



Laboratórne postupy využívané pre ľudský biomonitoring

Zuzana Vassányi, Eva Krčmová

Konzultačný deň NRC pre laboratórnu diagnostiku v oblasti ľudského biomonitoringu
RÚVZ so sídlom v Banskej Bystrici, 3.11.2015

Ľudský biomonitoring (HBM)

- Najúčinnnejší nástroj pre **identifikáciu, kontrolu a prevenciu expozície** populácie **environmentálnym chemickým škodlivinám**
- Vedecký prístup, meranie **obsahu biomarkera** (toxického prvku, chemickej zlúčeniny alebo jej metabolitu) **v ľudskom biologickom materiáli**, v telesných tekutinách a tkanivách.



Matematický model odhadu expozície

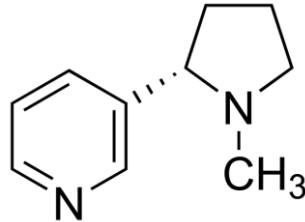
- ▶ Koncentrácia látky v zložkách ŽP (voda, ovzdušie, potraviny, prach...)
- ▶ Zdravotný stav
- ▶ Životný štýl a stravovanie
- ▶ Genetické predispozície
- ▶ Absorbpcia (pokožka, GIT, pľúca)
- ▶ Metabolizmus
- ▶ Akumulácia
- ▶ Vylučovanie



Predikovaná hladina chemickej škodliviny u človeka

Laboratórna diagnostika HBM

⦿ **Biomarkery**



⦿ **Biologický materiál**



⦿ **Laboratórna analýza**



Biomarkery

>300 biomarkerov environmentálnej expozície:

Pesticídy, insekticídy, herbicídy, fungicídy

Kovy a stopové prvky (Pb, Cd, Hg, As, F, ...)

Fenoly, ftaláty, parabény

Perchloráty, perfluoroderiváty, polybrómované deriváty

PCB a dioxíny

Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU)

Fytoestrogény

Dezinfekčné činidlá

Prchavé organické látky

Kotinín – biomarker expozície tabakovému dymu

Biomarkery – HBM v Kanade



Skupiny látok	2007-2009	2010-2011	2012-2013
Organochlórové zlúčeniny	x		
Polybrómované retardanty horenia	x		
Polychlórované bifenyly (PCB)	x		
Chlórfenoly	x	x	
Perfluórované alkyly	x	x	
Metabolity ftalátov	x	x	
Pesticídy	x	x	
Fenoly (Bisfenol A, Triclosan)	x	x	x
Stopové prvky a kovy (Pb, Cd, Hg, As, F)	x	x	x
Metabolit nikotínu	x	x	x
Metabolity PAU		x	x
Prchavé organické látky		x	x
Metabolity benzénu		x	x
Metabolity akrylamidu			x
Trihalometány			x

Biologický materiál – 1

Materiál	I/N	Výhody/nevýhody	Biomarker
Krv, sérum, plazma	I	Štandardizované postupy odberu odborný personál limitovaný objem vzorky transport, uchovávanie	Široká škála biomarkerov – rovnováha kovy, stopové prvky , lipofilné látky, POP (PCB, dioxíny, perfluorderiváty) pesticídy, ftaláty, alkylfenoly, VOC
Moč	N	Veľký objem stanovenie metabolitov zloženie sa mení v čase prepočet na kreatinín	Široká škála biomarkerov kovy, stopové prvky metabolity PAU , ftalátov, benzénu , nikotínu
Vlasy	N	Jednoduchý odber informácia o kumulácii látky časová sekvenčná analýza	Kovy, stopové prvky (Hg , As ,) metylortuť, POP, parabény, nikotín
Nechty	N	Jednoduchý odber a skladovanie chem. kontaminácia, poškodenie	Kovy, stopové prvky (As , Cd , Pb , Hg)
Sliny	N	Nízka koncentrácia biomarkerov malý význam pre HBM – (drogy!)	Kovy, stopové prvky , organické látky (Cd , ftaláty, BPA, PCB, dioxíny)
Pot	N	Komplikovaný odber malý význam pre HBM	Kovy, stopové prvky , organické látky (Pb , Cd)
Vydychovaný vzduch	N	Limitovaný rozsah látok priame meranie	vedľajšie produkty dezinfekcie vody - trihalometány

Biologický materiál – 2

Biologický materiál	I/N	Výhody/nevýhody	Biomarker
Mekonium (smolka)	N	Jednorazový odber, prenatálna expozícia	Kovy (Cd,Hg), organické látky, ftaláty, nikotín, POP (PCB, CHI...)
Placenta	N	Jednorazový odber, prenatálna expozícia	Kovy (Cd,Hg, Pb), organické látky, ftaláty, BPA, PAU, nikotín, PCB, dioxíny
Plodová voda	I	Odber amniocentéza, pôrod cisárskym rezom	Stopové prvky (Hg), organické látky, ftaláty, POP (PCB, CHI...)
Pupočníková krv	N	Informácia matka/dieťa jednorazový odber	Kovy, POP (dioxíny, org. F, Br, Cl deriváty), ftaláty, THM, nikotín, pesticídy...
Materské mlieko	N/I	Informácia matka/dieťa lypofilné zlúčeniny	POP (PCB, CHI, dioxíny) ftaláty, alkylfenoly, BPA, nikotín, pesticídy, BFR, stopové prvky (Pb, Cd, Hg)
Dočasné zuby (mliečné zuby)	N	Málo dostupné, málo zdokumentované pre HBM	Kovy, stopové prvky (Pb, Cd), organické látky, tabak

