

Rolf Eckard, Andreas K. Günsel, Lorenz Dobler,
Gerhard A. Wiesmüller
Umweltprobenbank des Bundes – Teilbank für Humanproben und
Datenbank
Universitätsklinikum Münster, Domagkstr. 11, D-48149 Münster

Inhaltsverzeichnis

1 Umweltprobenbank des Bundes	1
2 Ziel der Probenahme	1
3 Funktion der Probenart	1
4 Probenahmeplan	1
4.1 Bevölkerungsrepräsentanz	2
4.2 Zeitpunkt	2
5 Probenahmematerial	2
5.1 Kontaminationsrisiken	2
5.2 Reinigung	2
5.3 Präparation.....	3
5.4 Kennzeichnung der Probengefäße	3
6 Probensammlung	3
7 Charakterisierung	4
8 Probenaufbereitung	4
9 Analytik	4
9.1 Klinisch-chemische Parameter	4
9.2 Anorganische Parameter	4
9.3 Organische Parameter	4
10 Einlagerung	5
11 Entnahme der Probe zur Untersuchung	5

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

Stand: Januar 2011, V 2.0

1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) 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. 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 Ziel der Probenahme

Die Vollblut- bzw. Blutplasmaproben werden durch anamnestische Erhebungen und eingangsanalytische Untersuchungen charakterisiert und als individuelle Proben bei -150°C eingelagert.

3 Funktion der Probenart

Vollblut besteht aus mehreren Kompartimenten, wobei essentielle und akzidentelle Stoffe sich in den Einzelkompartimenten unterschiedlich verteilen. Als zentrales Verteilungskompartiment ist Vollblut die wichtigste Körperflüssigkeit im Human-Biomonitoring. Dies gilt sowohl für hydrophile als auch für lipophile Substanzklassen. Vollblut ist leicht vom Lebenden verfügbar.

In Abhängigkeit von der Verteilung eines Stoffes zwischen Blutplasma und den zellulären Bestandteilen des Blutes ist zu entscheiden, ob Analysen im Vollblut oder im Blutplasma sinnvoll sind. Deshalb wird bei der Probenahme aus einem Teil der Blutprobe Blutplasma gewonnen, ein Kompartiment des Vollbluts ohne Zellbestandteile, die wichtigste Körperflüssigkeit der klinischen Diagnostik. Die Gehalte der essentiellen Spuren- und Bulk-Elemente im Vollblut wie im Blutplasma sind homöostatisch geregelt. Die Gehalte nicht-essentieller und nicht-physiologischer Substanzen stehen weitgehend im Gleichgewicht mit der Gesamtkörperbelastung. Auf Grund des Lipid-Gehaltes können im Vollblut/Blutplasma auch fettlösliche organische Xenobiotika bestimmt werden. Blutplasma ist ein leicht verfügbares Kompartiment vom Lebenden.

4 Probenahmeplan

Beim Aufstellen eines Probenahmeplans im Humanbereich muss berücksichtigt werden, dass die Proben nur mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission und der schriftlichen Zustimmung des Probanden und nur von autorisierten Personen genommen werden können. Weiterhin ist die Probenahme an die Vorgaben der Regelungen zur Blutspende gebunden. Dies schließt auch die Verwendung steriler Einwegprodukte ein, die dem Medizinproduktegesetz unterliegen.

Der Probenahmeplan kann folglich nur sehr allgemeine Rahmenbedingungen festlegen.

Für eine ausreichende Charakterisierung der Probe ist die Erhebung umfassender individueller anamnestischer Daten unerlässlich. Die Fragebogenerhebung trägt neben der soziodemographischen Charakterisierung der Probanden zur Expositionsabschätzung und zur Interpretation der durch das Human-Biomonitoring gewonnenen Daten bei.

