

Eindrapport

# Onderbouwde inschatting van de gezondheidskundige ernst van thallium en arseen ter formulering van beleidsaanbevelingen voor verdere opvolging in het leefmilieu en/of de mens

Elly Den Hond<sup>1</sup>, Kim Croes<sup>2</sup>, Sam De Craemer<sup>2</sup>, Melissa Paulussen<sup>3</sup>, Els Van de Mieroop<sup>3</sup>, Michel Stalpaert<sup>4</sup>, Marc Uytterhoeven<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Milieurisico en Gezondheid, Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO), Mol

<sup>2</sup> Departement Analytische en Milieuchemie, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussel

<sup>3</sup> Dienst Gezondheid, Provinciaal Instituut voor Hygiëne (PIH), Antwerpen

<sup>4</sup> Algemeen Medisch Laboratorium (AML), Antwerpen

Studie uitgevoerd in opdracht van LNE, contract LNE/OI2012000028/13103/M&G 2014/MRG/R/241

December 2014



## VITO NV

Boeretang 200 - 2400 MOL - BELGIE  
Tel. + 32 14 33 55 11 - Fax + 32 14 33 55 99  
vito@vito.be - www.vito.be

BTW BE-0244.195.916 RPR (Turnhout)  
Bank 375-1117354-90 ING  
BE34 3751 1173 5490 - BBRUBEBB



---

## SAMENVATTING

---

### THALLIUM

In deze studie werd de beschikbare methode voor het meten van **thallium in volboed** gevalideerd en toegepast op biobankstalen.

#### **Conclusies omtrent blootstelling en gezondheidkundige ernst van thallium:**

- De referentiewaarden voor thallium in bloed bij jongeren in Vlaanderen zijn vrij constant doorheen de tijd. Er is dus geen daling, maar ook geen stijging vast te stellen in de loop van de tijd.
- De waarden die in algemeen Vlaanderen worden gemeten zijn vrij hoog in vergelijking met de waarden uit het buitenland die gerapporteerd worden in de literatuur. Ook de gemiddelde concentratie voor thallium in de urine die gemeten werd in de referentiepopulatie jongeren in 2008 (dus niet in dit project) lag hoog in vergelijking met de literatuur.
- De concentraties van thallium in bloed en/of urine in sommige hotspots zijn verhoogd. Het opvolgen van thallium in specifieke regio's is dus belangrijk. Om deze resultaten goed te kaderen, is het essentieel om referentiewaarden voor algemeen Vlaanderen beschikbaar te hebben.
- Bij de huidige niveaus werden in de Vlaamse populaties significante blootstelling-respons relaties vastgesteld. In de analyses van de resultaten van het 2<sup>e</sup> Steunpunt Milieu en Gezondheid op basis van de gegevens van de Vlaamse referentiepopulatie, Genk-Zuid en Menen samen (n=609) werden effecten van thallium vastgesteld op de puberteitsontwikkeling, schildklierhormonen, voorkomen van allergieën, nierfunctie en op de genotoxiteitsmarkers bij adolescenten. Bij moeders van de pasgeborenen uit het 2<sup>e</sup> Steunpunt (n=254) werd thallium in bloed in verband gebracht met het voorkomen van allergieën en met vruchtbaarheidsproblemen. Thallium in navelstrengbloed was geassocieerd met effecten op de groei van de baby en met hormoongehalten in het bloed. Dit betekent dus dat er bij de gangbare achtergrondwaarden effecten op de gezondheid worden vastgesteld.
- Op dit moment zijn er geen internationaal erkende gezondheidkundige richtlijnen beschikbaar voor bloed thallium. Representatieve studies, zoals het humane biomonitoringsonderzoek in Vlaanderen, kunnen een belangrijke bijdrage leveren voor het opstellen van richtlijnen op internationaal niveau.

#### **Beleidsadvies:**

Voor toekomstige biomonitoringstudies zou het een meerwaarde zijn om bloed thallium verder op te volgen. Nieuwe metingen kunnen op verschillende vlakken bijkomende informatie opleveren voor de interpretatie van de gezondheidkundige ernst van blootstelling aan thallium: ze laten toe om tijdstrends meer in detail te bestuderen, om resultaten van hotspots beter te kaderen, om relaties tussen blootstelling en gezondheidseffecten te bestuderen, en om de niveaus in Vlaanderen te evalueren ten opzichte van buitenlandse studies. De meting kan simultaan gebeuren met die van andere zware metalen zonder meerkost; het vereist wel bijkomende interpretatie.

## ARSEEN

In deze studie werd een nieuwe methode opgesteld voor het meten van de aparte **arseenmetabolieten in urine**, nl. voor As(III), As(V), mono methyl arsenaat (MMA), dimethyl arsenaat (DMA) en arsenobetaïne. Op basis hiervan kan toxisch relevant arseen (TRA) berekend worden als de som parameter van As (III), As (V), MMA en DMA. De berekende waarde van TRA werd gevalideerd ten opzichte van de methode die vroeger gebruikt werd voor het meten van TRA, en de metingen werden geïnterpreteerd in een gezondheidskundige context.

