

DIN EN ISO 17099



ICS 13.280

Einsprüche bis 2023-10-18
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 17099:2020-03

Entwurf

**Strahlenschutz –
Leistungskriterien für Laboratorien, die den
Zytokineseblock-Mikronukleustest (CBMN) in peripheren
Blutlymphozyten für die biologische Dosimetrie verwenden
(ISO/DIS 17099:2023);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 17099:2023**

Radiological protection –

Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry (ISO/DIS 17099:2023); German and English version prEN ISO 17099:2023

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/DIS 17099:2023);
Version allemande et anglaise prEN ISO 17099:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-08-18 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nar@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Radiologie (NAR), Alexander-Wellendorff-Str. 2, 75172 Pforzheim.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 93 Seiten

DIN-Normenausschuss Radiologie (NAR)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17099:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 85 „Nuclear energy, nuclear technologies, and radiological protection“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 430 „Kernenergie, Kerntechnik und Strahlenschutz“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 080-00-01 AA „Dosimetrie“ im DIN-Normenausschuss Radiologie (NAR).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725 (alle Teile)	siehe	DIN ISO 5725 (alle Teile)
ISO 11929-1	siehe	DIN EN ISO 11929-1
ISO 19238	siehe	DIN EN ISO 19238
ISO/IEC 17025:2017	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 17099:2020-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) kleinere Änderungen im gesamten Text;
- b) Umstrukturierung des Dokuments zur besseren Harmonisierung mit anderen Normen zu Biodosimetrie;
- c) Hinzufügung von 7.2.7 Datensicherheitsplan;
- d) zusätzliche Anforderungen an den Bericht über die Expositionsbedingungen für die Kalibrierungskurve in 10.2;
- e) Lockerung der Anzahl der Personen, die für jede Altersgruppe zur Ermittlung der Hintergrund-Mikrokernhäufigkeit erforderlich sind, wobei die Festlegung dem Laborleiter überlassen wird (10.3);
- f) Hinzufügung von Einzelheiten zur Bestimmung der minimalen auflösbaren Dosis (10.4), der absorbierten Dosis (11.2.4) und der Unsicherheit (11.2.5);
- g) Streichung der Verweisung auf den Varianzkoeffizienten bei der Bestimmung des Fachwissens, wobei der Schwerpunkt auf der Verwendung von 95 %-Konfidenzintervallen zur Bestimmung des Fachwissens liegt (11.1.3);
- h) Hinzufügung einer Verweisung auf andere Expositionsszenarien (11.2.8);
- i) Streichung des Anhangs über die automatisierte Bewertung von Mikrokernen, da er als nicht in den Anwendungsbereich der Norm fallend angesehen wurde;
- j) Hinzufügung eines Mustergruppenberichts (Anhang E);

- k) Hinzufügung eines detaillierten Anhangs (Anhang F) zur Berechnung der Entscheidungsschwelle und der Nachweisgrenze zusammen mit einer Probenberechnung und einem R-Skript zur Durchführung dieser Berechnungen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 11929-1, *Bestimmung der charakteristischen Grenzen (Erkennungsgrenze, Nachweisgrenze und Grenzen des Überdeckungsintervalls) bei Messungen ionisierender Strahlung — Grundlagen und Anwendungen — Teil 1: Elementare Anwendungen*

DIN EN ISO 19238, *Strahlenschutz — Durchführungskriterien für Dienstleistungslaboratorien zur Anwendung der biologischen Dosimetrie mittels zytogenetischer Verfahren*

DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2017); Deutsche und Englische Fassung EN ISO/IEC 17025:2017*

DIN ISO 5725, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen*

**Strahlenschutz – Leistungskriterien für Laboratorien, die den
Zytokineseblock-Mikronukleustest (CBMN) in peripheren Blutlymphozyten für die
biologische Dosimetrie verwenden (ISO/DIS 17099:2023)**

Radiological protection – Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry (ISO/DIS 17099:2023)

Radioprotection – Critères de performance pour les laboratoires pratiquant la dosimétrie biologique par le test des micronoyaux avec blocage de la cytotélerèse (CBMN) dans les lymphocytes du sang périphérique (ISO/DIS 17099:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 In diesem Dokument angewendete Methodik des CBMN-Tests	10
4.1 Analysenauftrag und Blutentnahme	11
5 Verantwortung des Auftraggebers	11
6 Verantwortung des Dienstleistungslabors	12
6.1 Aufbau und Aufrechterhaltung des QS-Programms	12
6.2 Verantwortlichkeit während der Dienstleistung	12
7 Vertraulichkeit von persönlichen Angaben	13
7.1 Überblick	13
7.2 Anwendungen der Vertraulichkeitsgrundsätze	13
7.2.1 Übertragung von Verantwortlichkeiten innerhalb des Labors	13
7.2.2 Aufträge zu Analysen	13
7.2.3 Übermittlung vertraulicher Informationen	14
7.2.4 Anonymität von Proben	14
7.2.5 Berichterstattung der Ergebnisse	14
7.2.6 Aufbewahrung	14
7.2.7 Datensicherheitsplan	14
8 Labor-Sicherheitsanforderungen	14
8.1 Überblick	14
8.2 Mikrobiologische Sicherheitsanforderungen	15
8.3 Sicherheitsanforderungen für Chemikalien	15
8.4 Optische Sicherheitsanforderungen	16
8.5 Sicherheitsplan	16
9 Durchführung der Probenahme	17
9.1 Kultivierung	17
9.2 Färben	18
9.3 Mikroskopie	18
9.4 Auswertung der Objektträger	18
9.4.1 Allgemeines	18
9.4.2 Auswertekriterien	19
9.4.3 Auswerteprotokolle	19
9.5 Automatisierte Analyse	19
10 Kalibrierquelle(n), Kalibrierkurve und kleinste nachweisbare Dosis	20
10.1 Kalibrierquelle(n)	20
10.2 Kalibrierkurve	20
10.3 Hintergrundhäufigkeit von Mikrokernen	22
10.4 Vergleich mit dem Hintergrundwert: Charakterisierung der kleinsten nachweisbaren Dosis	22
11 Unfallbedingte Strahlenbelastung weniger Personen	25
11.1 Verfahren zur Auswertung von MN in BNCs	25
11.1.1 Kodierung von Proben und Objektträgern	25
11.1.2 Auswertetechniken	25
11.1.3 Fachkenntnisse des Labors bezüglich der Auswertung	25
11.2 Kriterien für die Umwandlung der ausgewerteten Häufigkeit von Mikrokernen in eine Abschätzung der absorbierten Dosis	25
11.2.1 Überblick	25

11.2.2	Vergleich mit Kontrollen	25
11.2.3	Vertrauensgrenzen für die Anzahl von MN	26
11.2.4	Berechnung der absorbierten Dosis bei Ganzkörperexposition	26
11.2.5	Berechnung der Unsicherheit der absorbierten Dosis	26
11.2.6	Fälle nach akuter und nicht akuter Exposition	27
11.2.7	Prüfung der Verteilung von MN je zweikernige Zelle	27
11.2.8	Andere Expositionsszenarien	28
11.3	Berichterstattung der Ergebnisse	28
11.3.1	Allgemeines	28
11.3.2	Inhalt des Berichts (hinsichtlich eines Standardformulars siehe Anhang D)	28
11.3.3	Interpretation der Ergebnisse	29
12	Triage der Bevölkerung	29
12.1	Allgemeines	29
12.2	Nutzung eines Netzwerks für CBMN Tests bei großen Strahlenunfällen	29
12.3	Verfahren zur Auswertung von MN in BNCs	29
12.4	Kriterien für die Umwandlung der ausgewerteten Häufigkeit von Mikrokernen in eine Abschätzung der absorbierten Dosis	30
12.5	Berichterstattung der Ergebnisse	30
13	Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle	30
13.1	Überblick	30
13.2	Besondere Anforderungen	30
13.2.1	Allgemeines	30
13.2.2	Leistungsprüfungen durch Ringversuche	30
13.2.3	Regelmäßige Leistungsprüfung der Auswerterqualifikation	31
13.2.4	Überprüfungen der Integrität des Probenverkehrs	31
13.2.5	Überprüfung der Unversehrtheit der Proben durch das Dienstleistungslabor	31
13.2.6	Überprüfungen der Geräteausstattung	32
13.2.7	Überprüfungen des Probenprotokolls	32
13.2.8	Überprüfungen der Probenauswertung	32
13.2.9	Überprüfungen der Dosisabschätzung und des Konfidenzintervalls	32
13.2.10	Überprüfung der Zusammenstellung des Ergebnisberichts	32
Anhang A (informativ)	Auswerteprotokoll zur Dokumentation von MN in BNCs	33
Anhang B (informativ)	Anweisungen für Auftraggeber (Muster)	34
Anhang C (informativ)	Muster — Fragebogen	36
Anhang D (informativ)	Muster — Berichterstattung — Einzelperson	38
Anhang E (informativ)	Muster für einen Gruppenbericht	40
Anhang F (informativ)	Erkennungsgrenze und Nachweisgrenze	42
Literaturhinweise		45