In diesem Zusammenhang stehen nicht nur die Verhaltensweisen der Probanden im Hinblick auf mögliche Expositionsquellen im

Mittelpunkt, sondern auch Fragen zur Wohnlage und zu den Ernährungsgewohnheiten.

Der Fragebogen ist zum Selbstausfüllen konzipiert. Er setzt sich aus einem allgemeinen und einem spezifischen Teil zusammen.

Im ersten Teil werden überwiegend anthropometrische Daten (z.B. Alter, Größe, Gewicht, Geschlecht) der Teilnehmer erfragt. Darüber hinaus klärt dieser Teil des Fragebogens die gängigen personenbeschreibenden Daten der teilnehmenden Probanden.

Der zweite Teil erfasst neben Parametern des gesundheitlichen Status Fragen zu Ernährungsgewohnheiten, Medikamentengebrauch und Umweltexpositionen sowie die Abfrage möglicher Grunderkrankungen.

4.1 Bevölkerungsrepräsentanz

Durch die Wahl studentischer Probandenkollektive werden gesunde junge Menschen beiderlei Geschlechts im Alter von 20 bis 29 Jahren erfasst. Die soziodemographisch relativ einheitliche Struktur der Kollektive erlaubt retrospektive Untersuchungen zum Trendverhalten einer substanziellen Fremdstoffbelastung beim Menschen mit nur einer relativ geringen Probandenzahl. Überdies ist bei studentischen Kollektiven der lokale Einfluss der Probenahmestandorte relativ gering.

4.2 Zeitpunkt

Es wird jährlich fortlaufend für eine aktuelle Trendanalyse (Real-Time-Monitoring; RTM) wie auch für die Einlagerung bei -150 °C zur retrospektiven Analytik in der ersten Jahreshälfte je ein Probenahmetermin in Münster, Greifswald, Halle/Saale und Ulm mit je ca. 120 Probanden durchgeführt.

5 Probenahmematerial

- 20 ml Einmalspritze (BD Discardit II (Becton-Dickinson))
- Venenpunktionsbesteck (Safety Multifly 85.1637.235 (Sarstedt))
- Sterile Alkohol-Einmaltupfer (Alcohol Pads Braun)
- 30 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel (Sarstedt 60.544)
- 13,5 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel (Sarstedt 60.541.003)
- 7 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel (Sarstedt 60.542)
- Laborpipetten mit entsprechenden Spitzen
- Reinraumarbeitsplatz Klasse 100
- Vakuumschweißgerät
- Polyethylengefrierbeutel
- Thermodrucker
- Cryobeständige Etiketten
- Wasserfester Faserstift
- Heparinlösung
- 2%ige Salpetersäure (hergestellt aus 65%iger Salpetersäure p.a.)
- Methanol für die Rückstandsanalytik
- Bidestilliertes bzw. entionisiertes Wasser (18 MOhm-Wasser)

5.1 Kontaminationsrisiken

Die Kontaminationsgefahr durch die Edelstahlkanülen (Chrom und Nickel) oder durch andere Fremdstoffe beispielsweise der Schlauchverbindungen des Venenpunktionsbestecks (Safety Multifly 85.1637.235 (Sarstedt)) wird minimiert, indem die zuerst gezogenen 20 ml Vollblut nur für die direkte Analyse der anthropogenen organischen Anteile verwendet werden. Weitergehende Maßnahmen lassen sich wegen der notwendigen sterilen Bedingungen bei der Blutentnahme nicht durchführen.

5.2 Reinigung

Pro Proband werden zur Blutentnahme für die Eingangsanalytik und zur Tiefkühlagerung von

Blut- und Blutplasma-Proben insgesamt 18 Probengefäße benötigt. Alle Gefäße werden gleichzeitig gereinigt, um mögliche herstellungsbedingte Kontamination zu entfernen.

Zur Entfernung möglicher organischer Kontaminanten werden die Probengefäße zur Hälfte mit Methanol gefüllt, geschlossen, 15 s geschüttelt, geleert und zur Verdunstung der letzten Lösungsmittelreste offen unter die Clean bench gestellt. Bis zur weiteren Verwendung werden die Gefäße verschlossen gelagert.