### Conclusies omtrent blootstelling en gezondheidskundige ernst van arseen:

- Validatie van de nieuwe methode (HR-ICP-MS) ten opzichte van de oude meettechniek (hydride-AAS) toont aan dat beide metingen sterk gecorreleerd zijn. De nieuwe methode leidde tot een waarde die gemiddeld 25% lager lag dan de oude waarde, maar de correlatie tussen beide meettechnieken was sterk ( $R^2=0,68$ ) en hoog significant. De resultaten lagen in de buurt van de lijn van gelijkheid, en op basis van de Altman-Bland plot was er geen systematische afwijking.
- De meting met HR-ICP-MS betekent een belangrijke meerwaarde omdat het informatie geeft over de aparte arseenmetabolieten. Een nadeel is de hogere prijs voor de meting (ongeveer dubbel), maar de kosten-baten is goed omdat er ook een meerwaarde is voor de interpretatie.
- De meting van de aparte metabolieten levert een meerwaarde naar bronnen en metabolisme bij de mens. Op groepsniveau worden positieve en sterke correlaties geobserveerd tussen DMA en arsenobetaïne, maar geen sterke correlatie tussen MMA en arsenobetaïne. Dit is in overeenstemming met de hypothese dat visconsumptie een bron kan zijn van arsenobetaïne en DMA, maar niet (of weinig) van MMA. Verder werd een positieve en significante correlatie gedetecteerd tussen As(III)/As(V) en MMA/DMA, maar niet met arsenobetaïne. Dit is in overeenstemming met de kennis over metabolisme: As(III) en As(V) worden in het lichaam omgezet tot MMA en DMA. Arsenobetaïne volgt een andere metaboliseroute.
- Aangezien er voor alle aparte metabolieten gezondheidskundige richtlijnen beschikbaar zijn, is het mogelijk om de aparte metabolieten te evalueren naar gezondheidskundige ernst, en blootstelling op bevolkingsniveau op een meer genuanceerde manier te evalueren. Deze interpretatie is niet mogelijk op basis van de informatie over visconsumptie vanuit de vragenlijsten.
- De analyse van blootstelling-effectrelaties tussen de aparte arseenmetabolieten enerzijds en gezondheidskundige eindpunten anderzijds, leverde nieuwe informatie op over de gezondheidskundige ernst van de aparte arseenmetabolieten. Er werd significante associaties geobserveerd tussen de arseenmetabolieten en 8-hydroxy-deoxyguanosine in de urine, een merker voor DNA-schade. Alle toxische arseenmetabolieten – As(III), As(V), MMA, DMA – evenals de som parameter TRA waren significant en positief geassocieerd met urinair 8-hydroxy-deoxyguanosine. Dit betekent dat hogere blootstelling aan toxisch arseen geassocieerd was met meer DNA-schade. De sterkste relatie werd geobserveerd voor de concentratie van MMA in de urine ( $R^2=0,44$ ;  $p<0,001$ ). Voor arsenobetaïne – de niet-toxische arseenmetabooliet – werd er geen significante relatie gevonden met 8-hydroxy-deoxyguanosine in de urine. Dit suggereert dat de toxische metabolieten selectieve informatie kunnen geven over de toxiciteit.

**Beleidsadvies:**

Voor toekomstige biomonitoringstudies zou het een meerwaarde zijn om de aparte arseenmetabolieten in urine verder op te volgen. De analyse van de aparte arseenmetabolieten levert informatie over metabolisme in het lichaam en iedere metaboliet is specifiek gecorreleerd met mogelijke bronnen. De metingen in de urine zijn superieur ten opzicht van gegevens over visconsumptie op basis van vragenlijsten. Aangezien er voor de verschillende arseenmetabolieten aparte toxicologische richtlijnen beschikbaar zijn, leveren de afzonderlijke metingen belangrijke informatie voor de interpretatie op gezondheidskundig vlak. Ook bij het bestuderen van blootstelling-effectrelaties is het mogelijk om een meer genuanceerd beeld te bekomen op basis van de aparte arseenmetabolieten. De nieuw ontwikkelde meetmethode betekent een meerprijs ten opzicht van de vroegere methode maar de kosten-baten is goed omdat er ook een meerwaarde is voor de interpretatie.

**BIOBANK**

Een belangrijke randopmerking bij deze studie is dat er voor het eerst op grote schaal werd aangetoond dat **biobankstalen** uit de Vlaamse humane biomonitoringscampagnes zeer nuttig zijn om metingen uit te voeren met bestaande of nieuw ontwikkelde methoden om op deze manier waardevolle informatie te bekomen over tijdstrends, over bronnen en metabolisatie in het lichaam, en over toxische effecten op het lichaam.

## INHOUD

<b>Samenvatting</b>	<b>I</b>
<i>Thallium</i>	<i>I</i>
<i>Arseen</i>	<i>II</i>
<i>Biobank</i>	<i>III</i>
<b>Inhoud</b>	<b>IV</b>
<b>Lijst van tabellen</b>	<b>VI</b>
<b>Lijst van figuren</b>	<b>VII</b>
<b>Lijst van afkortingen</b>	<b>VIII</b>
<b>HOOFDSTUK 1. Inleiding</b>	<b>1</b>
<b>HOOFDSTUK 2. Kwaliteitscontroles op de metingen</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Methode</i>	3
2.1.1. Selectie van de controlestalen voor bloed thallium	3
2.1.2. Selectie van de controlestalen voor toxisch relevant arseen in urine	4
2.2. <i>Resultaten</i>	5
2.2.1. Controlemetingen van thallium in bloed	5
2.2.2. Controlemetingen van toxisch relevant arseen in urine	12
<b>HOOFDSTUK 3. Thallium</b>	<b>17</b>
3.1. <i>Achtergrondinformatie</i>	17
3.1.1. Literatuurstudie	17
3.1.2. Blootstelling-effect relaties uit Steunpunt M&G	20
3.2. <i>Methode</i>	21
3.2.1. Selectie van de stalen	21
3.2.2. Beschrijving meetmethode	22
3.2.3. Validatie meetmethode	22
3.2.4. Data management en statistische analyse	23
3.3. <i>Resultaten bloed thallium</i>	24
3.3.1. Bloed thallium metingen in historisch perspectief	24
3.3.2. Determinanten van blootstelling	29
3.3.3. Dosis-effect relaties 1 <sup>e</sup> Steunpunt M&G	29
3.3.4. Vergelijking met gezondheidskundige richtlijn en met buitenlandse studies	30
<b>HOOFDSTUK 4. Arseen</b>	<b>32</b>
4.1. <i>Achtergrondinformatie</i>	32
4.1.1. Literatuurstudie	32
4.1.2. Blootstelling-effect relaties uit Steunpunt M&G	37
4.2. <i>Methode</i>	37
4.2.1. Selectie van de stalen	37

---

4.2.2.	Meetmethode	38
4.2.3.	Validatie meetmethode	38
4.2.4.	Data management en statistische analyse	41
4.3.	<i>Resultaten arseen-speciatie</i>	41
4.3.1.	Vergelijking van twee meetmethoden	41
4.3.2.	Beschrijvende statistiek en correlaties tussen urinaire arseenmetabolieten	44
4.3.3.	Determinanten van arseenmetabolieten in urine	48
4.3.4.	Gezondheidskundige richtlijnen	50
4.3.5.	Tijdslijn	52
4.3.6.	Blootstelling-effectrelaties	53
<b>HOOFDSTUK 5.</b>	<b>Beleidsrelevante interpretatie en conclusies</b>	<b>56</b>
5.1.	<i>Thallium</i>	56
5.2.	<i>Arseen</i>	57
5.3.	<i>Algemeen besluit</i>	59
<b>Literatuurlijst</b>		<b>61</b>