Bilder

Bild 1 — Darstellung der Erkennungs- und der Nachweisgrenze ($\mu_0 = \text{Konstante}$)	23
--	----

Tabellen

Tabelle 1 — Liste von Reagenzien und betreffenden Gefahrenhinweisen	15
Tabelle 2 — Messabweichungsraten für die Herleitung von positiven und negativen Rückschlüssen	22

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 17099:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 85 „Nuclear energy, nuclear technologies, and radiological protection“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 430 „Kernenergie, Kerntechnik und Strahlenschutz“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 17099:2017 ersetzen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 17099:2023 wurde von CEN als prEN ISO 17099:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (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 Normungsthemen 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 Directives, 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 Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO [eine/keine] Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 85, *Nuclear energy, nuclear technologies, and radiological protection*, Unterkomitee SC 2, *Radiological protection*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 430, *Kernenergie, Kerntechnik und Strahlenschutz*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung)

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 17099:2014), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen sind folgende:

- geringfügige Änderungen im gesamten Text;
- Neuorganisation des Dokuments für eine bessere Harmonisierung mit anderen Biodosimetrienormen
- Ergänzung von 7.2.7 zum Datensicherheitsplan;
- Ergänzung zusätzlicher Anforderungen für den Bericht zu Bedingungen der Exposition für die Kalibrierkurve in 10.2;

- Lockerung der Anzahl an Einzelpersonen, die für jede Altersgruppe für die Erstellung der Hintergrundhäufigkeit von Mikrokernen erforderlich sind, und Überlassung der Bestimmung dem Leiter des Labors (10.3);
- Ergänzung von Einzelheiten zur Bestimmung der kleinsten auflösbaren Dosis (10.4), der absorbierten Dosis (11.2.4) und der Unsicherheit (11.2.5);
- Entfernung der Verweisung auf den Variationskoeffizient bei der Bestimmung der Fachkenntnisse bezüglich der Auswertung, wobei der Fokus auf dem Einsatz des 95-%-Konfidenzintervalls zur Bestimmung der Fachkenntnisse liegt (11.1.3);
- Ergänzung der Verweisung auf die hinzugefügten anderen Expositionsszenarien (11.2.8);
- Entfernung des Anhangs zur automatischen Mikrokernauswertung, da er als außerhalb des Anwendungsbereichs der Norm angesehen wird;
- Ergänzung des Musters für einen Gruppenbericht (Anhang E);
- Ergänzung eines detaillierten Anhangs (Anhang F) zur Berechnung der Erkennungsgrenze und der Nachweisgrenze mit einer Musterberechnung und dem R-Skript zur Durchführung dieser Berechnungen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Der Zweck dieses Dokuments 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 Ganzkörper-Dosisabschätzung bereitgestellt werden soll, oder b) im „Triage-Modus“ für Bevölkerungsgruppen vorläufige Dosisabschätzungen für Einzelpersonen erfolgen sollen.

Der CBMN-Test ist ein alternatives zytogenetisches Verfahren, dessen Durchführung möglicherweise einfacher und schneller ist als die dizentrische Chromosomenanalyse.^[1,2] Er wird routinemäßig auch für den Nachweis einer Exposition mit anderen genotoxischen Stoffen neben ionisierender Strahlung eingesetzt, dies ist aber nicht Gegenstand des hier vorliegenden Dokuments. Obwohl die Kultivierung der Blutproben etwas länger dauert als bei der dizentrischen Chromosomenanalyse, ist die Analyse von Mikrokerneln 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 (en: binucleated cells, BNCs) erforderliche Blutvolumen ist ähnlich dem für die Analyse dizentrischer Chromosomen. Die schnellere Auswertgeschwindigkeit für Mikrokerneln gleicht die längere Kultivierungsdauer aus. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass Faktoren wie Alter, Geschlecht, Ernährungsweise und Umweltmutagene einen Einfluss auf die Ergebnisse haben können, insbesondere nach Belastung in geringen Mengen.[3-5] Außerdem kann der CBMN-Test im automatisierten Modus unter Verwendung von zytometrischen Technologien durchgeführt werden, aber diese liegen außerhalb des Anwendungsbereichs dieses Dokuments.

Dieses Dokument 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. Dieses Dokument 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 oder nuklearen Ereignis.

Ein Teil der in diesem Dokument 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. Dieses Dokument setzt seinen Schwerpunkt auf die Erweiterung und Normung der Bereiche Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle sowie die Kriterien zur Akkreditierung und die Beurteilung der Durchführung. Dieses Dokument stimmt weitgehend mit ISO/IEC 17025 „General requirements for the competence of testing and calibration laboratories“ [6] überein, unter besonderer Berücksichtigung der spezifischen Anforderungen der biologischen Dosimetrie. Die in diesem Dokument 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) [7].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument behandelt Folgendes:

- a) die Vertraulichkeit von persönlichen Angaben, in Bezug auf Auftraggeber und Labor;
- b) die Labor-Sicherheitsanforderungen;
- c) die für die Bestimmung der Referenzdosis-Kennlinien verwendeten Kalibrierungsquellen und -dosisbereiche, mit denen aus den Ergebnissen des CBMN-Tests und der Nachweisgrenze die Dosis eingeschätzt wird;
- d) die Durchführung der Blutentnahme, Kultivierung, Aufarbeitung und Probenpräparation für den CBMN-Test;
- e) die Auswertekriterien;
- f) die Abschätzung der absorbierten Dosis anhand der Häufigkeit von Mikrokernen in BNCs;
- g) die Berichterstattung der Ergebnisse;
- h) Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle;
- i) informative Anhänge mit Musteranweisungen für Auftraggeber, Musterfragebogen, Musterdatenblatt für die mikroskopische Auswertung und Musterbericht.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

azentrisches Chromosom(enfragment)

terminales oder interstitielles Chromosomenfragment unterschiedlicher Größe, bezeichnet als überzähliges azentrisches Fragment, wenn es unabhängig von einer dizentrischen Chromosom- oder zentrischen Ringchromosom-Veränderung gebildet wird

3.2

Hintergrundhäufigkeit/-wert

spontane Ausbeute (oder Anzahl) von Kleinkernen in BNCs, die in Kontrollproben oder Individuen, die nicht auf abnormale Weise Genotoxinen wie ionisierender Strahlung ausgesetzt sind

3.4

binukleare Zellen

BNCs

Zellen, die nach mitogener Stimulation eine Kernteilung abgeschlossen haben, aber an der Durchführung der Zellteilung gehindert wurden und der Zelltyp sind, worin Mikrokerne im CBMN-Test bewertet werden

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

3.5

zentrisches Ringchromosom

aberrantes ringförmiges Chromosom, das sich durch die Vereinigung zweier Bruchstellen gegenüberliegender Chromosomenarmen desselben Chromosoms ergibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Es geht im Allgemeinen mit einem azentrischen Fragment einher.

3.6

Zentromer

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

3.7

Chromosom

aus DNA und Proteinen bestehende Struktur, die Träger der genetischen Information ist und während der Kernteilung zu charakteristischen Formen kondensiert

3.8

Chromatid

einer der beiden Stränge eines duplizierten Chromosoms, die durch ein einzelnes Zentromer verbunden sind und im Verlauf der Zellteilung abgetrennt werden, sodass zwei einzelne Chromosomen entstehen

3.9

Konfidenzintervall

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

3.10

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

3.11

Zellteilung

der physikalische Prozess der Zellteilung, die das Zytoplasma von den Mutterzellen in zwei Tochterzellen teilt

3.12

dizentrisches Chromosom

aberrantes Chromosom mit zwei Zentromeren, das aus Teilen zweier gebrochener Chromosomen entsteht

Anmerkung 1 zum Begriff: Es geht im Allgemeinen mit einem azentrischen Fragment einher.

3.13

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

3.14

Mikrokern

Kleinkern

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.

3.17

nicht lichtbrechend

Prozess, bei dem Materialien Licht nicht brechen oder streuen können

3.19

Präzision

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

3.20

Qualitätssicherung

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

3.21

Qualitätskontrolle

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

3.22

Dienstleistungslaboratorium

Laboratorium, das biologische Dosimetriemessungen durchführt

4 In diesem Dokument angewendete Methodik des CBMN-Tests

In diesem Dokument wird die im Mikroskop bestimmte Häufigkeit von Mikrokernen in kultivierten menschlichen Lymphozyten nach Blockade der Zellteilung 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 isolierte Lymphozyten in einem Nährmedium mit einem Mitogen inkubiert werden, was die Auswertung von MN in BNCs der ersten Generation ermöglicht. Eine die Zellteilung blockierende Substanz, Cytochalasin-B, wird mindestens 6 h, d. h. ungefähr 24 h nach dem Beginn der Kultivierung, 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-Testlabor angewendete Arbeitsvorschrift zur Zellkultivierung, zur Aufarbeitung der BNCs und zum Färben sollte formal dokumentiert werden.

