

Vollblut und Blutplasma

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.....	4
7.3	Reinigung von Probengefäßen	4
7.4	Kennzeichnung der Probengefäße	4
8	Durchführung der Probenahme.....	4
8.1	Blutabnahme	4
8.2	Gewinnung des Blutplasma	5
9	Probenaliquotierung.....	5
10	Kryokonservierung von Archivproben	6
11	Entnahme von Proben für retrospektive Analysen.....	6
12	Literatur	6

Anhang A: Auszug aus dem Probenahmeprotokoll - Vollblut

Anhang B: Auszug aus dem Probenahmeprotokoll - Blutplasma

**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 Koordinierung 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 Vollblut- und Plasmaproben junger Erwachsener 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 Eingangsscharakterisierung der Humanproben umfasst, ein Qualitätsmanagementsystem nach DIN EN ISO/IEC 17025 etabliert (Lermen et al. 2014). Diese Richtlinie stellt einen nicht gelenkten Auszug aus diesem QM-System hinsichtlich der Probenahme und Probenverarbeitung von Vollblut- und Blutplasma-proben dar. Sie ist in dieser Form kein integrierter Bestandteil des QM-Systems.

3 Funktion der Probe

Vollblut und Blutplasma sind im Human-Biomonitoring und in der Umweltmedizin grundlegende, gut untersuchte Matrizes. In Vollblut- und Blutplasma-proben können eine Vielzahl hydrophiler und lipophiler Umweltschadstoffe und deren Metabolite analysiert werden. Je nach Substanz und deren Verteilung zwischen Blutplasma und den zellulären Bestandteilen des Vollblutes ist zu entscheiden, welche Matrix besser für die Analyse geeignet ist. Vollblutproben können unter Routinebedingungen leicht und für den Betroffenen zumutbar entnommen 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 Probandenkollektive 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 (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 MΩ*cm)
- Methanol CH₃OH 99,8 % p.a.
- Salpetersäure HNO₃ 65 % p.a. ISO verdünnt
- Heparin-Natrium 25.000 I.E./5 mL
- 8 mL, 13,5 mL und 30 mL PP-Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (Probengefäße)
- Ständer für Probengefäße

Für die Probenahme

- Flächendesinfektionsmittel
- Handdesinfektionsmittel
-
- Staumanschette
- Venenpunktionsbesteck (Fa. Sarstedt, Safty-Multifly-Set 20G, Best.-Nr.: 851.637.235)
- 20 mL Einmalspritzen (Fa. BD, Discardit II, Best.-Nr.: 300.296)
- Sterile Alkohol-Einmaltupfer
- Wundschnellverband
- Kanülenabfallbox
-
- Zellstofftupfer
- Leukosilk
- Ständer für 30 mL Probengefäße
- Vorgereinigte 13,5 mL und 30 mL Probengefäße
- Zentrifuge
- Sicherheitswerkbank (Klasse 2)
- 5 mL-Pipetten
- Ständer für 8 mL und 30 mL Probengefäße
- Vorbereitete 8 mL Probengefäße für Blutplasma
- 60 L Wiwa-Behälter eckig, BAM geprüft mit und ohne Biohazard-Kennzeichnung AVV-Schlüssel-Aufkleber
- Einmalhandschuhe

- saugfähige Einwegtücher

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.

Biologische Materialien wie Vollblut und Blutplasma gelten generell als potentiell infektiös und dürfen daher nur von dazu qualifiziertem Personal in für die biologische Schutzstufe 2 zugelassenen

Laboren bearbeitet werden. Mitarbeiter werden diesbezüglich geschult. Belehrungen, Einweisungen und Schulungen bzw. Weiterbildungen sind zu dokumentieren und zu archivieren.

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 präanalytischen 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 Gefäße 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 Röhrchenständern aufzustellen. Anschließend sind die Probengefäße in der Sicherheitswerkbank mit dem Deckel fest zu verschließen.