## LIJST VAN TABELLEN

Tabel 1: Bloed thallium: meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G vs. nieuwe meting door VUB	5
Tabel 2: Thallium in bloed: meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G vs. nieuwe meting door AML	7
Tabel 3: Thallium in bloed: nieuwe meting door VUB vs. nieuwe meting door AML	9
Tabel 4: Toxisch relevant arseen: meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G vs. nieuwe meting door AML	12
Tabel 5: LOAEL's voor thallium voor blootstelling via orale route (bron: ATSDR, 1992)	19
Tabel 6: Geschatte dagelijks inname van thallium bij de mens (ATSDR, 1992)	19
Tabel 7: Literatuuroverzicht van waarden voor thallium in bloed en urine bij de mens	20
Tabel 8: Procedurele blanco's en detectielimiet voor bloed thallium in ng/l	22
Tabel 9: Recoveries van referentiestaal (verhouding gemeten resultaat / gecertificeerd resultaat)	23
Tabel 10: Recoveries van eigen poolstaal (ng/l)	23
Tabel 11: Beschrijvende statistiek voor bloed thallium (ng/l) in opeenvolgende HBM campagnes in Vlaanderen	25
Tabel 12: Determinanten van blootstelling voor bloed thallium	29
Tabel 13: LOAEL en NOAEL waarden voor dermale effecten bij de mens	34
Tabel 14: Berekende blootstelling aan arseen (uit: Bierkens et al., 2006)	34
Tabel 15: Biomonitoring Equivalenten per leeftijdsgroep (op basis van Hays et al., 2010)	35
Tabel 16: Referentiewaarden voor arseen in bloed en urine volgens de literatuur	35
Tabel 17: Vergelijking tussen meting van toxisch relevant arseen met hydride-AAS (2008) en meting van toxisch relevant arseen met HR-ICP-MS (2014), voor totale groep, en per tertiel.	43
Tabel 18: Beschrijvende statistiek voor urinaire arseenmetabolieten bij 90 jongeren uit de HBM campagnes in Vlaanderen	45
Tabel 19: Correlatie matrix tussen arseenmetabolieten (in µg/l, ln getransformeerd), N=90	46
Tabel 20: Vergelijking van arseenmetabolieten in urine volgens recente visconsumptie	48
Tabel 21: Aantal (%) jongeren met arseenmetabolieten boven gezondheidskundige richtlijn	51



## LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1: Thallium in bloed: nieuwe meting door VUB vs. meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G	6
Figuur 2: Bloed thallium: vergelijking nieuwe meting door VUB vs. meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G: Altman-Bland plot	7
Figuur 3: Thallium in bloed: nieuwe meting door AML vs. meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G	8
Figuur 4: Bloed thallium: vergelijking nieuwe meting door AML vs. meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G: Altman-Bland plot	9
Figuur 5: Thallium in bloed: nieuwe meting door AML vs. nieuwe meting door VUB	10
Figuur 6: Bloed thallium: vergelijking nieuwe meting door AML vs. nieuwe meting door VUB: Altman-Bland plot	11
Figuur 7: Toxisch relevant arseen in urine: nieuwe meting door AML vs. meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G	14
Figuur 8: Toxisch relevant arseen in urine: nieuwe meting door AML vs. meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G – resultaten voor referentie (n=4) en Genk-Zuid (n=5) apart. De regressievergelijking werd berekend op alle punten samen.	15
Figuur 9: Toxisch relevant arseen: vergelijking nieuwe meting door AML vs. meting 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G: Altman-Bland plot	16
Figuur 10: Box plots voor bloed thallium in verschillende jongerencampagnes van Steunpunt M&G	26
Figuur 11: Tijdstrends voor bloed thallium bij jongeren (14-15 jaar) in opeenvolgende HBM campagnes	28
Figuur 12: Correlatieplot tussen vrij trijodothyronine (fT3) in serum en bloed thallium	30
Figuur 13: Blootstellingsroutes en toxiciteit van arseenmetabolieten (bron: Hays et al., 2010)	33
Figuur 14: Vergelijking tussen meting van toxisch relevant arseen met hydride-AAS (2008) en meting van toxisch relevant arseen met HR-ICP-MS (2014)	42
Figuur 15: Gemiddelde TRA op basis van twee metingen (hydride-AAS uit 2008 en HR-ICP-MS uit 2014) per tertiel (op basis van metingen uit 2008).	43
Figuur 16: Correlatieplots van MMA en DMA met de andere arseenmetabolieten	47
Figuur 17: Urinair DMA en arsenobetaine ( $\mu\text{g/g}$ creatinine) volgens visconsumptie in voorbije 3 dagen bij jongeren van 2 <sup>e</sup> Steunpunt M&G (referentie + Genk-Zuid)	48
Figuur 18: Distributie van SMI (ratio DMA / MMA) bij viseters en niet-viseters	49
Figuur 19: Gemiddelde blootstelling voor totale groep en per subgroep: A. As(V); B. MMA; C. DMA; D. arsenobetaine; E. toxisch relevant arseen (TRA, som van As(III), As(V), MMA en DMA)	51
Figuur 20: Tijdstrends voor toxisch relevant arseen op basis van alle beschikbare metingen met HR- ICP-MS	52
Figuur 21: Tijdstrends voor toxisch relevant arseen op basis van beschikbare metingen met hydride- AAS	53
Figuur 22: Correlatiematrices tussen verschillende arseenmetabolieten en 8-hydroxy-deoxy- guanosine in urine	54

