

DIN EN ISO 17099



ICS 13.280

**Strahlenschutz –
Durchführungskriterien für Laboratorien für die Anwendung des
zytokinese-geblockten Mikrokerntests (cytokinesis-blocked micronucleus,
CBMN) in Lymphozyten des menschlichen peripheren Blutes im Rahmen
der biologischen Dosimetrie (ISO 17099:2014);
Deutsche Fassung EN ISO 17099:2017**

Radiological protection –

Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay
in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry (ISO 17099:2014);

German version EN ISO 17099:2017

Radioprotection –

Critères de performance pour les laboratoires pratiquant la dosimétrie biologique par le test
des micronoyaux avec blocage de la cytodivision (CBMN) dans les lymphocytes du sang
périphérique (ISO 17099:2014);

Version allemande EN ISO 17099:2017

Gesamtumfang 43 Seiten

DIN-Normenausschuss Radiologie (NAR)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument enthält die deutsche Übersetzung der Norm EN ISO 17099:2017, in die der Inhalt des internationalen Schriftstücks ISO 17099:2014 „Radiological protection — Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry“ unverändert übernommen wurde.

Der Text von ISO 17099:2014 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 85 „Nuclear energy, nuclear technologies, and radiological protection“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 17099:2017 durch das Technische Komitee CEN/TC 430 „Nuclear energy, nuclear technologies, and radiological protection“ übernommen, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Die Bedeutung der spezifischen ISO-Begriffe und -Bezeichnungen, die sich auf die Feststellung der Regelkonformität beziehen, sowie das von der ISO praktizierte Vorgehen zur Einhaltung der Grundsätze der WTO im Hinblick auf Handelshemmnisse (TBT) sind dargelegt in URL: http://www.iso.org/iso/home/standards_development/resources-fo-technical-work/foreward.htm.

Für das vorliegende Dokument ist das nationale Gremium NA 080-00-01 AA „Dosimetrie“ des DIN-Normenausschusses Radiologie (NAR) in Arbeitsgemeinschaft mit der Deutschen Röntgengesellschaft und in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. (DGN), der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Physik e.V. (DGMP) und der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie e.V. (DEGRO) zuständig.

Deutsche Fassung

**Strahlenschutz —
Durchführungskriterien für Laboratorien für die Anwendung
des zytokinese-geblockten Mikrokerntests (cytokinesis-
blocked micronucleus, CBMN) in Lymphozyten des
menschlichen peripheren Blutes im Rahmen der biologischen
Dosimetrie (ISO 17099:2014)**

Radiological protection —
Performance criteria for laboratories using the
cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in
peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry
(ISO 17099:2014)

Radioprotection —
Critères de performance pour les laboratoires
pratiquant la dosimétrie biologique par le test des
micronoyaux avec blocage de la cytodierèse (CBMN)
dans les lymphocytes du sang périphérique
(ISO 17099:2014)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 13. September 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Begriffe und Definitionen	7
3 In dieser Norm angewendete Methodik des Mikrokerntests	10
3.1 Allgemeines	10
3.2 Allgemeine Laboranforderungen	10
3.3 Analysenauftrag und Blutentnahme	11
3.4 Zellkultivierung	11
3.5 Färben	12
3.6 Mikroskopie	12
3.7 Visuelle Auswertung der Objektträger	12
3.7.1 Allgemeines	12
3.7.2 Auswertekriterien	13
3.7.3 Auswerteprotokolle	14
3.8 Automatisierte Analyse	14
4 Vertraulichkeit von persönlichen Angaben	14
4.1 Überblick	14
4.2 Anwendungen der Vertraulichkeitsgrundsätze	14
4.2.1 Übertragung von Verantwortlichkeiten innerhalb des Labors	14
4.2.2 Aufträge zu Analysen	14
4.2.3 Übermittlung vertraulicher Informationen	15
4.2.4 Anonymität von Proben	15
4.2.5 Berichterstattung der Ergebnisse	15
4.2.6 Aufbewahrung	15
5 Labor-Sicherheitsanforderungen	15
5.1 Überblick	15
5.2 Mikrobiologische Sicherheitsanforderungen	15
5.3 Sicherheitsanforderungen für Chemikalien	16
5.4 Optische Sicherheitsanforderungen	17
5.5 Sicherheitsplan	17
6 Kalibrierquelle(n), Kalibrierkurve und kleinste auflösbare Dosis	17
6.1 Kalibrierquelle(n)	17
6.2 Kalibrierkurve	18
6.3 Hintergrundhäufigkeit von Mikrokerneln	19
6.4 Messung der kleinsten auflösbaren Dosis	19
7 Verantwortung des Auftraggebers	19
8 Verantwortung des CBMN-Labors	20
8.1 Aufbau und Aufrechterhaltung des QS-Programms	20
8.2 Verantwortlichkeit während der Dienstleistung	20
9 Unfallbedingte erhöhte Strahlenbelastung weniger Personen	21
9.1 Auswerteverfahren von Mikrokerneln in zweikernigen Zellen	21

