



Richtlinie zur Charakterisierung von Humanproben

Analyse klinisch-chemischer Parameter



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	Anwendungsbereiche.....	2
4	Beschreibung der Methodik.....	2
5	Geräte, Reagenzien und Materialien	3
5.1	Analysegerät	3
5.2	Reagenzien und Materialien	3
6	Durchführung	4
6.1	Messung von Analyten.....	4
6.2	Kalibration und interne Qualitätskontrolle	4
6.3	Methodenvalidierung.....	4
6.4	Externe Qualitätskontrolle	4
7	Dokumentation	4
8	Literatur	5

**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 photometrischen Bestimmung ausgewählter klinisch-chemischer Parameter in 24h-Sammelurin und Blutplasma beschrieben.

2014 wurde für den vom Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) betriebenen Bereich der UPB, der die Sammlung, Lagerung und Eingangskarakterisierung der Humanproben umfasst, ein 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 Analyse ausgewählter klinisch-chemischer Parameter dar. Sie ist in dieser Form kein integrierter Bestandteil dieses QM-Systems.

3 Anwendungsbereiche

Diese Richtlinie beschreibt das Vorgehen zur photometrischen Bestimmung der Konzentrationen an Cholesterin (CHO), Gesamt-Protein (TP) und Triglyceriden (TRIGLY) in Blutplasma und an Kreatinin in Blutplasma (CRE) und 24h-Sammelurin (CRE-U) der UPB.

Die für die jeweiligen Analyten definierten Anwendungsbereiche und Nachweisgrenzen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Humane Probenmaterialien, deren Infektionsstatus nicht weiter charakterisiert ist, gelten generell als potentiell infektiös. Beim Umgang mit diesen sind die Vorgaben der Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen (BioStoffV) strikt zu befolgen. Die Arbeiten sind daher in einem Labor der Biologischen Sicherheitsstufe 2 (BSL2) durchzuführen und die entsprechende Schutzkleidung ist zu tragen.

4 Beschreibung der Methodik

Die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter erfolgt photometrisch mittels Cobas c111 Analyzer der Fa. Roche.

Das Cobas c111 System bestimmt den Absorptionwert in der Probenflüssigkeit durch Absorptionsphotometrie. Anhand der Absorption wird die Konzentration des gesuchten Analyten in der Lösung berechnet. Der Bestimmung liegen folgende chemisch-physikalische Prinzipien zugrunde.

Cholesterin (CHO)

CHOD-PAP Methode - Die Cholesterinester werden unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäure gespalten. Die Cholesterinoxidase katalysiert die Oxidation von Cholesterin zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit Aminoantipyrin und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff. Die Intensität des gebildeten Farbstoffes ist direkt proportional zur Cholesterinkonzentration.

Gesamt-Protein (TP)

Biuret Methode - Zweiwertiges Kupfer reagiert in alkalischer Lösung mit den Peptidbindungen von Proteinen zum charakteristischen purpurfarbenen Biuret-Komplex. Zur Verhinderung der Ausfällung von Kupferhydroxid wird der Reaktion Kaliumnatriumtartrat zugeführt. Die Zugabe von Kaliumiodid verhindert die Autoreduktion von Kupfer.

Die Intensität der Biuret-Farbreaktion ist direkt proportional zum Gesamtproteingehalt.

Kreatinin (CRE, CRE-U)

Jaffe Methode - In alkalischer Lösung bildet Kreatinin mit Pikrinsäure einen gelb-orange gefärbten Komplex. Die Bildungsgeschwindigkeit des Farbstoffes ist proportional zur Kreatininkonzentration.

Triglyceride (TRIGLY)

GPO-PAP Methode - Lipoproteinlipase hydrolysiert Triglyceride zu Glycerin. Eine anschließende Oxidation führt zur Bildung von Dihydroacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol in einer Endpunktreaktion nach Trinder einen roten Farbstoff. Die Intensität des gebildeten roten Farbstoffs ist direkt proportional zur Triglyceridkonzentration.

5 Geräte, Reagenzien und Materialien

5.1 Analysegerät

Cobas Analysesystem, Modell: c111
Hersteller: Roche Diagnostics GmbH

5.2 Reagenzien und Materialien

Cobas c 111 spezifische Materialien

Cobas c 111 Microküvetten-Segment
RD Standard False Bottom Tube
Screw Cap for False Bottom Tube

Testspezifische Reagenzien

Die testspezifischen Reagenzien sind gebrauchsfertige Lösungen der Fa. Roche. Für die Bestimmung der o.g. Analyten werden folgende Reagenzien verwendet:

- Cholesterin (Ref.-Nr.: 04718917190)
- Gesamtprotein (Ref.-Nr.: 04657586190)
- Kreatinin (Ref.-Nr.: 05401755190)
- Triglyceride (Ref.-Nr.: 04657594190)

Nullkalibrator

Als Nullkalibrator wird Reinstwasser (> 18,2 MΩ*cm) verwendet.

