende Richtlinie stellt einen nicht gelenkten Auszug aus diesem QM-System hinsichtlich der Probenahme und Probenverarbeitung von 24h-Sammelurin dar. Sie ist in dieser Form kein integrierter Bestandteil dieses QM-Systems.

3 Funktion der Probe

Urin gibt als Ausscheidungsprodukt der Niere Aufschluss über eine Vielzahl an Informationen über Stoffwechsel und Gesundheitszustand. Der über 24 Stunden gesammelte Urin eines Menschen liefert darüber hinaus wichtige Informationen über die täglich resorbierten anorganischen und organischen Xenobiotika und ermöglicht die Kalkulation der Gesamtausscheidung. 24h-Sammelurin ist als biologisches Material für umweltmedizinische Fragestellungen leicht zugänglich und kann unter Routinebedingungen für den Betroffenen zumutbar gewonnen werden.

4 Probandenkollektiv

Gemäß der Konzeption der UPB werden jedes Jahr an jedem der vier Standorte (Münster, Halle/Saale, Greifswald, Ulm) 120-150 junge Erwachsene in einem Geschlechterverhältnis von möglichst 1:1 im Alter von 20 bis 29 Jahren untersucht. Durch die Wahl dieser Kollektive soll sichergestellt werden, dass Proben von nicht-spezifisch durch Schadstoffe belasteten Individuen gewonnen werden und so die durchschnittliche Hintergrundbelastung junger Erwachsener in Deutschland repräsentiert wird (BMUB 2008).

5 Probenahmezeitraum und -häufigkeit

Um eine Vergleichbarkeit der Studentenkollektive der einzelnen Probenahmestandorte zu gewährleisten, finden die einzelnen Probenahmen jährlich zu definierten Zeitpunkten statt (Tab.1).

Tab. 1: Übersicht der festgelegten Probenahmezeiträume

Probenahmestandort	Probenahmezeitraum
Münster	Januar / Februar
Halle/Saale	Februar / März
Greifswald	März / April
Ulm	April / Mai

6 Geräte, Reagenzien und Materialien

Für das Reinigen der Probengefäße

- Dispensetten (5-50 mL/2,5-25 mL)
- Multipette plus mit Combitips 10 mL
- Variable Pipetten (1000 µL/200 µL) mit dazugehörigen Pipettenspitzen
- DURAN®-Glasflaschen für Lösungen (5 L, 3,5 L, 2 L)
- Laborwaagen mit einem Messbereich von 0 bis 6000 g und 0 bis 16000 g mit Drucker
- Sicherheitswerkbank (Klasse 2)
- Laborabzug mit Lösungsmittelschrank
- Säuren-Laugenschrank
- Reinstwasser ($> 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)
- Methanol CH_3OH 99,8 % p.a.
- Salpetersäure HNO_3 65 % p.a., ISO verdünnt
- Salpetersäure, verdünnt (2%) aus 65 % p.a. mit Reinstwasser ($> 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)
- 3 L-Urin-Sammelflasche aus PE
- 13,5 mL und 30 mL PP-Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (Probengefäße)
- Ständer für Probengefäße

Für die Probenahme

- Flächendesinfektionsmittel
- Handdesinfektionsmittel
- Ständer für 30 mL und 13,5 mL Probengefäße
- Vorgereinigte 13,5 mL und 30 mL Probengefäße
- 60 L Wiwa-Behälter eckig, BAM geprüft mit und ohne Biohazard-Kennzeichnung AVV-Schlüssel-Aufkleber
- Einmalhandschuhe
- saugfähige Einwegtücher

Für die Erhebung klinisch-physikalischer Parameter

- Waage mit dem Messbereich 0 bis 6200 g
leere 3 L-Urin-Sammelflasche aus PE zum Trieren der Waage
- Aräometer mit dem Messbereich 1,000 bis 1,060 g/mL
- Leitfähigkeitsmessgerät; Messung in mS/cm
- Leitfähigkeits-Standard-Puffer 12,88 mS/cm
- 1000 µL-Pipetten Messzylinder 250 mL aus PE
- Ständer für 30 mL Probengefäße

Für das Einfrieren der Proben

- mobiler Kryotransportbehälter
- 300 L Flüssigstickstoff-Vorratsbehälter
- Flüssigstickstoff
- Lagersystem für Kryotransportbehälter
- Sauerstoffmangelwarnanlage
- Stromversorgung
- Kryohandschuhe
- Schutzvisir
- Kryoschürze

7 Vorbereitungen zur Probenahme

Zur Durchführung von Probenahmen am Menschen ist generell im Vorfeld die Zustimmung einer Ethikkommission erforderlich.