9.1.1	Kodierung von Proben und Objektträgern	21
9.1.2	Auswertetechniken.....	21
9.1.3	Fachkenntnisse des Labors bezüglich der Auswertung	22
9.2	Kriterien für die Umwandlung der ausgewerteten Häufigkeit an Mikrokernen in eine Abschätzung der absorbierten Dosis	22
9.2.1	Überblick	22
9.2.2	Vergleich mit Kontrollen	22
9.2.3	Bestimmung der abgeschätzten Dosis und des Konfidenzintervalls	22
9.2.4	Fälle nach akuter und nicht akuter Exposition	23
9.2.5	Prüfung der Verteilung von Mikrokernen je zweikernige Zelle	23
9.3	Berichterstattung der Ergebnisse	23
9.3.1	Allgemeines	23
9.3.2	Inhalt des Berichts (hinsichtlich eines Standardformulars siehe Anhang E)	24
9.3.3	Interpretation der Ergebnisse	24
10	Triage der Bevölkerung	25
10.1	Allgemeines	25
10.2	Nutzung eines Netzwerks für CBMN Tests bei großen Strahlenunfällen.....	25
10.3	Verfahren zur Auswertung von Mikrokernen in zweikernigen Zellen.....	25
10.4	Kriterien für die Umwandlung der ausgewerteten Häufigkeit von Mikrokernen in eine Abschätzung der absorbierten Dosis	25
10.5	Berichterstattung der Ergebnisse	26
11	Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle	26
11.1	Überblick	26
11.2	Qualitätssicherung.....	26
11.2.1	Qualitätssicherungsplan.....	26
11.2.2	Für die Qualitätssicherung verantwortliche Person oder Organisation	26
11.3	Qualitätskontrolle	26
11.3.1	Allgemeines	26
11.3.2	Verfahren zur Qualitätskontrolle.....	26
11.3.3	Überprüfungen der Integrität des Probentransports.....	27
11.3.4	Überprüfung der Unversehrtheit der Proben durch das CBMN-Labor.....	27
11.3.5	Überprüfungen der Geräteausstattung	27
11.3.6	Überprüfungen des Probenprotokolls	27
11.3.7	Überprüfungen der Probenauswertung	28
11.3.8	Überprüfungen der Dosisabschätzung und des Konfidenzintervalls	28
11.3.9	Überprüfung der Zusammenstellung des Ergebnisberichts	28
Anhang A (informativ) Auswerteprotokoll zur Dokumentation von Mikrokernen in zweikernigen Zellen		29
Anhang B (informativ) Automatisierung der Auswertung von Mikrokernen.....		30
Anhang C (informativ) Anweisungen für Auftraggeber (Muster).....		32
Anhang D (informativ) Muster — Fragebogen		34
Anhang E (informativ) Muster — Berichterstattung — Einzelperson		36
Anhang F (informativ) Muster — Berichterstattung — Gruppe.....		37
Literaturhinweise.....		39

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 17099:2014 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 85 „Nuclear energy, nuclear technologies, and radiological protection“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 17099:2017 durch das Technische Komitee CEN/TC 430 „Kernenergie, Kerntechnik und Strahlenschutz“ übernommen, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis April 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 2018 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 17099:2014 wurde von CEN als EN ISO 17099:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: Foreword — Supplementary information.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 85, *Nuclear energy, nuclear technologies, and radiological protection*, Unterkomitee SC 2, *Radiological protection*.

Einleitung

Der Zweck dieser Internationalen Norm besteht darin die Durchführung des Zytokinese geblockten Mikrokerntests (Cytokinesis — Blocked MicroNucleus tests, CBMN) in menschlichen peripheren Blut-Lymphozyten im Rahmen der biologischen Dosimetrie nach Exposition mit ionisierender Strahlung festzulegen. Dieser Test soll bei unfallbedingter oder böswillig erfolgter Strahlenexposition eingesetzt werden, wobei a) im Falle weniger betroffener Personen eine individuelle Dosisabschätzung bereitgestellt werden soll, oder b) im „Triage-Modus“ für Bevölkerungsgruppen vorläufige Dosisabschätzungen für Einzelpersonen erfolgen sollen.