Vor dem Verschließen der für die Vollblutentnahme bestimmten Probengefäße ist in diese der Gerinnungshemmer Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 mL) zu geben (200 μL in 30 mL-Probengefäße und 100 μL in 13,5 mL-Probengefäße). Dies ist in einer Sicherheitswerkbank (Klasse 2) durchzuführen.

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 und, um eine Verwechslung der Gefäße während der Probenahme zu vermeiden, probandenspezifisch zu sortieren.

8 Durchführung der Probenahme

8.1 Blutabnahme

Vor Beginn der Blutabnahme ist darauf zu achten, dass die Einwilligungserklärung des Probanden vorliegt. Die Blutabnahme erfolgt unter ständiger ärztlicher Aufsicht durch zwei Teams parallel. Diese bestehen aus dem Arzt/der Ärztin selbst oder einem Assistenten (MTLA, Krankenpfleger(in), Arzthelfer(in)) für die Blutabnahme und je einer eingewiesenen Fachkraft, die das Blut aus den Spritzen in die dafür vorgesehenen Probengefäße überführen.

Die Arbeitsplätze sind vor dem Beginn der Blutabnahme so vorzubereiten, dass für alle vorgesehenen Probanden eines Probenahmetages eine ausreichende Anzahl an Einweghandschuhen, Alkoholtupfern, Venenpunktionsbestecken, 20 mL Spritzen, Wundschnellverbänden, Wattepads, Leukosilk und Probengefäßen vorhanden sind.

Pro Proband wird folgendes benötigt:

- 1 x Alkohol-Einmaltupfer
- 1-2 x Venenpunktionsbesteck
- 7 x 20 mL Einmalspritzen
- 1 x Pflaster oder alternativ Zellstofftupfer und Leukosilk
- 1 x Einmalhandschuhe
- 1 x vorgereinigtes und beschriftetes 13,5 mL Probengefäß für die Metallanalyse
- 7 x vorgereinigte und beschriftete 30 mL Probengefäße
- 10 x 8 mL vorgereinigte und beschriftete Probengefäße für die Blutplasmaproben

Bevor mit der Blutabnahme begonnen wird, sind die mit der entsprechenden Nummer für den jeweiligen Probanden versehenen Probengefäße in einen entsprechenden Probengefäßständer vorzusortieren und in die Sicherheitswerkbank zu stellen.

Das Blut ist durch dosiertes Ziehen am Spritzenstempel zu entnehmen. Dabei ist folgende Reihenfolge der Befüllung zu beachten:

- 3 x 30 mL Probengefäße mit Kennzeichnung "Zentr"
- 1 x 13,5 mL Probengefäße mit der Kennzeichnung "Analyse"
- 4 x 30 mL Probengefäße mit der Kennzeichnung "1-4, 2-4, 3-4 und 4-4".

Nachdem eine Spritze gefüllt ist, ist die Blutabnahme zu unterbrechen und die Spritze direkt an die zweite Person zur Überführung des Blutes in die 30 mL Probengefäße zu übergeben. Die leere Spritze ist sofort in dem dafür vorgesehenen Abwurfbehälter zu entsorgen. Nach dem Überführen des Blutes in das Probengefäß ist dieses mit dem dazugehörigen Deckel zügig und sorgfältig zu verschließen und zur gleichmäßigen Durchmischung des Blutes mit dem vorgelegten Natrium-Heparin sachte aber sorgfältig zu schwenken.

Abweichungen der Blutentnahme wie z. B. ein geringeres Füllvolumen der Röhren, sind auf dem Formblatt Probenahmeprotokoll - Vollblut (siehe Anhang) zu dokumentieren.