HBM – počet vzoriek a biomarkerov

HBM	Počet vzoriek	Počet biomarkerov
USA NBP* 2001	>2500	27
USA NBP* 2003	>2500	116
USA NBP* 2009	>2500	212
Kanada 2007-2009 – 1.	5 600	92
Kanada 2009-2011 – 2.	6 400	91
Kanada 2011-2013 – 3.	5 800	48
Democophes EU**	3 688	8

* NBP – National Biomonitoring Program

17 štátov EU, v SR – analýza 240 vzoriek



Množstvo vzorky

Materiál	Objem	Analyt – objem vzorky
Krv EDTA	4,0 - 6,0 - 10 ml	Akrylamid – 1,5 ml Pb, Cd – 1,0 ml Metylortuť – 1,8 ml
Krv	10 ml	Volatilné organické látky – 10 ml
Moč	120 ml	Kreatinín – 0,5 ml Fluorid – 0,8 ml Arzén ako špecie – 1,0 ml Metabolit nikotínu – 0,8 ml Ortuť anorganická – 1,5 ml Fenoly (BPA, triclosan) – 0,8 ml Metaboly PAU a benzénu – 12 ml



Odber biologického materiálu pre 3. cyklus HBM

Koncentrácie biomarkerov

environmentálna expozícia HBM / pracovná expozícia (BMH)

Biomarker	HBM *	BMH **	Pomer
Olovo (K)	11,0 µg/l	400 µg/l	36 x
Ortuť (K)	0,81 µg/l	25 µg/l	30 x
Kys. t,t-mukonová (M)	56 µg/l	2,0 mg/l	35 x
Kys. S-fenylmerkapturová (M)	0,17 µg/l	0,072 mg/l	424 x
1-hydroxypyren (M)	0,088 µg/l	5,66 µg/l	64 x

* HBM Kanada - 3. cyklus, r. 2011-2013
priemerná hodnota súboru, počet vzoriek 5800, vek 6-79 rokov



** BMH – biologická medzná hodnota pracovnej expozície v SR (NV 355/2006 Z. z.)



HBM – metóda stanovenia/limit detekcie

Biomarker	Metóda*	LOD ($\mu\text{g/l}$)	Metóda**	LOD ($\mu\text{g/l}$)	Pomer
Olovo (K)	ICP MS	2,0	AAS ETA	13	6,5 x
Ortuť (K)	ICP MS	0,40	AAS AMA	0,50	*
Kys. t,t-mukonová (M)	UPLC MS	0,60	HPLC DAD	50	83 x
Kotinín (M)	UPLC MS	1,0	HPLC DAD	3,3	3,3 x
1-hydroxypyren (M)	GC MS TQ	0,003	HPLC FLD	13	4300 x



* HBM Kanada - 3. cyklus



** Laboratórium OCHA

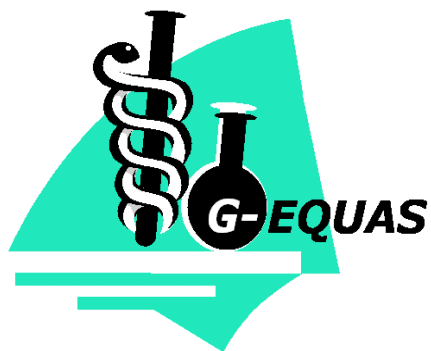


Metódy stanovenia biomarkerov

Biomarker (3. cyklus HBM)	Metóda stanovenia/technika
Stopové prvky – Pb, Cd (K)	ICP MS
Špeciálna analýza As (M)	UPLC/ICP MS tandem
Ortuť anorganická (M)	rozklad - kys. dusičná/ CV AAS
Metylortuť (K)	SPE/UPLC/ICP MS
Fluoridy (M)	Potenciometria/ionselektívna elektróda
Metabolit nikotínu (M)	SPE/ UPLC MS (ESI)
Metabolity PAU (M)	Enzymatická hydrolýza, extrakcia L/L, derivatizácia (TMS TFA), GC MS (TQ)
Metabolity benzénu (M)	SPE/UPLC MS TQ
Prchavé organické látky (K)	SPME/kryofokusácia/GC MS TSQ
Akrylamid (K)	Derivatizácia/SPE/UPLC MS
Fenoly (BFA, triclosan) (M)	Enzymatická hydrolýza, derivatizácia, extrakcia L/L, GC MS

Kontrola kvality

- **Interná kontrola kvality** –
matricové certifikované referenčné materiály
- **Externá kontrola kvality** –
medzinárodné medzilaboratórne porovnávanie



G-EQUAS

The German External Quality Assessment Scheme For Analyses in Biological Materials

Institute for Occupational, Social and Environmental Medicine
University of Erlangen, Norimberg, Nemecko

Biologický materiál (K, M, V)

>160 ukazovateľov – prvky, špécie, organické látky, metabolity
2 koncentračné úrovne: profesionálna expozícia
environmentálna expozícia

Špecifická laboratórnej diagnostiky HBM

- ▶ **biomarkery** – veľký počet analytov, chemicky rôznorodé
- ▶ **biologický materiál** – rôzne druhy, komplexné matrice
- ▶ **veľké súbory** – rádovo stovky, tisíce vzoriek
- ▶ **obmedzené množstvo vzorky** – automatizované mikrometódy
- ▶ **stopová a ultrastopová analýza** – LOD
- ▶ **interná a externá kontrola kvality** – MPS
- ▶ **databanka** – zber a uchovávanie dát
- ▶ **biobanka** – dlhodobé uchovávanie vzoriek