## LIJST VAN AFKORTINGEN

AAS	atomaire absorptie spectrometrie
AML	Algemeen Medisch Laboratorium
ANOVA	analysis of variance
As	arseen
As(III)	3-waardig arseen
As(V)	5-waardig arseen
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BE	Biomonitoring Equivalent
BEI	Biological Exposure Index
BI	betrouwbaarheidsinterval
BMDL	benchmark dose level
BMI	body-mass index
CCA	chromium koper arsenaat
Cd	cadmium
DMA	dimethyl arsenaat
DNA	deoxyribonucleic acid
EFSA	European Food Safety Authority
EHC	Environmental Health Criteria
EPA	Environmental Protection Agency
FLEHS	Flemish Environment and Health Survey
ft3	trijodothyronine
ft4	thyroxine
HBM	humane biomonitoring
HBM-I	HBM-I waarde van de Duitse Biomonitoringscommissie
HPLC-ICP-MS	high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HR-ICP-MS	high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry
IARC	International Agency for Research on Cancer
iAs	anorganisch arseen
IQR	interquartile range (interkwartiel range)
LLR	lowest limit of reporting
LNE	Leefmilieu, Natuur en Energie
LOAEL	lowest observed adverse effect level
LOD	limit of detection (detectie limiet of aantoonbaarheidsgrens)
LOQ	limit of quantification (kwantificatie limiet)
M&G	Milieu en Gezondheid
MMA	mono methyl arsenaat
Mn	mangaan
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NOAEL	no observed adverse effect level
P10	10 <sup>e</sup> percentiel
P25	25 <sup>e</sup> percentiel
P50	50 <sup>e</sup> percentiel, mediaan
P75	75 <sup>e</sup> percentiel
P90	90 <sup>e</sup> percentiel
SCA	structurele chromosomale aberraties
SCE	sister chromatide exchange
SD	standaard deviatie

SGA	small for gestational age
TI	thallium
TRA	toxisch relevant arseen
TSH	thyroid stimulerend hormoon
VC	variatie coëfficiënt
VUB	Vrije Universiteit Brussel
WHO	World Health Organisation



## HOOFDSTUK 1. INLEIDING

---

Het Steunpunt Milieu en Gezondheid (Steunpunt M&G) meet in opdracht van de Vlaamse overheid de aanwezigheid en de gezondheidseffecten van milieuvervuilende stoffen in het lichaam van de mens via humane biomonitoring (HBM). Sinds 2002 werden verschillende meetcampagnes uitgevoerd, zowel in algemeen Vlaanderen (referentiebiomonitoring) als in specifieke aandachtsgebieden ('hot spots'). De opeenvolgende campagnes liepen van 2002-2006 (1<sup>e</sup> Steunpunt M&G), 2007-2011 (2<sup>e</sup> Steunpunt M&G) en 2012-2015 (3<sup>e</sup> Steunpunt M&G). Na de campagnes van het 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> Steunpunt werd telkens een Faseplan uitgevoerd om de beleidsrelevante interpretatie te doen en beleidsmaatregelen voor te stellen.

De HBM studies in de aandachtsgebieden Genk-Zuid en Menen (uitgevoerd in 2010-2011) detecteerden lokale knelpunten in milieublootstelling. Naast andere conclusies, werd in beide gebieden bij jongeren van 14-15 jaar oud een hogere blootstelling aan thallium gerapporteerd in vergelijking met een representatieve groep jongeren uit algemeen Vlaanderen; in Genk-Zuid werd eveneens een hogere blootstelling aan toxisch relevant arseen geobserveerd. In beide gebieden werd een Faseplan opgestart in opdracht van de Vlaamse overheid. Hier gebeurde de beleidsrelevante interpretatie van de resultaten in samenwerking met experts van het Steunpunt, externe academische experts, lokale en bovenlokale beleidsmedewerkers, klankbordgroepen en lokale stakeholders. Als aandachtspunten werden o.m. het brononderzoek naar thallium en arseen, en de gezondheidskundige relevantie van de verhogingen van thallium en arseen gedefinieerd.

Binnen het 3<sup>e</sup> Steunpunt M&G dat momenteel loopt, werd de Gentse kanaalzone gedefinieerd als aandachtsgebied. In dit gebied is ook aandacht voor zware metalen, o.m. voor thallium en arseen.

Binnen ieder Steunpunt M&G wordt bij iedere HBM-campagne een biobank van stalen aangelegd. Zowel reststalen als extra genomen stalen worden bewaard in de best mogelijke condities en onder permanente kwaliteitscontrole. Er wordt een gebruiksvriendelijk en efficiënt register aangemaakt dat toelaat om individuele stalen en groepen van stalen in de biobank te identificeren en op te zoeken. De biobank zorgt voor een historisch archief van stalen en laat de onderzoekers toe om nieuwe metingen uit te voeren op stalen uit het verleden, of om controlemetingen uit te voeren die bijkomend nodig zijn om oude of nieuwe resultaten op basis van nieuwe kennis beter te interpreteren.

Het doel van dit project is om gebruik te maken van de biobankstalen van het 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G om op die manier de beleidsvragen rond thallium en arseen die gesteld worden in het kader van het Faseplan van Genk-Zuid en Menen te helpen beantwoorden.

De doelstellingen van het huidige project zijn:

- bepaling van thallium in reststalen van volbloed van jongeren van de HBM campagnes van het 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G;
- speciatie van arseen in reststalen van urine van jongeren uit de HBM campagnes van het 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G;
- een inschatting van de beleidskundige ernst van thallium en toxisch relevant arseen op basis van de uitgevoerde metingen en van eerdere metingen van het Steunpunt.
- een advies over verder opvolging van thallium en toxisch relevant arseen in het leefmilieu en/of de mens, en een mogelijk plan van aanpak hiervoor.



---

## HOOFDSTUK 2. KWALITEITSCONTROLES OP DE METINGEN

---

Indien we een meetmethode uit het verleden willen toepassen op biobankstalen met de bedoeling om tijdstrends op te volgen en metingen onderling te vergelijken zodat een risico-analyse mogelijk is, is het essentieel dat de technische variatie op de meting zo klein mogelijk is en dat de metingen uit het verleden zeer goed vergelijkbaar zijn met de nieuwe metingen. Enkel op die manier is het mogelijk om tijdstrends op te volgen.

Daarom wordt in het huidige project gestart met kwaliteitscontroles op de metingen.

### 2.1. METHODE

#### 2.1.1. SELECTIE VAN DE CONTROLESTALEN VOOR BLOED THALLIUM

##### → Meetstrategie

Eén van de taken in dit project is het meten van thallium in biobankstalen van het eerste Steunpunt, en deze waarden te vergelijken met de resultaten van het tweede Steunpunt (Vlaanderen, Genk-Zuid, Menen). De metingen worden bij voorkeur uitgevoerd door het laboratorium dat de metingen in het 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G uitvoerden, nl. de afdeling 'Analytische en Milieuchemie' van de VUB. De huidige meetmethode dient eerst gevalideerd te worden. Daarom worden twee testen uitgevoerd:

- 1) vergelijking van 'oude' en 'nieuwe' metingen;
- 2) vergelijking van metingen van het laboratorium VUB met metingen van een onafhankelijk laboratorium.