Der CBMN-Test stellt eine alternative zytogenetische Technik dar, die einfacher und gegebenenfalls schneller durchzuführen ist als die dizentrischen Chromosomenanalyse (ISO 19238:2014, ISO 21243:2008). Er wird routinemäßig auch für den Nachweis einer Exposition mit anderen genotoxischen Stoffen neben ionisierender Strahlung eingesetzt, dies ist aber nicht Gegenstand der hier vorliegenden Internationalen Norm. Obwohl die Kultivierung der Blutproben etwas länger dauert als bei der dizentrischen Chromosomenanalyse, ist die Analyse von Mikrokernen in binuklearen Lymphozyten einfacher.

Wie auch für die dizentrischen Chromosomenanalyse, wurde der CBMN-Test für den Notfall nach großen Strahlenunfällen mit vielen Opfern mit der „Triage-Auswertung“ angepasst. Das für die Auswertung einer ausreichenden Anzahl von zweikernigen Zellen erforderliche Blutvolumen ist ähnlich dem für die Analyse dizentrischer Chromosomen. Die schnellere Auswertgeschwindigkeit für Mikrokernen gleicht die längere Kultivierungsdauer aus. Außerdem kann der CBMN-Test im automatisierten Modus durchgeführt werden.

Diese Internationale Norm stellt eine Leitlinie für die Durchführung des CBMN-Tests zur Dosisabschätzung unter Anwendung dokumentierter und validierter Verfahren bereit. Die Dosisabschätzung unter Anwendung des CBMN-Tests ist bei medizinischen Verfahren, im Strahlenschutzmanagement, beim Einhalten von Aufzeichnungen und in Bezug auf medizinische Anforderungen/gesetzliche Bestimmungen von Bedeutung. Diese Internationale Norm ist entsprechend der Anwendung des CBMN-Tests in zwei Teile unterteilt: Strahlenexposition von wenigen Einzelpersonen oder Triage von einer großen Anzahl von Personen bei einem großen radiologischen Ereignis.

Ein Teil der hier enthaltenen Informationen ist ebenfalls in anderen internationalen Leitlinien und wissenschaftlichen Veröffentlichungen, vor allem in Technischen Berichten der IAEA (International Atomic Energy Agency) zur biologischen Dosimetrie enthalten. Diese Internationale Norm setzt seinen Schwerpunkt auf die Erweiterung und Normung der Bereiche Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle sowie die Kriterien zur Akkreditierung und die Beurteilung der Durchführung. Diese Internationale Norm stimmt weitgehend mit ISO/IEC 17025 *“General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”* überein, unter besonderer Berücksichtigung der spezifischen Anforderungen der biologischen Dosimetrie. Die in dieser Internationalen Norm angeführte Angabe zu Unsicherheiten bei der Dosisabschätzung entspricht dem „ISO-guide for the expression of uncertainty in measurement“ (ISO Guide zur Angabe der Unsicherheit beim Messen) (früher GUM) und ISO 5725 (alle Teile).

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm behandelt folgende Aspekte:

- a) die Vertraulichkeit von persönlichen Angaben, in Bezug auf Auftraggeber und Labor;
- b) Labor-Sicherheitsanforderungen;
- c) Strahlenquellen, Dosisleistungen und -bereiche, welche für die Erstellung der Referenz-Dosis-Wirkungskurven verwendet werden, die als Grundlage für die Dosisabschätzung mit Hilfe der Ergebnisse des CBMN Test benutzt werden, sowie die niedrigste nachweisbare Dosis;
- d) Durchführung der Blutentnahme, Kultivierung, Aufarbeitung und Probenpräparation für den CBMN-Test;
- e) Auswertekriterien;
- f) Abschätzung der absorbierten Dosis anhand der Häufigkeit von Mikrokernen in zweikernigen Zellen;
- g) Berichterstattung der Ergebnisse;
- h) Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle;
- i) informative Anhänge Musterfragebogen, Musteranweisungen für Auftraggeber, Musterdatenblatt für die mikroskopische Auswertung, Bericht und Hinweise über Stärken und Grenzen der derzeit verfügbaren automatisierten Systemen zur Auswertung von Mikrokernen.