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

Verfahren zur automatischen Bewertung des CBMN wurden geprüft, liegen jedoch außerhalb des Anwendungsbereichs dieses Dokuments.

4.1 Analysenauftrag und Blutentnahme

Entsprechend den nationalen Vorschriften sollte die Anfrage auf eine Analyse üblicherweise durch einen Arzt, der den Patienten vertritt, oder die Analyse könnte aufgrund von Rechtsansprüchen von einer anderen Behörde angefordert werden. In allen Fällen, in denen es im Normalfall möglich ist, muss die Blutentnahme für eine MN-Analyse mit der Einverständniserklärung des Patienten erfolgen. Der Leiter des Labors kann, in Abhängigkeit von den nationalen Vorschriften, dazu aufgefordert werden, die Einverständniserklärung des Patienten aufzubewahren.

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 (siehe 13.2.4). Dadurch soll vermieden werden, dass zwischen der Blutentnahme und der Abholung der Blutprobe zum Transport mehrere Stunden vergehen (für Einzelheiten siehe Abschnitt 5).

5 Verantwortung des Auftraggebers

Dieser Abschnitt enthält Elemente, die nicht vom Dienstleistungslaboratorium kontrolliert werden. Vor der Blutentnahme sollte ein erstes Gespräch zwischen dem Auftraggeber und dem Dienstleistungslaboratorium stattfinden, um die Probenentnahme und den Versand zu koordinieren. Die spezifischen Anforderungen an die Probenentnahme und den Versand sollten dem Auftraggeber erläutert werden, einschließlich der ungefähren Lieferzeit für das/die Ergebnis(se) der Chromosomenanalyse. Dem Auftraggeber sollte ein standardisiertes Anweisungsformular (in Anhang B abgebildet) zugesandt werden, in dem die Anforderungen erläutert werden. Die Anforderungen umfassen:

- a) Bei der Blutentnahme sollten Blutentnahmeröhrchen mit Lithium- oder Natriumheparin als Antikoagulans verwendet werden. Die Blutentnahmeröhrchen sollten vom Dienstleistungslaboratorium entweder zugesendet oder spezifiziert werden.
- b) Das Blut sollte entnommen (idealerweise etwa 5 ml), klar und eindeutig gekennzeichnet, bei Raumtemperatur (ungefähr 20 °C) aufbewahrt und so bald wie möglich an das Dienstleistungslaboratorium gesendet werden.
- c) Es sollten Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um die Unversehrtheit des Behälters sicherzustellen und das Austreten des Inhalts während des Transports zu verhindern. Blutproben sollten während dem Transport bei Umgebungstemperatur aufbewahrt werden, d. h. 11 °C bis 30 °C. Ein Gerät zur Temperaturaufzeichnung sollte verwendet werden, um sicherzustellen, dass die Temperatur beim Transport kontrolliert wird. Verpackung und Kennzeichnung müssen nationalen und internationalen Vorschriften entsprechen. Bei Lufttransport sollte ein physikalisches Dosimeter verwendet werden, um zu kontrollieren, ob die Probe auf dem Transportweg bestrahlt wurde.
- d) Ein vom Dienstleistungslaboratorium bereitgestellter Fragebogen (siehe Anhang C) sollte vor Beginn der Blutkultivierungen ausgefüllt und zurückgesandt werden.
- e) Bei biologisch kontaminierten und/oder infektiösen Proben muss das Laboratorium benachrichtigt werden, damit zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung der Probe getroffen werden können.

6 Verantwortung des Dienstleistungslabors

6.1 Aufbau und Aufrechterhaltung des QS-Programms

Das Dienstleistungslabor muss ein QS-Programm (siehe Abschnitt 13) aufbauen und sicherstellen, dass alle Aspekte der Dienstleistung erfasst sind. Das QS-Programm muss die folgenden Punkte behandeln:

- a) Es muss regelmäßige interne Überprüfungen der Gerätefunktion, der Eignung der Reagenzien und verschiedene Durchführungsüberprüfungen, d. h. Vergleichsprüfungen innerhalb eines Labors, Qualifikationen des Bearbeiters, Probenprotokoll, Auswertung, Abschätzungen der Dosis, Berichterstellung usw., enthalten;
- b) Es muss regelmäßige externe Überprüfungen der Arbeitsabläufe des Labors enthalten. Die externen Audits umfassen einen Überblick über die Dokumentation der Gerätefunktion, der Eignung der Reagenzien und verschiedener Leistungsüberprüfungen, d. h. Ringversuche, Qualifikationen des Bearbeiters, Funktionsfähigkeit des Proben transports usw., des Dienstleistungslabors.

6.2 Verantwortlichkeit während der Dienstleistung

Das Dienstleistungslabor stellt notwendige Anleitungen, Verfahren und fristgerechtes Berichtswesen zur Verfügung, um bei Auftragserteilung eine Dosisabschätzung mittels CBMN-Test liefern zu können. Die Dienstleistungstätigkeiten müssen folgende Aspekte ansprechen:

- a) das Dienstleistungslaboratorium muss über eine Dokumentation verfügen, die von einem qualifizierten Sachverständigen, d. h. Strahlenbiologe eines Dienstleistungslaboratoriums oder eine gleichwertige Fachkraft, überprüft und bestätigt wurde und Folgendes enthält:
 - 1) ein Formular mit Instruktionen zum Versandungsverfahren, das an den Auftraggeber geschickt wird (siehe Anhang B);
 - 2) einen Fragebogen, der die Zustimmung des Patienten und alle verfügbaren Informationen über den Patienten und die Strahleneinwirkungsszenarien enthalten muss (siehe Anhang C);
 - 3) schrittweises Vorgehen zur Verarbeitung der Blutprobe vom Eingang der Probe bis zur Berichterstattung der Dosis;
- b) das Dienstleistungslaboratorium ist nicht für den Transport der Proben verantwortlich; es sollte jedoch Empfehlungen zum Transport der Proben bereitstellen. Falls gefordert, muss ein Blutentnahmesystem von mindestens 5 ml Vollblut in Röhrchen, das Lithium oder Natriumheparin als Antikoagulans enthält, an den Auftraggeber gesendet werden mit dem entsprechend gekennzeichneten und adressierten Verpackungsmaterial für die Rücksendung der Probe an das Dienstleistungslaboratorium. Die Verpackung muss den nationalen und/oder internationalen Vorschriften für den Transport von potentiell infektiösen pathologischen Proben entsprechen (siehe 13.2.4)
- c) nach dem Eingang der Blutprobe müssen die folgenden Schritte durchgeführt werden:
 - 1) Dokumentieren des Empfangs der Blutprobe (Datum, Zeitpunkt, Empfänger);
 - 2) Überprüfen der Qualität der Probe (Blutvolumen, Unversehrtheit der Röhrchen);
 - 3) Kennzeichnung der Blutprobe mit einem eindeutigen Code;
 - 4) Lagerung der Proben bei Raumtemperatur und Dokumentation des Lagerungsortes bis zum Anlegen der Kulturen;
 - 5) gleichzeitiges Ansetzen von Parallelkulturen so schnell wie möglich und dokumentieren von Datum, Zeitpunkt und Bearbeiter;

- 6) Dokumentieren sämtlicher für die Kultivierung verwendeten Reagenzien mit den entsprechenden Chargennummern und Verfallsdaten;
 - 7) Dokumentieren der Zugabe von Reagenzien und des Endes der Kultivierung (Datum, Zeitpunkt, Bearbeiter);
 - 8) Dokumentieren der Kurz- und Langzeitlagerung der Zellprobe bis zum Herstellen der Präparate;
 - 9) Dokumentieren des Objektträgerkodes, der Anzahl der Objektträger und des Aufbewahrungsorts;
 - 10) Dokumentation der Ergebnisse aus der Auswertung;
 - 11) Aufbewahrung der Objektträger und fallbezogenen Dokumente an einem geeigneten Ort, um eine rechtsmedizinische Neubewertung des Falls zu ermöglichen;
- d) das Dienstleistungslabor muss die Ergebnisse interpretieren und Berichte erstellen (siehe Anhang D);
- e) das Dienstleistungslaboratorium muss den Dialog mit dem Auftraggeber aufrechterhalten und die Ergebnisse dem Auftraggeber übermitteln.