Kalibrator

Calibrator f.a.s., Best.Nr. 10759350

Tabelle 1: Anwendungsbereiche

Analyt	Matrix	Messbereich	Untere Nachweisgrenze	Normalbereich
Triglyceride	Blutplasma	8,85 - 885 mg/dL	8,85 mg/dL	< 150 mg/dL
Gesamtprotein	Blutplasma	2,0 – 120 g/L	2,0 g/L	66 – 87 g/L
Cholesterin	Blutplasma	9,7 – 800 mg/dL	9,7 mg/dL	< 200 mg/dL
Kreatinin	Blutplasma	0,2 – 12,4 mg/dL	0,2 mg/dL	0,50 – 0,90 mg/dL (w) 0,70 – 1,20 mg/dL (m)
	24h-Sammelurin	0,31 – 368 mg/dL	0,31 mg/dL	740 - 1570 mg/24 h (w) 1040 – 2350 mg/24 h(m)

Qualitätskontrolle

Precinorm U, Best.Nr. 10171735

Precipath U, Best.Nr. 10171760

6 Durchführung

Der Cobas c111 Analyzer ist nach den Anweisungen des Herstellers in Betrieb zu nehmen und einzustellen.

6.1 Messung von Analyten

Zur Messung eines Analyten in einer Matrix sind ca. 1 mL der Matrix in ein vorbereitetes Cobas-Probenröhrchen (RD Standard False Bottom Tube) zu pipettieren. Das Probenröhrchen ist in den Cobas c111 Analyzer einzusetzen, der gewünschte Test im Bedienmenü auszuwählen und die Messung zu starten. Die Messung erfolgt vollautomatisch.

6.2 Kalibration und interne Qualitätskontrolle

Zur Sicherung der Messgenauigkeit ist arbeits-täglich vor jeder Messserie eine Kalibration des Gerätes durchzuführen.

Um die Richtigkeit der Messergebnisse zu prüfen und abzusichern, sind darüber hinaus vor jeder Messserie und nach Abschluss jeder Messserie interne Qualitätskontrollmessungen aller Messparameter durchzuführen.

Liegen die Messwerte der Qualitätskontrollen nach Abschluss einer Messserie außerhalb des Toleranzbereiches oder treten sonstige Unregelmäßigkeiten auf (z.B. gehäufte Fehlermeldungen des Cobas c111 Analyzer), so ist die Analyse der Proben dieser Messserie zu wiederholen und der Laborleiter zu informieren.

6.3 Methodvalidierung

Die Validierung der Methode richtet sich nach den Anforderungen aus der Norm DIN EN ISO/IEC 17025:2005 und der darauf basierenden DAkkS-Richtlinie 71 SD 4 019 (Revision:

1.1, 14. Januar 2015). Hierzu sind in einem Validierungsplan die zu ermittelnden Verfahrenskenngrößen festzulegen. Für die Bestimmung klinisch-chemischer Parameter sind folgende Verfahrenskenngrößen zu ermitteln:

Präzision

- Wiederholpräzision
- Laborpräzision
- Vergleichspräzision

Richtigkeit

Robustheit

Spezifität/Selektivität

Die ermittelten Verfahrenskenngrößen sind in einem Validierungsbericht darzustellen und zu bewerten. Die Methode bedarf nach erfolgter Bewertung für den Anwendungsbereich der Freigabe durch den Laborleiter.

6.4 Externe Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung und externen Qualitätssicherung der ermittelten Messwerte der klinisch-chemischen Parameter ist die Teilnahme an Eignungsprüfungen unerlässlich. Die Teilnahme an einer externen Qualitätskontrolle richtet sich nach den Vorgaben der RiLiBäk. Hierzu wird einmal jährlich vor Beginn der Probenahmen (im Oktober) an einem organisierten Ringversuch (Instand e.V.) teilgenommen. Darüber hinaus werden jährlich Vergleichsprüfungen organisiert. Hierbei werden nach Abschluss einer Probenahme ca. 20 % der noch nicht eingefrorenen Proben (25 Proben pro Matrix) gekühlt (2-8°C) an ein akkreditiertes Labor zur Vergleichsprüfung gesendet.

7 Dokumentation

Die Ergebnisse der Kalibrationen und Qualitätskontrollmessungen sind zu dokumentieren. Zu erfassen sind hierbei Datum und Uhrzeit der Kalibration/Messung, eventuelle Abweichungen, zusätzliche Bemerkungen und der Bearbeiter. Alle Aufzeichnungen sind zu archivieren.

Die im Cobas c 111 gespeicherten Analyseergebnisse sind nach jeder Messserie aus dem Gerät auszulesen, auf Plausibilität zu prüfen

und redundant zu sichern. Parallel zur digitalen Datensicherung druckt das Cobas c 111 Analysesystem automatisch jeden Messwert aus. Die Ausdrucke der Analysenergebnisse sind zusätzlich zu archivieren.

Da die Analyse klinisch-chemischer Parameter von Humanproben der UPB im Rahmen der Probenahmen vor Ort am Probenahmestandort und unmittelbar nach Eintreffen der Proben im mobilen Labor erfolgen, sind Abweichungen von der geltenden Richtlinie im Bericht zur jeweiligen Probenahme zu dokumentieren. Die Berichte sind zu archivieren.

8 Literatur

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

DAkkS Regel 71 SD 4 019 (2015): Validierung und Verifizierung von Prüfverfahren nach den Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 für Prüflaboratorien auf dem Gebiet der chemischen und chemisch-physikalischen Analytik im Bereich der Abteilung 4 (Gesundheitlicher Verbraucherschutz | Agrarsektor | Chemie | Umwelt).

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.