2 Begriffe und Definitionen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

2.1

azentrisches Chromosom(enfragment)

Chromosomenfragment unterschiedlicher Größe

Anmerkung 1 zum Begriff: Wenn es unabhängig von einem dizentrischen Chromosom oder zentrischen Ringchromosom gebildet wird, wird es üblicherweise als überzähliges azentrisches Fragment bezeichnet.

2.2

Hintergrundwert

spontane Ausbeute (oder Anzahl) von in Kontrollproben oder Individuen aufgezeichneten Kleinkernen

2.3

systematische Abweichung

statistischer Probenahme- oder Prüffehler, bedingt durch systematische Bevorzugung einiger Ergebnisse gegenüber anderen

2.4

binukleare Zellen

Zellen, die nach mitogener Stimulation eine Kernteilung abgeschlossen haben, und Zelltyp, worin Mikrokerne bewertet werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Binukleare Zellen werden in der Kultur unter Verwendung von Cytochalasin-B angereichert, ein Inhibitor der Zytokinese (Zellteilung).

2.5

CBMN-Labor

Labor, das biologische Dosimetrie unter Anwendung des CBMN-Tests durchführt

2.6

zentrisches Ringchromosom

aberrantes ringförmiges Chromosom, das sich durch die Vereinigung zweier Bruchstellen gegenüberliegender Chromosomenarmen desselben Chromosoms ergibt, im Allgemeinen einhergehend mit der Bildung eines azentrischen Fragments

2.7

Zentromer

Einschnürungsstelle am Chromosom, die während der Zellteilung sichtbar wird und die Chromatidenpaar zusammenhält

2.8

Chromosom

Struktur, die Träger der genetischen Information ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Üblicherweise sind 46 derartige Strukturen im menschlichen Zellkern enthalten. Bei der Kernteilung kondensieren sie, um charakteristisch geformte Strukturen zu bilden.

2.9

Chromatid

einer der beiden Stränge eines duplizierten Chromosoms, die durch ein einzelnes Zentromer verbunden sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Chromatiden werden während der Mitose getrennt, um nach Verdopplung wieder zu einem Chromosom zu werden

2.10

Konfidenzintervall

statistischer Unsicherheitsbereich für eine geschätzte Größe, innerhalb dessen der Wert der Größe mit einer festgelegten Wahrscheinlichkeit zu erwarten ist

2.11

Cytochalasin B

Cyto-B

Reagens, das zur Blockade der Zellteilung von sich teilenden Zellen verwendet wird, wodurch die Identifizierung von Zellen in der ersten Zellteilung in Form von zweikernigen Zellen ermöglicht wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Zweikernige Zellen werden zur Auswertung von Mikrokernen gezielt verwendet.

2.12

dizentrisches Chromosom

aberrantes Chromosom mit zwei Zentromeren, das aus Teilen zweier gebrochener Chromosomen entsteht; im Allgemeinen geht damit die Bildung eines azentrischen Fragments einher.

2.13

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FISH

Technik, bei der für bestimmte Teile des Genoms spezifische DNA-Sonden verwendet werden, die durch Bindung mit verschiedenen Fluorochromen die Hervorhebung oder „Anfärbung“ von Chromosomenbereichen mit verschiedenen Farben ermöglicht

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Technik ermöglicht den Nachweis eines Austausches zwischen unterschiedlich gefärbten DNA-Stücken (üblicherweise ganze Chromosomen).

2.14

Interphase

Abschnitt des Zellzyklus zwischen den mitotischen Kernteilungen

2.15

linearer Energietransfer

LET

Quotient von dE/dl , wie durch die Internationale Kommission für Strahlungseinheiten und Messung (en: International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU) definiert, wobei dE die durchschnittliche Energie darstellt, die lokal von einem geladenen Teilchen mit spezifischer Energie beim Durchlaufen einer Weglänge dl abgegeben wird

2.16

Metaphase

Abschnitt der Mitose, in dem die Kernmembran aufgelöst wird, die Chromosomen maximal verkürzt und für die Teilung in der Metaphasenplatte ausgerichtet sind

2.17

Mikrokern oder Kleinkern

(en. micronucleus)

MN

Kleinkern, der ganze Chromosomen oder azentrische Chromosomenfragmenten beinhaltet, die während der Kernteilung und Chromosomensegregation in der Anaphase/Telophase nicht auf die Tochterkerne verteilt werden.

Anmerkung 1 zum Begriff: Mehr als 90 % der durch ionisierende Strahlung induzierten Mikrokerne beinhalten azentrische Chromosomenfragmente.