7 Vertraulichkeit von persönlichen Angaben

7.1 Überblick

Von einem Dienstleistungslabor durchgeführte Untersuchungen im Rahmen der biologischen Dosimetrie müssen in Übereinstimmung mit nationalen Vorschriften zur Vertraulichkeit erfolgen. Das schließt üblicherweise die Wahrung der Vertraulichkeit aller Informationen des Patienten, einschließlich der Identität, der medizinischen Daten usw. Außerdem sollte das Geschäftsgeheimnis des Arbeitgebers des Patienten und beliebiger anderer Organisationen beachtet werden, die von einem radiologischen oder nuklearen Unfall/Störfall betroffen sind.

Diese Anforderung erstreckt sich 1) auf schriftliche, elektronische oder mündliche Kommunikationen zwischen dem Laboratorium und der Person/Organisation, die die Analyse beantragt und den Bericht erhält, und 2) auf den sicheren Schutz von vertraulichen Informationen in der Organisation, in der das Dienstleistungslaboratorium ansässig ist.

7.2 Anwendungen der Vertraulichkeitsgrundsätze

7.2.1 Übertragung von Verantwortlichkeiten innerhalb des Labors

Der Leiter des Laboratoriums darf eine begrenzte Anzahl von Labormitarbeitern die Befugnis zum Umgang mit Dokumenten erteilen, die mit der Analyse verbunden sind. Personen mit dieser Befugnis müssen eine Vertraulichkeitsverpflichtung entsprechend ihrer Aufgaben innerhalb des Labors unterzeichnen.

Der Laborleiter muss die unterzeichneten Vertraulichkeitsvereinbarungen aufbewahren und die Sicherheit und den Schutz aller vertraulichen Dokumente sicherstellen.

7.2.2 Aufträge zu Analysen

Entsprechend den nationalen Vorschriften sollte die Anfrage auf eine Analyse üblicherweise durch einen Arzt, der den Patienten vertritt, oder die Analyse könnte aufgrund von Rechtsansprüchen von einer anderen Behörde angefordert werden. In allen Fällen muss die Blutentnahme für eine CBMN-Analyse mit der Einverständniserklärung des Patienten erfolgen. Der Leiter des Labors kann, in Abhängigkeit von den nationalen Vorschriften, dazu aufgefordert werden, die Einverständniserklärung des Patienten aufzubewahren.

7.2.3 Übermittlung vertraulicher Informationen

Während des Austauschs von Informationen und Berichten zwischen dem Dienstleistungslabor und dem Auftraggeber der Analyse muss die Vertraulichkeit unabhängig vom gewählten Kommunikationsmittel sichergestellt sein.

Der Leiter des Labors muss alle Prozesse bezüglich der Übermittlung von Informationen und der Sicherstellung der Vertraulichkeit festlegen.

7.2.4 Anonymität von Proben

Der Leiter des Labors muss Arbeitsvorschriften zur Wahrung der Anonymität der Proben festlegen. Um eine Identifizierung des Patienten zu vermeiden, aber gleichzeitig die Rückverfolgbarkeit der Analyse sicherzustellen, sollten die Blutproben beim Eintreffen im Dienstleistungslabor kodiert werden. Die Kodierung sollte in eindeutiger Weise nach einem standardisierten Verfahren erfolgen. In allen Phasen der Analyse ist derselbe Kode zu verwenden. Der Kode wird von einer befugten Person, wie in 7.2 festgelegt, zugewiesen. Die Dekodierung, Interpretation der Ergebnisse und Erstellung des Berichts sind ebenfalls durch eine befugte Person durchzuführen.

7.2.5 Berichterstattung der Ergebnisse

Der Abschlussbericht, der die Ergebnisse und (bei Bedarf) deren Interpretation enthält, wird dem Auftraggeber der Analyse mitgeteilt. In Abhängigkeit von den nationalen Bestimmungen darf, mit entsprechender Genehmigung, eine weitere Kopie an weitere verantwortliche Personen weitergegeben werden.

7.2.6 Aufbewahrung

Das Labor muss die Pellets der kultivierten Zellen (Zellsuspensionen) und Objektträger aufbewahren, um im Fall eines Streits bezüglich der Analyse eine Überprüfung/Analyse durch einen externen Sachverständigen oder eines anderen Laborators zu erleichtern

Der Leiter des Labors muss festlegen, wie fixierte Zellen, Objektträger, Unterlagen und Ergebnisse aufbewahrt werden. Die Aufbewahrungsfristen werden vom Leiter des Labors in Übereinstimmung mit den nationalen Vorschriften/Richtlinien für eine mögliche rechtsmedizinische Neubewertung des Falles festgelegt. Alle einen Fall betreffenden Laborunterlagen, die die Identifizierung des Patienten und/oder Arbeitgebers ermöglichen könnten, müssen an einem Ort aufbewahrt werden, der nur befugten Personen zugänglich ist. Die endgültige Entsorgung der Unterlagen muss durch sichere Mittel, wie z. B. Schreddern, erfolgen.

7.2.7 Datensicherheitsplan

Ein Datensicherheitsplan mit schriftlichen Verfahren zum Schutz von Daten, die persönliche und identifizierbare Informationen enthalten, sollte erstellt werden. Dieser sollte Bestimmungen für die Aufbewahrung von schriftlichen und elektronischen Daten, Ergebnissen und Berichten an einem sicheren Ort enthalten, der nur befugten Personen zugänglich ist. Darüber hinaus sollte ein Plan für die sichere Datenvernichtung vorhanden sein.

8 Labor-Sicherheitsanforderungen

8.1 Überblick

Das Personal muss die nationale Gesetzgebung und institutionelle Vorschriften in Bezug auf Sicherheit im Labor einhalten. Hinsichtlich der Sicherheit in Servicelaboren gibt es einige Besonderheiten, die hervorzuheben sind. Dazu gehören mikrobiologische, chemische und optische Aspekte.

8.2 Mikrobiologische Sicherheitsanforderungen

Die Handhabung von menschlichem Blut birgt ein gewisses Risiko, dass im Blut enthaltene Parasiten und Infektionen auf das Laborpersonal übertragen werden können. Sämtliche Proben sollten als potentiell infektiös betrachtet werden, selbst wenn sie von scheinbar gesunden Personen stammen. Die Proben müssen in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse 2 ausgepackt und weiterverarbeitet werden. Das Ansetzen von Kulturen in einer derartigen Sicherheitswerkbank hat den zusätzlichen Vorteil, dass ein Kulturversagen durch mikrobielle Kontamination auf ein Mindestmaß verringert wird. Der Einsatz von spitzen Gegenständen (z. B. hypodermische Nadeln) (Injektionsnadeln) sollte auf ein Mindestmaß beschränkt werden, um das Risiko von Verletzungen zu verringern. Geeignete Desinfektionsmittel müssen zur Beseitigung von Verschüttetem/Leckagen zur Verfügung stehen. Alle biologischen Abfälle und verwendete Einmalkunststoffwaren müssen sterilisiert werden, z. B. durch Autoklavieren oder Verbrennen, vor der endgültigen Entsorgung.

Dem Personal sollten mögliche Impfungen gegen durch Blut übertragbare Krankheiten angeboten werden. Die rechtlichen und ethischen Positionen in Bezug auf die pathogene Untersuchung von Blutproben bei deren Eintreffen sind zwischen den Ländern unterschiedlich, deshalb sollten die Forscher sich nach den nationalen Anforderungen richten. Es sollte beachtet werden, falls Blutproben aus dem Ausland angenommen werden, dass die Fluggesellschaften, in Abhängigkeit vom Herkunftsland, möglicherweise vom Absender die Vorlage eines Zertifikats verlangen, welches bestätigt, dass die Proben untersucht wurden und keine Krankheitserreger enthalten.

8.3 Sicherheitsanforderungen für Chemikalien

Bei den in diesem Dokument behandelten Verfahren werden routinemäßig bestimmte Chemikalien und Arzneimittel verwendet. Wenn sie in Kulturen vorliegen oder bei Färbeverfahren eingesetzt werden, werden sie meistens in kleinen Volumina und in Verdünnungen eingesetzt, die im Allgemeinen keine Gesundheitsgefährdung darstellen. Sie werden jedoch in konzentrierten Stammlösungen hergestellt und aufbewahrt. Die bedenklichsten Hauptreagenzien und ihre international vereinbarten Gefahrenhinweise (H-Sätze) nach dem Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es ist zu beachten, dass sich handelsübliche Produkte abhängig von der physikalischen Form/Menge/Zusammensetzung unterscheiden können. Für die in einem Labor verwendeten Reagenzien sind stets die vom Hersteller mitgelieferten Gefahren- und Sicherheitshinweise auf den Sicherheitsdatenblättern zu beachten.