Die Probanden sind über Umfang, Ziel und Zweck der Probenahme schriftlich zu informieren. Zudem muss die Zustimmung jedes Probanden und damit eine Übertragung der Eigentumsrechte an der Probe vom Probanden an das UBA durch die Unterzeichnung einer Einverständniserklärung gewährleistet sein.

7.1 Infrastruktur

Vorbereitend zur Probenahme ist darauf zu achten, dass eine Labor-Infrastruktur vorhanden ist, die den Anforderungen des Arbeitsschutzgesetzes (ArbSchG) und der Biostoffverordnung (BioStV) im Hinblick auf die durchzuführenden Arbeiten gerecht wird. Entsprechende Hygienemaßnahmen müssen etabliert und in einem Hygieneplan festgelegt sein. Darüber hinaus ist für das Labor, in dem die Arbeiten durchgeführt werden, eine Betriebsanweisung zu erstellen, die die Gefährdungspotentiale zusammenfassend darstellt und nach der der Laborleiter das Personal einmal jährlich auf die potentiellen Gefahren hinweist und den sicheren Umgang mit biologischen Materialien vermittelt.

7.2 Kontaminationsrisiken

Zur Gewährleistung vergleichbarer Proben für sensible rückstandsanalytische Untersuchungen

im Human-Biomonitoring ist eine fachgerechte Gewinnung und Aufbereitung von Humanproben im Rahmen der prä-analytischen Phase von grundlegender Bedeutung. Hierbei steht die Vermeidung von potentiellen Kontaminationen im Vordergrund. Neben Kontaminationen, die im Rahmen der Probenahme, z.B. durch offen stehende Probengefäße, auftreten können, sind zudem vor allem herstellungsbedingte Kontaminationen der Probengefäße durch den Produktionsprozess von Bedeutung. Hinsichtlich des ersten Aspekts ist es wichtig, die Mitarbeiter im Vorfeld der Probenahme arbeitsplatzspezifisch einzuweisen und im Speziellen auf die Kontaminationsrisiken hinzuweisen.

Durch die im Folgenden beschriebene Reinigung sollen Kontaminationen der Probengefäße durch den Herstellungsprozess vermieden werden.

7.3 Reinigung von Probengefäßen

Zur Vermeidung von Kontaminationen aus dem Herstellungsprozess der verwendeten Probengefäße ist eine standardisierte Reinigung der Probengefäße vorzunehmen. Hierzu sind sämtliche Probengefäße (8, 13,5 und 30 mL) mit Methanol zur Entfernung von organischen Kontaminanten, 2%-iger Salpetersäure zur Entfernung von anorganischen Kontaminanten und Reinstwasser ($> 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) zu spülen. Die Probengefäße sind nacheinander bis zur Hälfte ihres Füllvolumens mit Methanol und gänzlich mit Salpetersäure und Reinstwasser zu befüllen. Nach jedem Befüllen sind die Probengefäße eine Minute zu schütteln. Methanol und Reinstwasser sind nach dem Schütteln zu verwerfen. Die Salpetersäure bleibt zur Entfernung anorganischer Kontaminanten über Nacht bei Raumtemperatur in den Gefäßen und wird erst am nachfolgenden Tag entsorgt. Nach jedem Spülvorgang sind die Probengefäße in einer Sicherheitswerkbank (Klasse 2) zum Trocknen in entsprechenden Ständern aufzustellen. Anschließend sind die Probengefäße in der Sicherheitswerkbank mit dem Deckel fest zu verschließen.

7.4 Kennzeichnung der Probengefäße

Nach erfolgter Reinigung ist jedes einzelne Probengefäß mit einem Etikett zu versehen, das einen entsprechenden Barcode trägt. Zusätzlich ist jedes Probengefäß mit der Information des Barcodes mit einem wasserfesten Filzstift zu beschriften. Die Probengefäße sind probandenspezifisch zu sortieren, um eine Verwechslung der Gefäße während der Probenahme zu vermeiden.