2.18

unterer Schwellenwert der Dosis

MDL

kleinste messbare Größe (z. B. Häufigkeit oder Dosis), welche nachgewiesen werden kann, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass die Größe fälschlicherweise nicht nachgewiesen wird, durch β (Fehler 2. Art) und die Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Entscheidung — Nachweis einer positiven Größe (von null verschiedenen) in einer Kontrollprobe (Fehler 1. Art) — durch α gegeben ist

2.19

kleinste auflösbare Dosis

kleinste zusätzliche Dosis, für die das untere 95 %-Poisson-Konfidenzintervall größer als 0 ist, so dass eine Wahrscheinlichkeit von 97,5 % besteht, dass die über den normalen Hintergrundwert hinaus erhaltene Dosis größer als 0 ist

2.20

Kernteilungsindex

Index im CBMN-Test, der aus den Häufigkeiten von einkernigen (mononukleären), zweikernigen (binukleären) und mehrkernigen (multinukleären) Zellen berechnet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser Index dient als Maß für die Hemmung der Kernteilung.

2.21

Präzision

zur Beschreibung der Streuung von Messungen in Bezug auf eine Lagemaßzahl bzw. Kennzahl der zentralen Tendenz angewendeter Begriff

2.22

Qualitätssicherung

geplante systematische Maßnahmen, um mit angemessenem Vertrauen sicherzustellen, dass ein Prozess, eine Analyse oder eine Dienstleistung die Qualitätsanforderungen erfüllt

BEISPIEL Dosis, die in einem Vertrag festgelegt wurde

2.23

Qualitätskontrolle

Teil der Qualitätssicherung, der dafür bestimmt ist nachzuprüfen, dass Systeme und Komponenten den zuvor festgelegten Anforderungen entsprechen

3 In dieser Norm angewendete Methodik des Mikrokerntests

3.1 Allgemeines

In dieser Internationalen Norm wird die im Mikroskop bestimmte Häufigkeit von Mikrokernen in zweikernigen Lymphozyten nach Blockade der Zellteilung von menschlichen peripheren Blut-Lymphozyten zur Dosisabschätzung nach einer vermuteten Exposition mit ionisierender Strahlung verwendet.

Lymphozyten werden nach einem Verfahren kultiviert, das es ermöglicht, Zellen, die sich aufgrund einer blockierten Zellteilung nur einmal geteilt haben, anhand ihrer binuklearen Erscheinung zu erkennen und auszuwerten. Das setzt voraus, dass Vollblut oder von den anderen Blutbestandteilen abgetrennte Lymphozyten in einem Nährmedium mit einem Mitogen inkubiert werden, was die Auswertung von Mikrokernen in zweikernigen Zellen der ersten Generation ermöglicht. Eine die Zellteilung blockierende Substanz, Cytochalasin-B, wird mindestens 6 h vor Beginn der ersten Mitose hinzugefügt, um die sich teilenden Lymphozyten im zweikernigen Stadium nach Kernteilung zu arretieren. Die Dauer der Zellkultivierung und der Zeitpunkt der Zugabe des Spindelgifts sind zu optimieren, um eine angemessene Anzahl von zweikernigen Zellen sicherzustellen.

Die zweikernigen Zellen werden durch Zentrifugation, Behandlung mit hypotonischer Salzlösung und Fixierung in einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure aus den Kulturen gewonnen. Die fixierten Zellen werden auf Objektträger getropft und gefärbt. Im Fall von isolierten Lymphozyten ist es auch zulässig, Präparate durch Zytozentrifugation von Zellen auf Objektträger mit anschließender Lufttrocknung, Fixierung mit Methanol und Färbung herzustellen. Die genaue von einem CBMN Labor angewendete Arbeitsvorschrift zur Zellkultivierung, zur Aufarbeitung der zweikernigen Zellen und zum Färben sollte formal dokumentiert werden.

Objektträger mit gefärbten Zellen werden systematisch mikroskopisch gescannt, um geeignete zweikernige Zellen zu identifizieren. Die Häufigkeit von Mikrokernen, die in einer geeigneten Anzahl von bewerteten zweikernigen Zellen beobachtet werden, wird unter Anwendung von Kalibrierdaten in eine Abschätzung der Strahlendosis umgewandelt.