Om beide validaties uit te voeren, worden stalen van het tweede Steunpunt hermeten door VUB en/of AML.

Bij de jongeren van de Vlaamse referentiepopulatie is er nog reststaal van volbloed in de biobank. In de hot spots Genk-Zuid en Menen was een deel van het volbloed nodig voor de geplande analyses en uit de rest werden de rode bloedcellen geëxtraheerd voor de meting van chroom in rode bloedcellen. Er is dus geen reststaal van volbloed in de biobank.

Aangezien er 2 ml volbloed nodig is om de metingen van thallium uit te voeren, en aangezien er maximaal 2 ml reststaal van volbloed aanwezig is, kunnen er binnen het huidige geen gekoppelde metingen door VUB en AML op stalen van deelnemers uit het tweede Steunpunt.

In de volwassenen populatie van het tweede Steunpunt werd voor iedere deelnemer een volledige tube volbloed (6 ml) extra genomen voor bewaring in de biobank. Hier is dus wel een gekoppelde meting van thallium mogelijk door VUB en AML. Van deze deelnemers werd in het verleden echter nog nooit thallium in bloed gemeten, dus hier is geen vergelijking met het verleden mogelijk.

Voor het vergelijken van de metingen onderling (oud vs. nieuw) en de laboratoria onderling (VUB vs. AML) wordt daarom volgende strategie gehanteerd:

- 1) 15 stalen van de jongeren van het tweede Steunpunt (met gekende waarde voor bloed thallium uit 2008) werden hermeten door VUB;
- 2) 5 stalen van de jongeren van het tweede Steunpunt (met gekende waarde voor bloed thallium uit 2008) werden hermeten door AML;

- 3) 5 stalen van de volwassenen van het tweede Steunpunt (nog niet eerder gemeten) werden gemeten door VUB en AML

→ **Selectie van de stalen**

Voor de selectie van de stalen van de jongeren werden volgende stappen gevolgd:

- 1) koppeling van resultaten thallium aan databank met volumes van reststalen;
- 2) selectie van deelnemers met thallium resultaat EN minimum 2 ml reststaal (volbloed) → 106 jongeren;
- 3) sorteren van stalen op basis van thallium resultaat;
- 4) selectie van stalen op basis van resultaat:
  - a. 15 stalen voor VUB: modus = 0,025 µg/l (= waarde die meest voorkomt): hiervan worden 5 stalen geselecteerd; daarnaast worden 5 stalen met waarde < 0,025 µg/l over meetrange van minimum tot 0,025 geselecteerd; daarnaast worden 5 stalen met waarde > 0,025 µg/l over meetrange van 0,025 tot maximum geselecteerd.
  - b. 5 stalen voor AML: 5 stalen over hele meetrange.

Voor de selectie van de volwassenen zijn er geen thallium-waarden uit het verleden beschikbaar. Daarom wordt een random selectie gedaan van 5 deelnemers. Na de selectie wordt nagekeken of er voldoende variatie is in de onderzoeksdag (niet allen in dezelfde periode onderzocht), en in onderzoeksgebied (niet allen uit dezelfde provincie afkomstig). Aangezien dit niet het geval is, wordt de random selectie behouden.

### 2.1.2. SELECTIE VAN DE CONTROLESTALEN VOOR TOXISCHE RELEVANT ARSEEN IN URINE

Het voornaamste doel van de controlemetingen voor toxisch relevant arseen (TRA) is na te gaan of de resultaten van 2008 nog reproduceerbaar zijn, en bijgevolg toelaten om een nieuwe meting van arseen (aparte metabolieten) uit te voeren, en te vergelijken de vroegere resultaten. De controlemetingen worden uitgevoerd door AML, het laboratorium dat de metingen van TRA uitvoerde in 2008 en de meting in routine uitvoert.

In het tweede Steunpunt werden significante verschillen in TRA geobserveerd tussen de hot spot Genk-Zuid en de Vlaamse referentiepopulatie. Daarom worden voor de huidige controlemetingen biobankstalen van beide campagnes geselecteerd. Er wordt gestart van de reststalen urine die bewaard zijn bij -20°C in een polyethyleen tube.

Voor de selectie van de stalen van de jongeren werden volgende stappen gevolgd:

- 1) koppeling van resultaten TRA aan databank met volumes van reststalen;
- 2) selectie van deelnemers met TRA resultaat EN minimum 10 ml reststaal (urine) → 142 jongeren uit Vlaamse referentiepopulatie en 152 jongeren uit Genk-Zuid;
- 3) binnen Vlaamse referentiepopulatie en binnen Genk-Zuid: sorteren van stalen op basis van TRA resultaat;
- 4) selectie van stalen op basis van resultaat:
  - a. referentiepopulatie: 5 stalen over hele meetrange;
  - b. Genk-Zuid: 5 stalen over hele meetrange.



## 2.2. RESULTATEN

### 2.2.1. CONTROLEMETINGEN VAN THALLIUM IN BLOED

#### → Hermeting van 15 stalen van jongeren van het 2<sup>e</sup> Steunpunt door VUB

Vijftien stalen van jongeren (Vlaamse referentie) van het tweede Steunpunt werden hermeten door VUB. De resultaten worden weergegeven in Tabel 1. De resultaten worden voorgesteld volgens oplopende waarde van het tweede Steunpunt. Oorspronkelijk was de bedoeling in de '<0,025'; '=0,025'; '>0,025' telkens 5 stalen te selecteren. Om de verdeling van de waarden in de onderzoeksgroep beter te weerspiegelen (meer uitschieters in de hoge range), werd bij de selectie beslist om toch meer aandacht te geven aan de hogere waarden, en werden er 4 stalen met een waarde onder de 0,025 µg/l, 5 stalen met een waarde van 0,025 µg/l en 6 stalen met een waarde boven de 0,025 µg/l geselecteerd (zie blauw gemarkeerd in tabel).