8.2 Gewinnung des Blutplasma

Pro Proband werden 3 mit 20 mL Vollblut gefüllten 30 mL Probengefäße in der Zentrifuge für 10

Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minuten und 4 °C zentrifugiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Deckel der Probengefäße richtig verschraubt sind und dass diese keine Risse aufzeigen. Ebenso ist darauf zu achten, dass die Probengefäße von außen nicht mit Blutresten verunreinigt sind. Notfalls sind diese vorsichtig mit einem mit Desinfektionsmittel getränkten Tuch zu entfernen, wobei darauf zu achten ist, dass die Beschriftung erhalten bleibt. Unter der Sicherheitswerkbank wird das Blutplasma vorsichtig mit einer 5 mL-Pipette abgenommen.

Die Probengefäße werden probandenweise sortiert und, um eine Verwechslung auszuschließen, den bereits vorbereiteten, zugehörigen 10 x 8 mL Probengefäße für Blutplasmaproben und 1 x Probenröhrchen des Cobas c111 zugeordnet (Dabei ist auch die Beschriftung/Etikettenbeschriftung zu überprüfen!).

In jedes der 8 mL Probengefäße für Blutplasmaproben werden ca. 2,5 bis 3 mL Blutplasma pipettiert.

Beim Pipettieren wird auf Abweichungen, z.B. zu wenig Blutplasma oder abweichende Charakterisierung des Blutplasmas (lipämisch, haemolytisch) geachtet und diese ggf. auf dem Probenahmeprotokoll - Blutplasma dokumentiert. Die 30 mL Probengefäße mit übrig bleibenden Blutzellen (Sediment) werden fachgerecht entsorgt.

9 Probenaliquotierung

Vollblut

Nach Eingang der Vollblutproben im Laborbereich sind diese auf Vollständigkeit (7x 30 mL, 1x 13,5 mL Vollblutprobengefäß) zu prüfen und nach Probandennummern (Probanden-ID) zu sortieren. Die Aliquote 1 bis 4 und das 13,5 mL Vollblutprobengefäß mit der Zusatzinformation "Analyse" sind auf richtige Beschriftung zu überprüfen und direkt einzufrieren.

Blutplasma

Die 8 mL Probengefäße für Blutplasma (7 Stück) mit der Aliquotinformation (z.B. 1-7, 2-7, 3-7, 4-7, 5-7, 6-7, 7-7) und die 8 mL Probengefäße für

Blutplasma mit der Zusatzinformation "Analyse" werden auf richtige Beschriftung überprüft und eingefroren.

10 Kryokonservierung von Archivproben

Die Vollblut- und Blutplasmaproben werden unmittelbar nach der Probenahme in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten mobilen Kryotransportbehälter eingefroren. Die einzelnen Aliquote werden hierzu systematisch und aufeinander folgend in die für die einzelnen Volumina vorgesehenen vorgekühlten Lagerracks im Kryotransportbehälter einsortiert. Der Kryotransportbehälter wird nach Einbringen der Lagerracks verschlossen. Beim Einfrieren von Proben ist Schutzkleidung zu tragen.

Achtung: Die Lagerracks werden zur Vermeidung von Beschädigungen der Probengefäße durch zu hohe Temperaturunterschiede so im Tank platziert, dass die Proben 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 gesammelter Vollblut- und Blutplasmaproben 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

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 A: Auszug aus dem Probenahmeprotokoll - Vollblut



Probenahmeprotokoll - Vollblut:

RTM xxx / Ort / dd. – dd. Monat 201x

Bearbeitet von: _____
(Name)

Bearbeitet am: _____
(Datum)

Probanden ID	Bearbeitet (✓)	Bemerkung
001		
002		
003		
004		
005		
006		
007		

Sonstiges: _____

Anhang B: Auszug aus dem Probenahmeprotokoll - Blutplasma



Probenahmeprotokoll - Blutplasma: RTM xxx / Ort / dd.- dd. Monat 201x

Bearbeitet von: _____ (Name) Bearbeitet am: _____ (Datum)

Probanden ID	Be- arbeitet (✓)	Bemerkung / Abweichung
001		
002		
003		
004		
005		
006		
007		

Sonstiges: _____