Tabelle 1 — Liste von Reagenzien und betreffenden Gefahrenhinweisen

Reagens	Gefahrenhinweis
Acridinorange	H302, H312, H319, H335, H340
Benzympenicillin	H317 H334
Cytochalasin B	H300, H310, H330, H361
Eisessig	H226, H314
Giemsa Färbemittel	H225, H301, H311, H331, H370
Heparin	H315, H319, H334
Methanol	H225, H301, H311, H331, H370
Paraformaldehyd	H228, H302, H315, H317, H318, H332, H334
Phytohämagglutinin	H302, H317, H332
Streptomycinsulfat	H302, H317, H332, H334, H361

Legende

Gefahrenhinweis	Legende
H225:	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar
H226:	Flüssigkeit und Dampf entzündbar
H228:	Entzündbarer Feststoff
H300:	Lebensgefahr bei Verschlucken
H301:	Giftig bei Verschlucken
H302:	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken
H310:	Lebensgefahr bei Hautkontakt
H311:	Giftig bei Hautkontakt
H312:	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt
H314:	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden
H315:	Verursacht Hautreizungen
H317:	Kann allergische Hautreaktionen verursachen
H318:	Verursacht schwere Augenschäden
H319:	Verursacht schwere Augenreizung
H330:	Lebensgefahr bei Einatmen
H331:	Giftig bei Einatmen
H332:	Gesundheitsschädlich bei Einatmen
H334:	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen
H335:	Kann die Atemwege reizen
H340:	Kann genetische Defekte verursachen
H361:	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen
H370:	Schädigt die Organe

8.4 Optische Sicherheitsanforderungen

Werden zum Sterilisieren des Innenraums von mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken UV-Lampen eingesetzt, müssen Abschirmung und Arbeitsabläufe vorhanden sein, um eine direkte Bestrahlung der Haut oder Augen des Laborpersonals zu vermeiden. Bei Verwendung eines Mikroskops mit Leuchtstofflampen muss eine Abschirmung angebracht sein, um die direkte Bestrahlung der Augen zu vermeiden.

8.5 Sicherheitsplan

Der Leiter des Labors muss schriftliche Sicherheitsmaßnahmen zum Schutz vor mikrobiologischen, chemischen und optischen Gefährdungen festlegen.

Der Leiter des Laboratoriums muss Aufzeichnungen von Unfällen und Vorschriften oder Verfahrensweisen aufbewahren, um eine Wiederholung ähnlicher Unfälle zu vermeiden.

9 Durchführung der Probenahme

9.1 Kultivierung

Die Arbeitsvorschrift für die Durchführung des CBMN-Tests wird von jedem Dienstleistungslabor 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) zur Herstellung der Kalibrierkurven muss das Blut unmittelbar nach der Bestrahlung und vor der Kultivierung für mindestens 2 h bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert werden;
- b) es sollten zwei parallele Kulturen angelegt werden, um die Bestimmung des Variationskoeffizienten innerhalb eines Versuchs zu ermöglichen;
- c) Zellen müssen bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ entweder als Vollblut oder als angereicherte Lymphozytensuspension (Leukozytenfilm, der eine Mischung aus Lymphozyten und Monozyten beinhaltet) kultiviert werden, die durch eine Dichtegradientenzentrifugation erhalten werden (z. B. Ficoll-Paque, Lymphoprep);
- d) Kulturgefäße müssen steril sein und so gehandhabt werden, dass eine mikrobielle Kontamination vermieden wird. Größtenteils werden für die Zellkultivierung Zellen in Röhrchen mit rundem Boden oder in Kolben T25 kultiviert. Für Lymphozyten-Mikrokulturen können ebenfalls Mikrotiterplatten verwendet werden [8];
- 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-Glutamine und Penicillin/Streptomycin ($100\text{ IU ml}^{-1} / 100\text{ µg}\cdot\text{ml}^{-1}$) verwendet.

- f) das Mitogen [z. B. Phytohämagglutinin (PHA)] muss den Medien in einer vom Labor bestimmten Konzentration (e.g. 20 µg/ml) zugefügt werden, um die Lymphozyten zur Mitose anzuregen;
- g) Cytochalasin-B (Cyto-B) muss 24 h bis 44 h nach PHA-Stimulation in einer endgültigen Konzentration zwischen $3,0\text{ µg/ml}$ und $6,0\text{ µg/ml}$ der Zellkultur zugefügt werden, um die Zellteilung während der ersten Kernteilung nach Stimulation zu blockieren;
- h) der Zeitpunkt der Aufarbeitung ist entscheidend, um die Anzahl von BNCs zu maximieren und die Anzahl von einkernigen und mehrkernigen Zellen zu minimieren. Er muss entsprechend den Standardkulturbedingungen des jeweiligen Dienstleistungslabors angepasst werden. Die empfohlene Kultivierungsdauer nach Mitogen-Stimulation zur Aufarbeitung der Zellen beträgt 68-72 h, unter bestimmten Bedingungen (z. B. wenn eine Mitoseverzögerung aufgrund hohen Alters und/oder hoher Strahlungsdosen $> 6\text{ Gy}$ erwartet wird) können jedoch eine längere Kulturzeit, die Verwendung von Inhibitoren der Mitoseverzögerung und zusätzliche Biomarker für CBMN-Tests erforderlich sein, um die Biodosimetrie weiter zu optimieren. Eine Änderung des CBMN-Tests zur Überwindung der Mitoseverzögerung ist die Nutzung von Inhibitoren von G2/M und Spindelkontrollen, wie Koffein und/oder ZM447439 (ein Aurorakinase-Inhibitor) und eines leicht verzögerten Zeitpunkts der Aufarbeitung von 74-78 h. Dieses Verfahren erlaubt den Zellen, die Kernteilung mit einem hohen Grad an DNA-Schäden durchzuführen und als binukleare Zellen im CBMN-Test bewertet zu werden und wurde gezeigt, um die Genauigkeit der Biodosimetrie bis zu 10 Gy von Photonen und 4 Gy von gemischten Neutronen-Photonen zu verbessern.[9] Bei Fällen mit hohen Strahlungsdosen wurden zusätzliche Biomarker im standardmäßigen CBMN-Test, wie z. B. die durchschnittliche Mikrokernhäufigkeit in Mikrokern-positiven binuklearen Zellen als bessere Biodosimeter für Niedrig-LET-Strahlung im Bereich von 5-15 Gy im Vergleich zur Verwendung von der Mikrokernhäufigkeit in binuklearen Zellen dargestellt [10];
- i) nach der Kultivierung werden die Zellen zentrifugiert, um die Zellen vom Medium zu trennen. Anschließend müssen die Zellen mit einer hypotonischen Lösung, wie beispielsweise kalte (4 °C) $0,075\text{ M KCl}$,

behandelt werden, um die roten Blutzellen zu analysieren und/oder die Lymphozyten vor der Fixierung anschwellen zu lassen;

- j) nach Hinzufügen der hypotonischen Lösung und Zentrifugation muss der Überstand entfernt werden und die Zellen müssen in frisch hergestellter kalter Fixierlösung I fixiert werden, die aus Methanol:Essigsäure 0,9 % NaCl (Ringerlösung) (das Verhältnis sollte vom Labor bestimmt werden) bestehen, während die Zellen zur Vermeidung von Verklumpungen resuspendiert werden. Als Nächstes werden die Zellen mit weiteren drei Runden von kalter frischer Fixierlösung II (Methanol:Essigsäure) fixiert, bis die Zellsuspension klar ist.[11] Zusätzlich kann Formaldehyd (1 %) zur ersten Fixierlösung hinzugefügt werden; für isolierte Lymphozytenkulturen wird empfohlen, Formaldehyd direkt nach der Behandlung mit einer hypotonischen Lösung hinzuzufügen [12];
- k) optimalerweise sollten Objektträger innerhalb einiger Tage nach der Fixierung aufbereitet und gefärbt werden. Ist eine Lagerung der fixierten Zellen erforderlich, wird die Zellsuspension in einem Kühlschrank oder Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt;
- l) Objektträger müssen so präpariert werden, dass die Unversehrtheit der Zellmembran sichergestellt und eine eindeutige Identifizierung von MN in BNCs möglich ist. Luftfeuchte- und Temperaturbedingungen können angepasst werden, um die Qualität der Verteilung zu erhöhen;
- m) bei Arbeiten mit Lymphozytenkulturen können alternativ auch Zellen durch Zytozentrifugation auf Objektträger überführt werden und dann nach Lufttrocknen mit absolutem Methanol auf dem Objektträger fixiert werden [13].