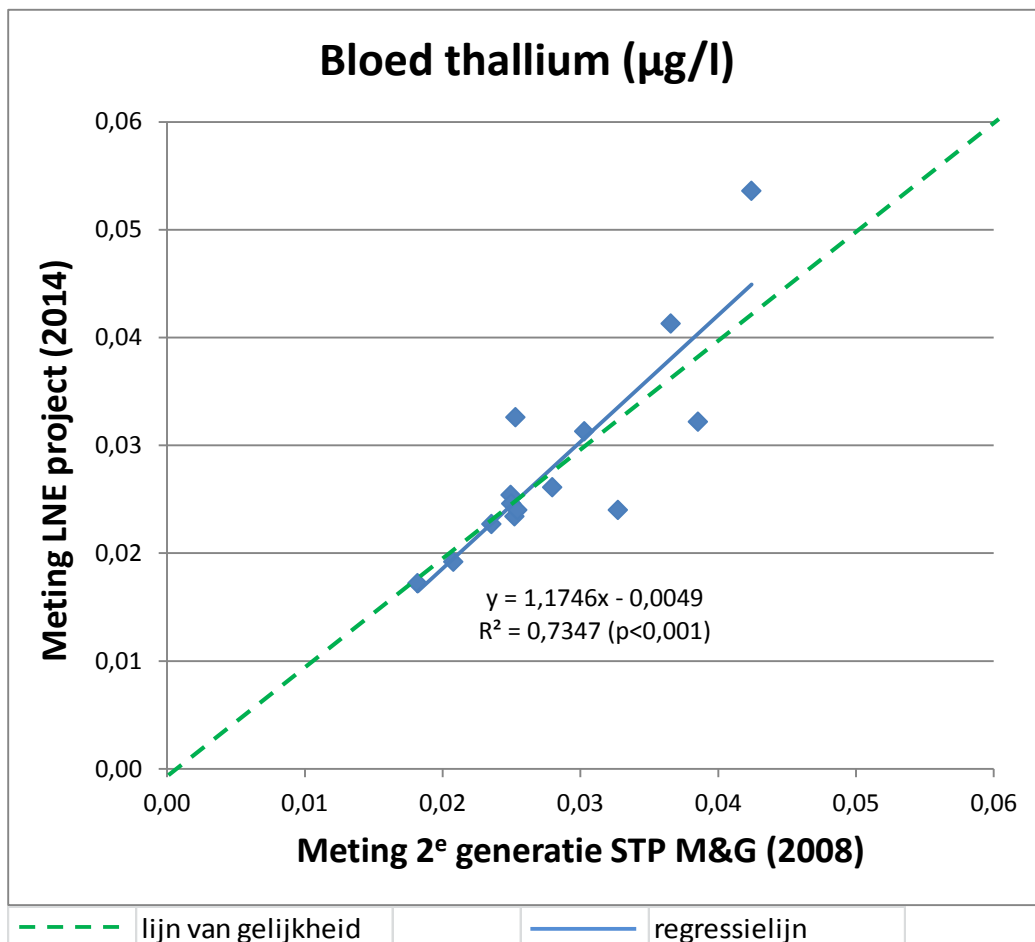
Er was 1 staal met een zeer grote afwijking tussen de 2 metingen, nl. voor staal LNETL\_212 gaf de hermeting een waarde die dubbel zo hoog lag als de eerste meting (+104%). In het kader van de controlemetingen die werden ingevoerd binnen het derde Steunpunt, werden in dit staal ook controlemetingen uitgevoerd voor cadmium, lood, arseen, koper en mangaan. Meerdere metalen toonden sterke afwijkingen voor dit staal, nl. As: +333%; Mn: +137% en Cd: +51%. Deze resultaten suggereren dat er een algemeen probleem is met dit staal of één van de metingen. In eerste instantie werd nagekeken of de selectie van het staal correct gebeurd was: op basis van de registratie van het etiket kon worden uitgesloten dat er bij het uitsorteren van de blinde stalen een verwisseling van nummer gebeurd is. Een mogelijke omwisseling van stalen tijdens het initiële veldwerk is niet meer te controleren, en kan bijgevolg niet worden uitgesloten. Verder zou het ook kunnen dat er tijdens het veldwerk, tijdens de stockage, bij het transport of bij de huidige meting een externe contaminatie is opgetreden bij het tweede staal. We besluiten dus dat er voor dit staal hoogstwaarschijnlijk een artefact is opgetreden, en daarom worden de resultaten van dit staal niet meegenomen in de verdere analyse.

Tabel 1: Bloed thallium: meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G vs. nieuwe meting door VUB

Code	Bloed TI (µg/l) 2 <sup>e</sup> STP M&G	Bloed TI (µg/l) hermeting VUB	%verschil (2e STP als referentie)
LNETL_212	0,0130	0,0265	103,8
LNETL_208	0,0182	0,0172	-5,4
LNETL_210	0,0208	0,0192	-7,6
LNETL_211	0,0235	0,0227	-3,5
LNETL_213	0,0249	0,0254	1,9
LNETL_214	0,0250	0,0246	-1,5
LNETL_204	0,0252	0,0234	-7,2
LNETL_201	0,0253	0,0326	28,9
LNETL_205	0,0254	0,0240	-5,6
LNETL_209	0,0280	0,0261	-6,6
LNETL_215	0,0303	0,0313	3,3
LNETL_206	0,0327	0,0240	-26,6
LNETL_202	0,0365	0,0413	13,0
LNETL_207	0,0385	0,0322	-16,4
LNETL_203	0,0424	0,0536	26,4