Zur Entfernung möglicher anorganischer Kontaminanten werden die Probengefäße mit 2%iger Salpetersäure (aus 65%iger Salpetersäure p.a. durch Verdünnen mit Reinstwasser hergestellt) bis zum Rand gefüllt, mit einem Stopfen verschlossen, geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Anschließend werden die Gefäße inklusive Stopfen dreimal mit Reinstwasser gewaschen und an einem Reinraum-Arbeitsplatz (Clean bench; Reinraumklasse 100) offen getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung werden sie verschlossen gelagert.

Folgende Probengefäße werden verwendet:

- 7 x 30 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel (Sarstedt 60.544)
- 1 x 13,5 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel (Sarstedt 60.541.003)
- 10 x 7 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel (Sarstedt 60.542)

5.3 Präparation

Zur Verhinderung der Blutgerinnung werden alle Vollblut-Probengefäße mit Heparin-Lösung versetzt. (Heparin 25.000 ratiopharm; 1 ml enthält 25.000 I.E. Natriumheparinat (Mucosa) sowie als antimikrobielles Konservierungsmittel 1% Benzylalkohol). Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze (1 ml Einmalspritze), die vorher mit Heparinlösung gespült wird, werden innerhalb des Reinraum-Arbeitsplatzes die 13,5 ml Röhrchen mit 1 Tropfen, die 30 ml Röhrchen mit 2 Tropfen des Antikoagulans

versetzt. Die Röhrchen bleiben bis kurz vor der Entnahme verschlossen.

5.4 Kennzeichnung der Probengefäße

Alle Probengefäße werden nach der Reinigung und Präparation mit auf einem croybeständigen Etikett gedrucktem Barcode beschriftet. Der Code enthält die fortlaufende Nummer des RTM-Termins sowie die Probandennummer. Alternativ kann die Beschriftung auch mit einem wasserfesten Faserstift erfolgen.

6 Probensammlung

Die Kubitalvene des Probanden wird mit einem sterilen Alkohol- Einmaltupfer (70% Äthanol oder Isopropanol v/v) gereinigt. Vor der Punktion muss die Einstichstelle gut abgetrocknet sein. Um Reaktionen von Seiten des Kreislaufs vorzubeugen, liegt der Proband während der Blutentnahme. Die Punktion erfolgt mit handelsüblichen Edelstahl-Kanülen 1,2 x 40 mm oder einem Venenpunktionsbesteck durch dazu autorisierte Personen. Der relativ große Durchmesser der Kanülen ist erforderlich, um hämolytische Reaktionen während der Entnahme zu vermeiden. Das Venenpunktionsbesteck ist zu bevorzugen, da die Kanüle ruhig liegen bleibt und die Venengefäßwand geschont wird. Von jedem Probanden werden ca. 150 ml Vollblut entnommen. Die Proben werden mit einer 20 ml Einmalspritze langsam gezogen und direkt in die Probengefäße überführt.

Nach folgendem Schema wird während der Entnahme subportioniert:

1. 30 ml-Röhrchen (7x), 7 x 20 ml Spritze, Vollblut
2. 13,5 ml-Röhrchen, tropfen (ca. 5 ml), Vollblut (Elementanalytik)

Die Reihenfolge ist bindend, Abweichungen während der Probenahme sind im Probenprotokoll Vollblut zu dokumentieren.

Zur gleichmäßigen Verteilung des Heparins werden die geschlossenen Röhrchen direkt nach der Probenahme geschwenkt (nicht geschüttelt: Hämolyse!)

Die Röhrchen sind erst kurzfristig vor der Füllung zu öffnen. Auf keinen Fall sollen die Probenröhrchen während der gesamten Blutentnahme offen stehen.