8 Durchführung der Probenahme

Die Probenahme des 24h-Sammelurins erfolgt durch die Probanden selbst. Im Vorfeld der Probenahme wird jedem Probanden zusammen mit der Einwilligungserklärung, einem generellen Informationsschreiben zur Probenahme der UPB und der detaillierten Beschreibung zur Durchführung der Sammlung des 24h-Sammelurins ein 3 L-Sammelgefäß zugesendet.

Die Probanden erhalten so im Vorfeld zu Probenahme folgende Vorschrift für die Sammlung des Urins:

Der Urin wird über einen Zeitraum von 24 Stunden vollständig in das zur Verfügung gestellte 3 L-Sammelgefäß entleert. Es darf nur einmal ein Morgenurin dabei sein, d. h. wenn die Sammlung mit dem ersten Morgenurin begonnen wurde, ist sie mit der letzten Nachtleerung beendet.

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Ihre Kleidung öffnen Sie das Sammelgefäß bitte erst kurz vor der Urinabgabe (also wenn Sie ihre Kleidung schon entsprechend geöffnet/abgelegt haben). Bitte achten Sie darauf, dass Sie den Deckel des Gefäßes mit der Öffnung nach oben in einiger Distanz ablegen.

8.1 Bestimmung klinisch-physikalischer Parameter

Klinisch-physikalische Parameter wie Volumen, Dichte und Leitfähigkeit werden zur Charakterisierung des Verdünnungsgrades des Urins benötigt, wobei Dichte und Leitfähigkeit umgekehrt propor-

tional zum 24h-Gesamtvolumen sind, d.h. je größer das Volumen desto geringer sind Dichte und Leitfähigkeit. Das Gesamtvolumen des 24h-Sammelurins wird außerdem zur Ermittlung der täglichen Aufnahmemenge bei Fremdstoffen mit sehr geringer Verweildauer im Organismus (geringer Halbwertszeit) über die renale Ausscheidung benötigt.

Achtung: Nach jeder Messung ist der Messzylinder mit dem Urin des nachfolgenden Probanden zu spülen!

Messung des Gewichts

Vor Beginn der Messung ist die Waage zur internen Qualitätssicherung mit Eichgewichten zu kalibrieren und mit einem leeren 24h-Urinsammelgefäß zu tarieren. Die Überprüfung ist zu dokumentieren. Nach Eingang der Urinprobe des Probanden im Laborbereich ist diese zu wiegen und das Gewicht in Gramm mit einer Nachkommastelle auf dem Formblatt Probenahmeprotokoll - Urin (siehe Anhang) zu übertragen. Abweichungen (z. B. nur 20h-Sammelurin, mehrere Sammelgefäße, usw.) sind ggf. in der Spalte "Bemerkungen" einzutragen. Im Anschluss ist das Urinsammelgefäß zur gleichmäßigen Durchmischung in großen Kreisbewegungen zu schwenken.

Messung der Dichte

Zur Messung der Dichte ist ein 250 mL-PP-Messzylinder mit ca. 230 mL Urin zu füllen und anschließend das Aräometer einzutauchen. Es ist darauf zu achten, dass das Aräometer schwimmt und nicht den Boden des Messzylinders berührt. Die Dichte (g/mL) ist am Aräometer abzulesen und auf dem Formblatt Probenahmeprotokoll - Urin (siehe Anhang) mit drei Nachkommastellen einzutragen. Abweichungen sind ggf. in der Spalte "Bemerkungen" einzutragen. Nach dem Ablesen des Ergebnisses ist der Urin in einem bereitgestellten Sammelgefäß (Waste/Abfall) zu verwerfen. Zur internen Qualitätssicherung werden im Rahmen jeder Messserie jeweils die ersten drei eingehenden Urinproben mit zwei geeichten Aräometern gemessen.

Messung der Leitfähigkeit

Das Leitfähigkeitsmessgerät ist arbeitstäglich einmal vor Arbeitsbeginn mit dem entsprechenden

Standard zu kalibrieren und die Kalibrierung zu dokumentieren. Zur internen Qualitätssicherung der erhobenen Messwerte ist zudem vor und nach jeder Messreihe mit einer weiteren Standardlösung eine Qualitätskontrollmessung durchzuführen. Auch die Ergebnisse dieser Qualitätskontrollmessungen sind zu dokumentieren. Für die Messung der Leitfähigkeit ist ein ca. 100 mL-Gefäß (Standzylinder oder Becherglas) zu 3/4 mit der Urinprobe zu füllen, anschließend die Sonde des Leitfähigkeitsmessgerätes einzutauchen und die Messung zu starten. Das Ergebnis (mS/cm) ist auf dem Formblatt Probenahmeprotokoll - Urin (siehe Anhang) mit zwei Nachkommastellen einzutragen. Abweichungen sind ggf. in der Spalte "Bemerkungen" zu vermerken.