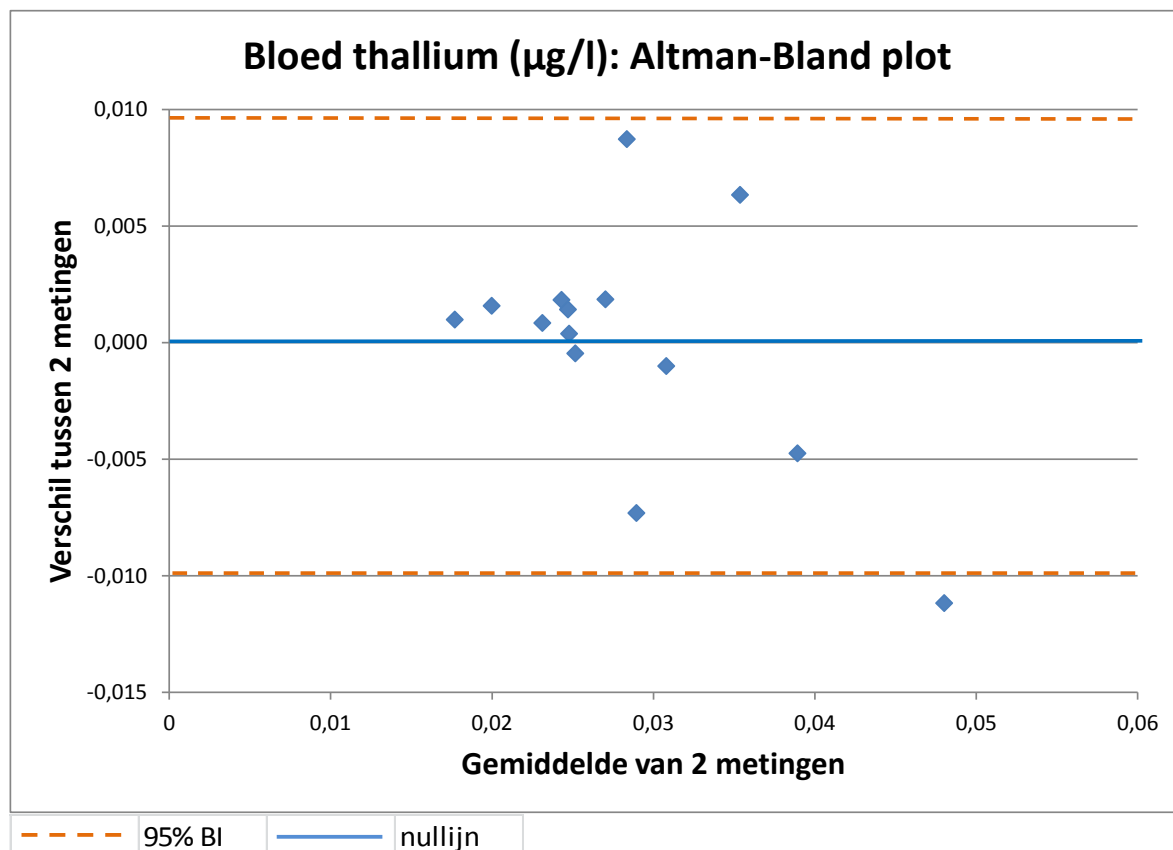
De gemiddelde waarde van de 14 stalen bedroeg 0,0283 (SD: 0,0069) µg/l in 2008 (2<sup>e</sup> Steunpunt M&G) en 0,0284 (SD: 0,0095) µg/l (gepaarde t-test: p=0,97). Het gemiddelde verschil tussen de twee metingen bedroeg 0,50% (SD: 15,0%). Op groepsniveau waren de resultaten dus zeer goed vergelijkbaar.

De visuele voorstelling van de vergelijking van de 2 metingen (voor de 14 controlestalen) wordt gegeven in Figuur 1. De correlatie-coëfficiënt tussen beide metingen bedroeg 0,73, wat duidt op vrij goede overeenkomst. De regressielijn (zie volle blauwe lijn in figuur) ligt zeer dicht bij de lijn van gelijkheid (zie groene stippellijn in figuur), wat ook weer aangeeft dat de groepsresultaten zeer goede overeenstemming vertonen. De afwijking tussen de twee metingen is groter bij hogere waarden.



Figuur 1: Thallium in bloed: nieuwe meting door VUB vs. meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G

De Altman-Bland plot wordt weergegeven in Figuur 2. Deze plot geeft het verschil tussen twee metingen vs. het gemiddelde van twee metingen. Het gemiddelde verschil tussen de twee metingen bedroeg -0,0001 (SD: 0,0050) µg/l. Voor de meerderheid van de punten lag het verschil dicht bij nul. Het 95% betrouwbaarheidsinterval op het verschil bedroeg -0,0100 tot 0,0099 µg/l (zie oranje stippellijn in figuur) en slechts 1 punt viel buiten dit interval. Verschillen tussen beide metingen waren zowel positief (eerste meting > tweede meting) als negatief (eerste meting < tweede meting). Het verschil tussen de twee metingen toonde geen duidelijke relatie met het gemiddelde tussen de twee metingen (bijv. een systematische daling van het verschil bij hogere waarden).



Figuur 2: Bloed thallium: vergelijking nieuwe meting door VUB vs. meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G: Altman-Bland plot

→ **Hermeting van 5 stalen van jongeren van het 2<sup>e</sup> Steunpunt door AML**

Vijf stalen van jongeren uit de Vlaamse referentiecampaagne van het tweede Steunpunt (oorspronkelijk meting in 2008 door VUB) werden in 2013 hermeten door AML. De resultaten worden weergegeven in Tabel 2. De resultaten worden voorgesteld volgens oplopende waarde van het tweede Steunpunt.

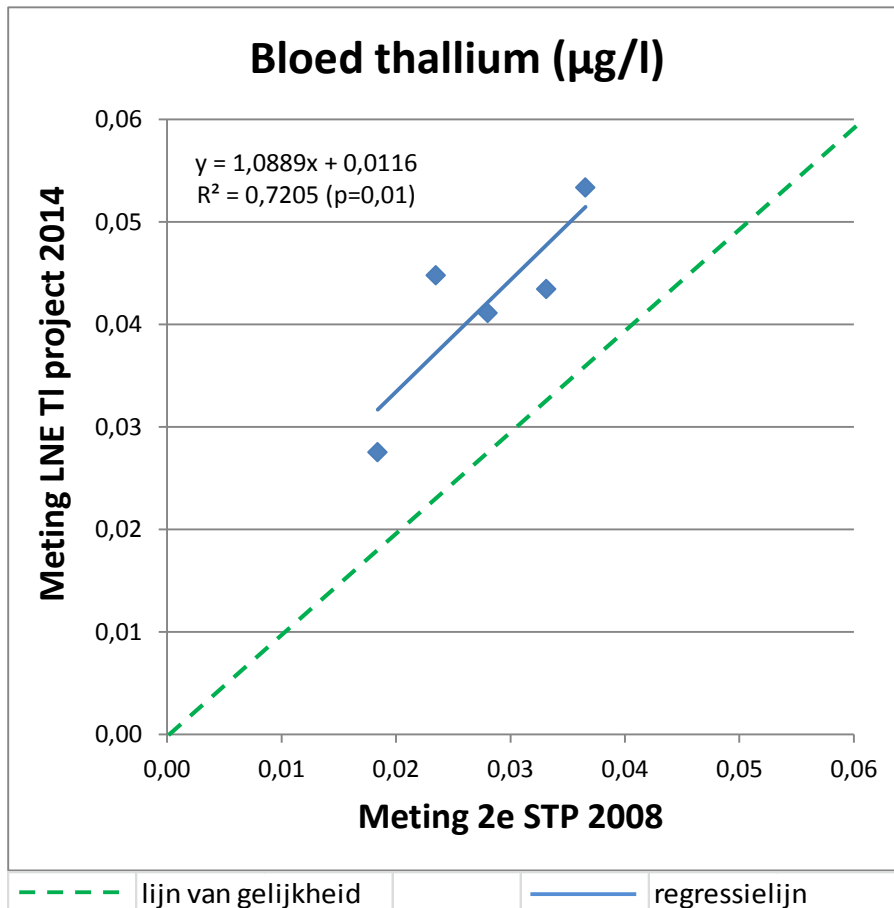
Tabel 2: Thallium in bloed: meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G vs. nieuwe meting door AML