9.2 Färben

Die Zellen müssen auf geeignete Weise gefärbt werden, so dass die Kerne und MN deutlich sichtbar sind. Zu den üblicherweise verwendeten Färbemitteln gehören unter anderem Giemsa (für Hellfeldmikroskopie) und Acridinorange (für Fluoreszenzmikroskopie). DNA-spezifische Färbemittel wie beispielsweise DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) können ebenfalls verwendet werden. Der verwendete Farbstoff muss spezifisch für Kerne und MN sein, um Färbeartefakte anderer Zellstrukturen, die MN ähneln könnten (z. B. Centriolen), zu vermeiden. Nach der Färbung sollten die Objektträger unter Verwendung eines entsprechenden Eindeckmittels mit einem Deckglas abgedeckt werden.

9.3 Mikroskopie

In Abhängigkeit vom verwendeten Farbstoff wird ein Fluoreszenz- oder Hellfeldmikroskop verwendet. Zur verlässlichen optischen Auswertung von Zellen und MN ist mindestens eine 400- und 1 000-fache Vergrößerung erforderlich. Für eine computergesteuerte Auswertung kann ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung oder höher verwendet werden.

9.4 Auswertung der Objektträger

9.4.1 Allgemeines

Jede Probe muss von 2 Auswertern (wenn möglich) bewertet werden, die jeweils mindestens 500 BNCs (insgesamt mindestens 1 000 BNCs auf 2 Objektträgern) auf das Vorhandensein von MN analysieren. Weniger BNCs können bei Proben mit hohen Dosen oder im Triage-Modus (siehe Abschnitt 12) ausgewertet werden. Die Verteilung der MN auf BNCs sollte ebenfalls dokumentiert werden. Die Objektträgerauswerter sollte über Erfahrung in der Mikrokernanalyse in Lymphozyten verfügen (siehe 11.1.3).

9.4.2 Auswertekriterien

9.4.2.1 Kriterien für die Auswahl von BNCs, die für die Auswertung von Mikrokernen verwendet werden

Die Zellen mit blockierter Zellteilung, die für die Auswertung von Mikrokernen verwendet werden können, sollten folgende Merkmale zeigen:

- a) die Zellen müssen zweikernig (binuklear, BN) sein;
- b) die beiden Kerne in einer BN-Zelle müssen eine intakte Kernmembran aufweisen und sich innerhalb derselben Zytoplasmagrenze befinden;
- c) die beiden Kerne in einer BN-Zelle müssen hinsichtlich Größe, Färbungsmuster und Färbungsintensität annähernd gleich sein;
- d) die beiden Hauptkerne in einer BN-Zelle dürfen einander berühren, sollten idealerweise aber einander nicht überlappen. Eine Zelle mit zwei sich überlappenden Kernen kann nur bewertet werden, wenn die Zytoplasmagrenzen beider Kerne unterscheidbar sind.
- e) die Zytoplasmagrenze oder Membran einer BN-Zelle muss intakt und deutlich von denen angrenzender Zellen unterscheidbar sein.

9.4.2.2 Kriterien für die Auswertung von MN

MN sind morphologisch identisch mit den Hauptkernen, jedoch kleiner als diese. Sie müssen außerdem die folgenden Merkmale aufweisen:

- a) der Durchmesser von MN in menschlichen Lymphozyten muss kleiner als 1/3 des mittleren Durchmessers der Hauptkerne sein;
- b) MN müssen frei im Zytoplasma der BN-Zelle liegen und dürfen nicht durch einen Halm des Kernmaterials mit dem Hauptkern verbunden sein;
- c) MN dürfen die Hauptkerne vereinzelt berühren, diese jedoch nicht vollständig überlappen und die Mikrokerngrenze muss von der Kerngrenze unterscheidbar sein;
- d) MN haben üblicherweise die gleiche Färbungsintensität wie die Hauptkerne, vereinzelt darf die Färbung jedoch intensiver sein;
- e) MN sind nicht lichtbrechend und können deshalb leicht von Artefakten, wie z. B. Farbpartikeln, unterschieden werden.

9.4.3 Auswerteprotokolle

Ein Beispiel eines Auswerteprotokoll ist in Anhang A angeführt.

9.5 Automatisierte Analyse

Es wurden mehrere Systeme zur automatisierten Bildanalyse für den CBMN-Test entwickelt. Die Automatisierung fällt derzeit nicht in den Anwendungsbereich dieses Dokuments.

10 Kalibrierquelle(n), Kalibrierkurve und kleinste nachweisbare Dosis

10.1 Kalibrierquelle(n)

Das Dienstleistungslabor muss einen Bericht vorlegen, der von einem qualifizierten Sachverständigen, d. h. Strahlenphysiker oder dem Leiter des Dienstleistungslabors, überprüft und bestätigt wurde und folgende Aspekte behandelt:

- Beschreibung der Strahlungsqualität [z. B. Röntgengerät mit einer Halbwertschichtdicke (HVL) von 2,1 mm Cu, 250 kVp, einem Heizstrom von 12,5 mA und einem Abstand zwischen Quelle und Oberfläche (en: source-to-surface distance, SSD) von 50 cm] und der Bestrahlungseinrichtung für alle zur Erstellung von In-vitro-Kalibrierkurven verwendeten Strahlungsquellen;
- Charakterisierung der Kalibrierquelle, die zur Erstellung jeder In-vitro-Kalibrierkurve verwendet wurde, und Rückführbarkeit auf ein nationales/internationales Strahlungsnorm;
- Beschreibung der Dosimetrie-Arbeitsvorschrift, des Verfahrens, mit dem bestätigt wird, dass die Dosimetrie-Methode entsprechend einer Norm kalibriert wurde, des Verfahrens, das zur Messung der gleichmäßigen Dosisverteilung in der Versuchsanordnung angewendet wurde, und der schriftlich festgelegten Verfahren und Dokumentationen zur Verifizierung der Bestimmung der Dosis und Dosisleistung für einzelne Versuche;
- Bereitstellung eines zusammenfassenden Dosimetrieberichts für jede Dosis-Wirkungs-Kurve einer Kalibrierquelle.

Weitere Einzelheiten zu Bestrahlungsparametern und -bedingungen können dem IAEA-Handbuch [11] entnommen werden.

10.2 Kalibrierkurve

Es ist wichtig, sicherzustellen, dass die Interpretation der Ergebnisse einer Dosisabschätzung mithilfe eines CBMN-Tests die Qualität der Bestrahlung in diesem Fall und die für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kalibrierkurve verwendete Kalibrierquelle berücksichtigt. Die Auswahl der Strahlungsquellen für die Kalibrierkurve sollte die wahrscheinlichsten zu analysierenden Fälle widerspiegeln. Üblicherweise sollten akute Dosisleistungen von über 0,3 Gy/min gewählt werden.

Für jedes Labor, das biologische Dosimetrie unter Anwendung des CBMN-Tests durchführt, ist eine Kalibrierkurve für den CBMN-Test erforderlich. Zur Erstellung der Kalibrierkurve müssen die gleichen Kultivierungsbedingungen angewendet werden, wie sie für die Analyse im Fall einer vermuteten ungeplanten Exposition angewendet werden. Die Kurve sollte für mindestens drei Altersgruppen, die in 1 Jahr bis 25 Jahre, 26 Jahre bis 50 Jahre, 51 Jahre bis 80 Jahre unterteilt sind, erstellt werden und mindestens 1 Einzelperson (vorzugsweise mehr) jedes Geschlechts in jeder Gruppe einschließt, wobei von jedem Spender die gleiche Anzahl an BNCs ausgewertet wird. Die Auswahl des Dosisbereiches der Kalibrierkurve hängt von der Strahlungsqualität ab. Im Fall von Niedrig-LET-Strahlung müssen mehr als sieben Dosispunkte ausgewählt werden, die gleichmäßig auf die lineare und quadratische Komponente der Dosis-Wirkungs-Kurve verteilt sind. Die typischen Dosen für eine Niedrig-LET-Kalibrierkurve sollten mindestens 0 Gy, 0,1 Gy, 0,2 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy umfassen. Jede wesentliche Abweichung von diesem Dosisbereich muss begründet werden. Die Einbeziehung von Daten mit 0 Gy, d. h. Daten von Blutproben, die keiner ionisierenden Strahlung ausgesetzt waren, in die Dosis-Wirkungs-Kurve für die Kalibrierung ist wichtig, weil dadurch die Bestimmung des y-Achsenschnittpunktes ermöglicht wird und die Auswirkungen von Alter und Geschlecht auf die Ausgangswerte der Häufigkeiten von Mikrokernen berücksichtigt werden [4].

Bei Dosen von weniger oder gleich 0,5 Gy sollten für jeden Spender mindestens 2 000 BNCs für die Auswertung von Mikrokernen je Dosispunkt verwendet werden und bei Dosen über 0,5 Gy sollten für jeden Spender mindestens 1 000 BNCs je Dosispunkt ausgewertet werden.