3.2 Allgemeine Laboranforderungen

Das Labor sollte entsprechend ausgestattet sein mit den geforderten Einheiten zum Arbeiten bei Biostoffgefährdung (Sicherheitswerkbänke), mit geeigneten Einrichtungen zur Gewebe- und Lymphozytenkultivierung, zur Zellisolierung, Präparation von Objektträgern und mikroskopischen Zellauswertung sowie zur Auswertung subzellulärer Strukturen, wie z. B. Mikrokerne. Das Laboratorium sollte Dokumente zur Qualitätssicherung aufbewahren, einschließlich derer, in denen die regelmäßige Kalibrierung der für die Zellkultivierung eingesetzten Ausrüstung, wie z. B. Laminarboxen (Sterilbänke), Pipetten, Brutschrank usw., beschrieben ist.

3.3 Analysenauftrag und Blutentnahme

Entsprechend den nationalen Vorschriften sollte die Anfrage auf eine Analyse üblicherweise durch einen Arzt, der den Patienten vertritt, durch den/die Patienten/Patientin selbst oder aufgrund von Rechtsansprüchen angefordert werden. In allen Fällen, in denen es im Normalfall möglich ist, muss die Blutentnahme für eine Mikrokernanalyse mit der Einverständniserklärung des Patienten erfolgen. Es ist empfehlenswert, dass der Laborleiter die Einverständniserklärung des Patienten aufbewahrt, und der Patient sollte auch angeben, wem er den Erhalt der Daten gestattet. Bei Minderjährigen sollte die Einverständniserklärung vom Elternteil/Vormund eingeholt werden.

Es liegt in der Verantwortung des medizinischen Personals (z. B. Arzt, Krankenschwester usw.), die Blutentnahme und den Versand (zeitlich) so zu planen, dass sichergestellt ist, dass die Blutprobe im bestmöglichen Zustand im Labor eintrifft. Dadurch soll vermieden werden, dass zwischen der Blutentnahme und der Abholung der Blutprobe zum Transport mehrere Stunden vergehen.

Die Blutprobe wird unter Verwendung von Lithium- oder Natriumheparin als Antikoagulans entnommen, bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) aufbewahrt und so schnell wie möglich, jedoch vor 72 h, kultiviert. In einigen unvermeidbaren Fällen, die eine Verzögerung über 72 h hinaus mit sich bringen, ist eine gute Probenaufbereitung dennoch möglich, wenn die Blutproben unter Beachtung angemessener Vorsichtsmaßnahmen aufbewahrt werden, wie z. B. die Verwendung von Gelkissen, die Raumtemperatur haben, um eine Temperatur von 20 °C aufrechtzuerhalten.

3.4 Zellkultivierung

Die Arbeitsvorschrift für die Durchführung des CBMN-Tests wird von jedem CBMN-Labor festgelegt und dokumentiert. Die Arbeitsvorschriften zur Erstellung der Kalibrierkurve und die für die Dosisabschätzung verwendeten Patientenproben müssen identisch sein. Es gibt mehrere kritische Aspekte, die beachtet werden müssen.

- a) Die zur Erstellung der Kalibrierkurven verwendete Blutprobe muss unmittelbar nach der Bestrahlung und vor der Kultivierung der Proben für 2 h bei 37 °C inkubiert werden.
- b) Es sollten zwei parallele Kulturen angelegt werden, um die Bestimmung des Variationskoeffizienten innerhalb eines Versuchs zu ermöglichen.
- c) Die Zellen müssen bei 37 °C ± 0,5 °C entweder als Vollblut, als angereicherte Lymphozytensuspension (Buffy-Coat) oder als isolierte Lymphozyten kultiviert werden.
- d) Das Kulturgefäß muss steril sein und so gehandhabt werden, dass eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.
- e) Es müssen spezifische Nährmedien verwendet werden, die eine Proliferation der peripheren Blut-Lymphozyten ermöglichen.

BEISPIEL Üblicherweise wird RPMI-1640, Ham's F10, MEM oder McCoy, angereichert mit fetalem bovinem Serum (FBS) zwischen 10 % und 20 %, 200 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100 IU·ml⁻¹/100 µg·ml⁻¹) verwendet.

- f) Das Mitogen [z. B. Phytohämagglutinin (PHA)] muss den Medien zugefügt werden, um die Lymphozyten zur Mitose anzuregen.
- g) Cytochalasin-B (Cyto-B) muss 24 h bis 44 h nach PHA-Stimulation in einer Konzentration von mindestens 3,0 µg/ml und nicht mehr als 6,0 µg/ml der Zellkultur zugefügt werden, um die Zellteilung während der ersten Kernteilung nach Stimulation zu blockieren.