Falls das spontane Abtropfen Schwierigkeiten bereitet, werden alle Vollblutproben langsam mit 20 ml Einmal-Spritzen gezogen und sofort in die entsprechenden Gefäße überführt. Die gewonnenen Vollblutproben in 3 x 30 ml Röhrchen werden nach Abnahme in einer Laborzentrifuge bei 3000 bis 3100 Umdrehungen pro Minute 10 min zentrifugiert. Die Trennung Blutplasma/Zellfraktion muss spätestens 2 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt werden, um eine Hämolyse weitgehend auszuschließen. Die Blutplasma-Phase wird mit handelsüblichen Pipetten und Pipettenspitzen (z. B. Fa. Eppendorf), die zuvor einmal mit bidestilliertem Wasser gespült werden, abgetrennt und portioniert.

Aus den ca. 30 ml Blutplasma entstehen die folgenden Aliquote:

- 7 x 2,5-3,0 ml Blutplasma für die Lagerung (in 7 ml Röhrchen)
- 2 x 2,5-3,0 ml Blutplasma für die Elementanalytik (in 7 ml-Röhrchen)
- 1 x 2,5-3,0 ml Blutplasma für die klinische Analytik (in 7 ml-Röhrchen)

7 Charakterisierung

Die Charakterisierung der Probe erfolgt durch anamnestische Datenerhebung (s. Erhebungsbogen und Datenblatt Zahnstatus im Anhang), Eingangsanalytik und der Zuordnung zu RTM-Termin und Probandennummer.

8 Probenaufbereitung

Zur Einlagerung bei -150°C sind bestimmt:

- 4 x ca. 20 ml Vollblut (4 x 30 ml-Röhrchen)
- 7 x ca. 2,5 ml Blutplasma (7 x 7 ml-Röhrchen)

Für die Eingangsanalytik stehen zur Verfügung:

- 3 x ca. 2,5-3,0 ml Blutplasma
- 1 x ca. 5 ml Vollblut

9 Analytik

9.1 Klinisch-chemische Parameter

Im Blutplasma werden die ausgewählten physiologischen Parameter Cholesterin, Triglyceride und Creatinin als potentiell modulierende Faktoren der intrakorporalen Schadstoffbelastung mittels üblicher klinischer Verfahren photometrisch bestimmt.

9.2 Anorganische Parameter

Für die Direktanalyse werden ca. 5 ml Vollblut und 1 x ca. 2,5-3,0 ml Blutplasma nach laborüblicher Verfahrensweise für die Analyse vorbereitet. Gemessen wird ein umfassendes Raster an essentiellen und akzidentellen Elementen, hier insbesondere Arsen, Blei, Cadmium und Quecksilber.

9.3 Organische Parameter

Folgende anthropogene organische Fremdstoffe werden im Rahmen der Eingangsanalytik im Blutplasma (1 x ca. 2,5-3,0 ml-Röhrchen) erfasst:

- Pentachlorphenol (PCP)
- Hexachlorbenzol (HCB)
- 2.2'.3.4.4'.5'-Hexachlor-biphenyl (PCB 138)

- 2.2'.4.4'.5.5'-Hexachlor-biphenyl
(PCB 153)
- 2.2'.3.4.4'.5.5'-Heptachlor-biphenyl
(PCB 180)

10 Einlagerung

Die Probengefäße werden bei auswärtigen Probenahmetagen jeweils am Abend des Entnahmetages bei -150°C in transportable LN_2 -Cryobehälter eingefroren und in gefrorenem Zustand in die Spezial-Aluminium-Racks der Cryogefäße der Probenbank überführt. Für den Transport werden die Proben in Polyethylengefrierbeutel verpackt und eingeschweißt.

11 Entnahme der Probe zur Untersuchung

Die Entnahme einer eingelagerten Probe zur retrospektiven Untersuchung bedarf der Zustimmung des Umweltbundesamtes.