Die folgenden Definitionen werden für weitere Berechnungen verwendet:

- y : beobachtete dizentrische Chromosomen: Die absolute Anzahl der dizentrischen Chromosomen, die in n -bewerteten Zellen beobachtet wurden;
- μ : beobachtete Ausbeute an dizentrischen Chromosomen: Die beobachtete Anzahl der dizentrischen Chromosomen je Zelle.

Die beobachteten Häufigkeiten von MN in BNCs sollten an lineare oder linear-quadratische Modelle angepasst werden, wie in Gleichung (1) dargestellt. Bei den meisten Strahlungsarten mit hohem LET sollte ein lineares Modell geeigneter sein.

$$\mu = C (\pm SE_C) + \alpha (\pm SE_\alpha) D + \beta (\pm SE_\beta) D^2 \quad (1)$$

Dabei ist

- C geschätzter Hintergrundwert;
- α und β die linearen und quadratischen Gleichungskoeffizienten;
- D die vom Gewebe absorbierte Dosis, in Gy;
- SE die Standardfehler des Mittelwerts

Für die Kurvenanpassung sollte das Verfahren der iterativ-neugewichteten kleinsten Quadrate (en: iteratively reweighted least squares, IRLS) angewendet werden. Falls die Daten Überdispersion aufweisen, muss dies durch geeignete Gewichtung berücksichtigt werden. Wenn der erhaltene Chi-Quadrat-Wert größer ist als die Freiheitsgrade, sollten die Standardfehler um $(\text{Chi-Quadrat}/\text{Freiheitsgrad})^{1/2}$ oder durch Einsatz generalisierter linearer Modelle mit Verteilungen, die Überdispersion berücksichtigen (z. B. negative Binomialverteilung), erhöht werden.

Die Auswirkung von Alter, Geschlecht und Spender muss bewertet werden und entsprechend bei Bedarf für die Abschätzung der Standardfehler der Kurve berücksichtigt werden (z. B. durch Einbeziehen von Alter und Geschlecht als Parameter in Gleichung (1) oder durch Abschätzung der nach Alter und/oder Geschlecht geschichteten Kalibrierkurven).

Das Dienstleistungslabor muss einen Bericht über Kalibrierquelle, Dosisbereich und Dosis-Wirkungs-Kurve zur Verfügung stellen, der von einem qualifizierten Sachverständigen, d. h. Strahlenbiologe eines Dienstleistungslabors oder eine vergleichbare Fachkraft, überprüft und bestätigt werden muss und die folgenden Aspekte behandelt:

- vollständige Beschreibung der Strahlungsqualität [z. B. Röntgengerät mit einer Halbwertschichtdicke (HVL) von 2,1 mm Cu, 250 kVp, einem Heizstrom von 12,5 mA und einem Abstand zwischen Quelle und Oberfläche (en: source-to-surface distance, SSD) von 50 cm] und der Bestrahlungseinrichtung für alle zur Erstellung von In-vitro-Kalibrierkurven verwendeten Strahlungsquellen;
- Charakterisierung der Kalibrierquelle, die zur Erstellung jeder In-vitro-Kalibrierkurve verwendet wurde, und Rückführbarkeit auf ein nationales/internationales Strahlungsnormal;
- Beschreibung der Dosimetrie-Arbeitsvorschrift, einschließlich der Einzelheiten zur gemessenen Strahlungsmenge, des Verfahrens, mit dem bestätigt wird, dass die Dosimetrie-Methode entsprechend einer Norm kalibriert wurde, des Verfahrens, das zur Messung der gleichmäßigen Dosisverteilung in der Versuchsanordnung angewendet wurde, und der schriftlich festgelegten Verfahren und Dokumentationen zur Verifizierung der Bestimmung der Dosis und Dosisleistung für einzelne Versuche;
- Bereitstellung eines zusammenfassenden Dosimetrieberichts für jede Dosis-Wirkungs-Kurve einer Kalibrierquelle.

Weitere Einzelheiten zu Bestrahlungsparametern und -bedingungen können dem IAEA-Handbuch [11] entnommen werden.

10.3 Hintergrundhäufigkeit von Mikrokernen

Es wurde eindeutig festgestellt, dass die Hintergrundhäufigkeit von MN bei Einzelpersonen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht und auch aufgrund verschiedener beeinflussender Faktoren, d. h. Ernährungszustand, genotoxische Exposition, Lebensstilfaktoren Fehlverteilung von Geschlechtschromosomen, schwankt.[11] Für den Zweck der Strahlenbiodosimetrie unter Verwendung der MN-Häufigkeit in Lymphozyten wird angenommen, dass der Ausgangswert der MN-Häufigkeit einer Einzelperson vor der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung gleich dem durchschnittlichen Kontrollwert des Mikrokerns, der in verschiedenen Altersgruppen erhalten wurde, ist. Idealerweise sammelt jedes Labor seinen eigenen Datensatz zur Hintergrundhäufigkeit von Mikrokernen. Diese Daten sollten eine ausreichende Anzahl an Einzelpersonen jedes Geschlechts in jeder der drei Altersgruppen (z. B. 1 bis 25, 26 bis 50, 51 bis 80 Jahre), um für diese Bevölkerung repräsentative zu sein. Dies hängt von den Merkmalen der spezifischen Bevölkerung (Alter, Geschlecht und Exposition mit Mutagenen) und dem Expositionsszenario ab. Daher sollte dies vom Leiter des Labors mit den Beiträgen eines Statistikers bestimmt werden.

10.4 Vergleich mit dem Hintergrundwert: Charakterisierung der kleinsten nachweisbaren Dosis

In ISO 11929-1,[14] werden zwei charakteristische Grenzwerte festgelegt:

- die Erkennungsgrenze (y_d) oder die mindestens auflösbare Anzahl von MN, also der Grenzwert, oberhalb dessen angenommen werden kann, dass die physischen Effekte quantifizierbar sind. Mit anderen Worten kann die Erkennungsgrenze als die Mindestanzahl von MN verstanden werden, die sich signifikant, also um ein bestimmtes Signifikanzniveau α (z. B. $\alpha = 0,05$) von der erwarteten Grundhäufigkeit der MN unterscheiden;
- die Nachweisgrenze (y_z) ist der kleinste wahre Wert der Messgröße (Anzahl der MN), der erkannt werden kann. Sie liefert Informationen zum praktischen Nutzungsbereich der Analyse und wird damit für die Bewertung verwendet, ob das Messverfahren unter den angegebenen Umständen geeignet ist.

Die Erkennungs- und die Nachweisgrenze sollten berechnet werden, bevor die Messung durchgeführt wird.

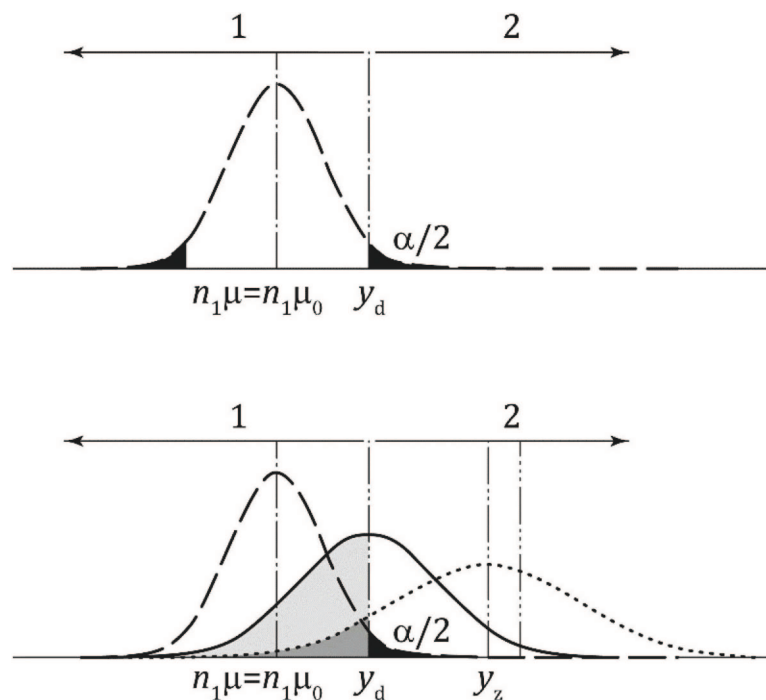
Tabelle 2 — Messabweichungsraten für die Herleitung von positiven und negativen Rückschlüssen