9 Probenaliquotierung

Nach Abschluss der Messung der Eingangsparameter ist das Sammelgefäß erneut in großen Kreisbewegungen zu schwenken und der Messzylinder mit der entsprechenden Urinprobe zu befüllen. Darauf folgend sind mit dem Messzylinder die dafür vorbereiteten Probengefäße (9 x 13,5 mL und 3 x 30 mL-Röhrchen) jeweils zu ca. 3/4 zu füllen. Die gefüllten Probengefäße sind auf entsprechenden Ständern (z. B. Lagersysteme des Kryotanks) zu sammeln. Dabei werden die Probengefäße entsprechend ihrer Größe einsortiert. Die Analyseröhrchen für die Elementanalytik sind separat auf einem Ständer abzulegen.

10 Kryokonservierung von Archivproben

Die Urinproben sind in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten mobilen Kryotransportbehälter einzufrieren. Die einzelnen Urin-Aliquote sind hierzu unmittelbar nach dem Aliquotieren systematisch und aufeinander folgend bei Raumtemperatur in die für die einzelnen Volumina vorgesehenen Lagerracks einzusortieren. Ist ein Lagerrack mit Urinproben gefüllt, so ist dieses unmittelbar an der dafür vorgesehenen Stelle des Kryotransportbehälters zu platzieren. Der Kryotransportbehälter ist nach dem Einbringen der Lagerracks zu schließen. Beim Einfrieren von Proben ist Schutzkleidung zu tragen

Achtung: Die Urinproben sind zur Vermeidung von Beschädigungen der Probengefäße durch zu hohe Temperaturunterschiede so im Tank zu platzieren, dass sie fern des Zulaufrohres für den Flüssigstickstoff stehen und keinesfalls mit diesem oder austretendem LIN in Berührung kommen.

Die Proben verbleiben bis zur Umlagerung in die Kryolagerbehälter im UPB Kryolager Münster/Wolbeck in diesem Kryotransportbehälter. Während des Transportes erfolgt die Stickstoffversorgung automatisch.

Zur Temperaturüberwachung der Proben dient ein im Tank integrierter Thermograph mit einem Aufzeichnungsintervall von 15 Minuten.

Vor der Einlagerung der Proben werden anhand der tatsächlichen Anzahl der gesammelten 24h-Sammelurinproben und auf Basis der in der Lagerdatenbank gegebenen Lagerstruktur Listen mit definierten Steckplätzen generiert. Anhand dieser Listen werden die Proben fortlaufend zu den zuvor eingelagerten Proben in die Lagerracks einsortiert. Bei der Umlagerung ist darauf zu achten, dass die Temperatur der gefrorenen Proben stabil bleibt und die Kühlkette nicht unterbrochen wird. Bei der Einlagerung von Proben ist Schutzkleidung zu tragen.

11 Entnahme von Proben für retrospektive Analysen

Die Entnahme von archivierten Proben der UPB bedarf der Zustimmung des UBA.

12 Literatur

BMUB (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit, Hrsg.) (2008): Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption (Stand: Oktober 2008); www.umweltprobenbank.de

DIN EN ISO/IEC 17025:2005 (2005): Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien.

Lermen, D., Schmitt, D., Bartel-Steinbach, M., Schröter-Kermani, C., Kolossa-Gehring, M., von Briesen, H., & Zimmermann, H. (2014). A New Approach to Standardize Multicenter Studies: Mobile Lab Technology for the German Environmental Specimen Bank. *PLoS one*, 9(8), e105401.

Anhang: Auszug aus dem Probenahmeprotokoll - Urin



Probenahmeprotokoll - Urin:

RTM xxx / Ort / dd. – dd. Monat 201x

Bearbeitet von: _____
(Name)

Bearbeitet am: _____
(Datum)

Probanden ID	Gewicht (g)	Dichte (g/ml)	Leitfähigkeit (mS/cm)	Bemerkung
001				
002				
003				
004				
005				
006				
007				

Sonstiges: _____