		Hergeleiteter Rückschluss	
		Prüfperson exponiert H_0 zurückgewiesen	Prüfperson nicht exponiert H_0 angenommen
Wahrer Zustand	Prüfperson exponiert H_0 falsch	Wahr-positiv	Typ-2-Fehler (β) Falsch-negativ
	Prüfperson nicht exponiert H_0 wahr	Typ-1-Fehler $\frac{\alpha}{2}$ Falsch-positiv	Wahr-negativ

Wenn eine Prüfperson eine Anzahl von MN zeigt, die über der Erkennungsgrenze (y_d) liegt, könnte man zu dem Schluss kommen, dass der Patient exponiert war und eine Dosisabschätzung durchgeführt werden sollte. In anderen Worten: Die Nullhypothese (H_0), das heißt die Annahme, dass die Prüfperson nicht exponiert war oder dass die beobachtete Anzahl der MN gleich der Grundhäufigkeit von MN ist, mit einer Typ-1-Fehlerbewertung $\frac{\alpha}{2}$ zurückgewiesen werden kann. Ein wichtiger zu berücksichtigender Parameter

ist jedoch die Tatsache, dass der Dosiswert Null nicht innerhalb des 95-%-Konfidenzintervalls, d. h. $1 - \alpha$, das aus der verwendeten Dosis-Wirkungs-Kurven gebildet wurde, vorhanden sein sollte. Sollte dies der Fall sein, könnte man nicht zu dem Schluss kommen, dass die Person exponiert war. Liegt die Anzahl der MN, y , dagegen unter der Erkennungsgrenze, y_d , wird entschieden, dass daraus nicht geschlossen werden kann, dass die Person exponiert war. In Abhängigkeit vom unbekannten wahren Zustand (siehe Tabelle 2) könnte die Wahrscheinlichkeit für ein falsch-negatives Ergebnis dennoch relativ hoch sein. Es kann also nicht geschlossen werden, dass die Person nicht exponiert war (siehe Bild 1).

In Fällen, in denen die beobachtete Anzahl der MN unter der Erkennungsgrenze liegt, muss die Nachweisgrenze gemeldet werden. Die Nachweisgrenze liefert wertvolle Daten zur wahren Dosis (oder Anzahl der MN), oberhalb der weniger als 100 β % falsch-negative Ergebnisse erwartet werden. Die Nachweisgrenze kann wie folgt ausgewertet werden: Unter der Annahme des wahren Zustands, dass eine Prüfperson exponiert war (siehe Tabelle 2) und bei einer wahren Dosis oder Anzahl der MN der Prüfperson über der Nachweisgrenze wäre die Wahrscheinlichkeit, dass eine Anzahl der MN unterhalb der Erkennungsgrenze erkannt und damit ein falsch-negativer Rückschluss hergeleitet werden kann, kleiner als β .



Legende

1	H_0 angenommen	—	Probenverteilung unter H_1 (Mittelwert bei y_d)
2	H_0 zurückgewiesen		Probenverteilung unter H_1 (Mittelwert bei y_z)
—	Probenverteilung unter H_0	—....	Nachweisgrenze y_z
—...—	Erkennungsgrenze y_d		

Bild 1 — Darstellung der Erkennungs- und der Nachweisgrenze ($\mu_0 = \text{Konstante}$)

Obere Grafik: Wenn die Nullhypothese H_0 (Prüfperson nicht exponiert) wahr ist, d. h. die Anzahl der MN μ der Prüfperson ist gleich der Grundhäufigkeit der MN μ_0 , dann ist die Wahrscheinlichkeit für eine fälschliche Zurückweisung von H_0 oder für die Beobachtung der Anzahl von MN, die über der Erkennungsgrenze y_d liegt, kleiner als $\frac{\alpha}{2}$.

Untere Grafik: Wenn die Alternativhypothese H_1 (Prüfperson exponiert) wahr und die wahre Dosis bzw. die wahre Anzahl von MN gleich der Erkennungsgrenze y_d ist, dann liegt die Wahrscheinlichkeit für eine fälschliche Annahme von H_0 bei etwa 0,5 (hellgraue Fläche unter der Kurve). Wenn die wahre Dosis bzw. die wahre Anzahl

von MN über der Nachweisgrenze liegt, ist die Wahrscheinlichkeit für eine fälschliche Annahme von H_0 kleiner als eine definierte Typ-2-Fehlerrate von β (z. B. $\beta = 0,1$).

Zur Festlegung der Erkennungsgrenze wird angenommen, dass die Prüfperson nicht exponiert war, d. h. die Anzahl der MN der Prüfperson μ ist gleich der Grundhäufigkeit von MN $\mu_0(j)$ für eine Person im Alter von j Jahren. Die Nullhypothese ist gegeben durch $\mu = \mu_0(j)$ [bzw. $n\mu = n\mu_0(j)$]. Unter der Annahme, dass die Hintergrundhäufigkeit von MN konstant ist, d. h. keine Unsicherheit aufweist, und dass die Anzahl der MN einer negativen Binomialverteilung des Typs I mit dem Dispersionsparameter τ folgt, kann die Erkennungsgrenze, y_d , durch die folgende Wahrscheinlichkeit festgelegt werden:

$$P(y > y_d | n_1\mu = n_1\mu_0(j), \tau) = \sum_{k=y_d+1}^{\infty} \frac{\Gamma(k + \frac{n_1\mu_0(j)}{\tau})}{\Gamma(\frac{n_1\mu_0(j)}{\tau}) \Gamma(k+1) (1+\tau)^{k + \frac{n_1\mu_0(j)}{\tau}}} =$$
$$1 - \sum_{k=0}^{y_d} \frac{\Gamma(k + n_1\mu_0(j)/\tau) \tau^k}{\Gamma(n_1\mu_0(j)/\tau) \Gamma(k+1) (1+\tau)^{k + n_1\mu_0(j)/\tau}} \leq \frac{\alpha}{2} \quad (2)$$

Dabei ist

n_1 die Anzahl der bewerteten Zellen für die Prüfperson;

τ der Dispersionsparameter der negativen Binomialverteilung des Typs I;

α die Wahrscheinlichkeit für einen Typ-1-Fehler (falsch-positiv), der allgemein mit 5 % angegeben wird.

Wieder unter der Annahme, dass die Anzahl von MN der Prüfperson einer negativen Binomialverteilung des Typs I unterliegt, wird die Nachweisgrenze für die Anzahl von MN, y_z , durch die Gleichung (3) festgelegt:

$$P(y \leq y_d | n_1\mu = y_z, \tau) = \sum_{k=0}^{y_d} \frac{\Gamma(k + y_z/\tau) \tau^k}{\Gamma(y_z/\tau) \Gamma(k+1) (1+\tau)^{k+y_z/\tau}} \frac{\Gamma(k + y_z/\tau) \tau^k}{\Gamma(y_z/\tau) \Gamma(k+1) (1+\tau)^{k+y_z/\tau}} = \beta \quad (3)$$

Die Letztere Gleichung (3) kann iterativ gelöst werden (siehe Beispiel in Anhang F).

Dabei ist β der Typ-2-Fehler (falsch-negativ), der allgemein zwischen 5 % und 20 % liegen würde;

Ein detailliertes Beispiel für die Berechnung der Erkennungs- und der Nachweisgrenze kann Anhang F entnommen werden.

Für den CBMN-Test sind die Erkennungs- und die Nachweisgrenze faktisch Funktionen einer Reihe von Faktoren, wie die im Labor geeignete gemessene oder gewählte Kontroll-Grundhäufigkeit von MNs und die Anzahl der für die Analyse ausgewählten Zellen. Es ist daher erforderlich, die Erkennungs- und die Nachweisgrenze fallweise zu bewerten. Die Nachweisgrenze kann durch Anwendung der Kalibrierkurve in eine „minimale nachweisbare Dosis“ umgewandelt werden, wie in Anhang F dargestellt. In allen Fällen kann die minimale nachweisbare Dosis jedoch nicht niedriger sein als die niedrigste in der entsprechenden Kalibrierkurve verwendete Dosis.

Wenn die beobachtete Anzahl von MN die Erkennungsgrenze überschreitet, dann bedeutet das, dass es einen Nachweis dafür gibt, die Nullhypothese über das Fehlen einer signifikanten Differenz zwischen dem Hintergrundwert und der beobachteten Anzahl der MN anzufechten. Die Berechnung der beobachteten absorbierten Dosis sollte dann durchgeführt und nach den Angaben in 11.2.4 gemeldet werden. Andernfalls sollte die Nachweisgrenze gemeldet werden.

Wenn die wahre Anzahl von MN höher ist als die Nachweisgrenze (oder die wahre Dosis höher ist als die minimale nachweisbare Dosis), dann ist die Wahrscheinlichkeit, eine geringere Anzahl von MN als die Erkennungsgrenze zu beobachten (oder die Wahrscheinlichkeit, falsch-negative Rückschlüsse herzuleiten), kleiner als β .