Code	Bloed Tl ( $\mu\text{g/l}$ ) 2 <sup>e</sup> STP M&G	Bloed Tl ( $\mu\text{g/l}$ ) hermeting AML	%verschil (2e STP als referentie)
LNETL_101	0,0184	0,0275	49,6
LNETL_104	0,0235	0,0448	90,7
LNETL_105	0,0280	0,0411	46,8
LNETL_102	0,0331	0,0434	31,1
LNETL_103	0,0366	0,0533	45,9

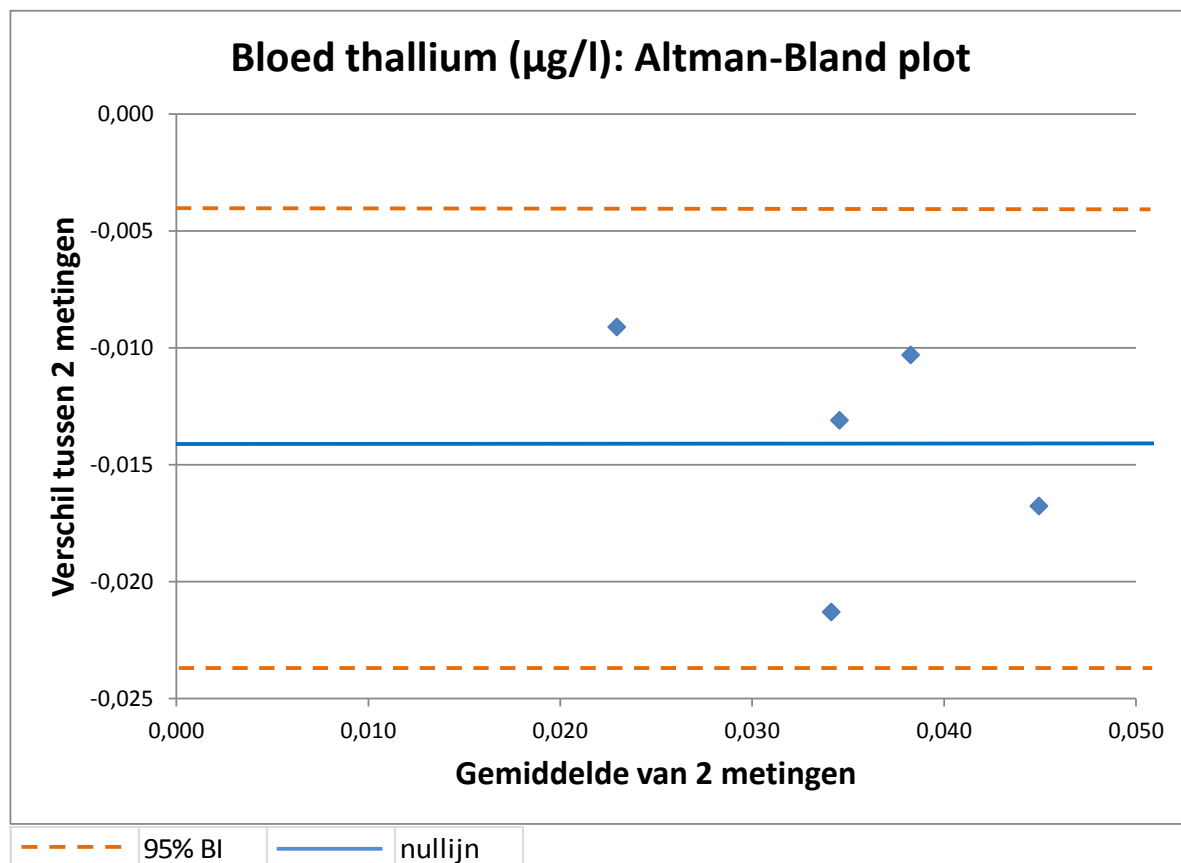
De volgorde van de metingen wordt vrij goed gerespecteerd. Dit is visueel duidelijk in Figuur 3: de punten liggen vrij goed op 1 lijn; de correlatie-coëfficiënt tussen de twee metingen bedraagt 0,73. Er wordt echter wel een systematisch hogere waarde gemeten door AML in vergelijking met de meting van het tweede Steunpunt. De gemiddelde (SD) thalliumwaarde bedroeg 0,0279 (0,0073)  $\mu\text{g/l}$  in 2008 en bedraagt nu bij de hermeting 0,0420 (0,0093)  $\mu\text{g/l}$  (gepaarde t-test:  $p=0,003$ ). Gemiddeld ligt de huidige waarde 53% hoger dan de vorige waarde. De reden voor deze afwijking kon niet worden achterhaald. Wel is duidelijk te zien in Figuur 3 dat de waarden systematisch

boven de lijn van gelijkheid liggen, en dus parallel met deze lijn. Er is dus een systematische afwijking. We dienen wel op te merken dat de gemeten niveaus zeer laag liggen.

De Altman-Bland plot dient voorzichtig geïnterpreteerd te worden aangezien het slechts om 5 meetpunten gaat (zie Figuur 4). Toch is het nuttig om trends waar te nemen. Het gemiddelde verschil tussen de metingen bedroeg  $-0,0141$  (95%BI:  $-0,0043$  tot  $-0,0239$ )  $\mu\text{g/l}$ . Alle verschillen lagen binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval. Er was geen relatie tussen de grootte van de verschillen en de gemiddelde waarde.



Figuur 3: Thallium in bloed: nieuwe meting door AML vs. meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G



Figuur 4: Bloed thallium: vergelijking nieuwe meting door AML vs. meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G: Altman-Bland plot

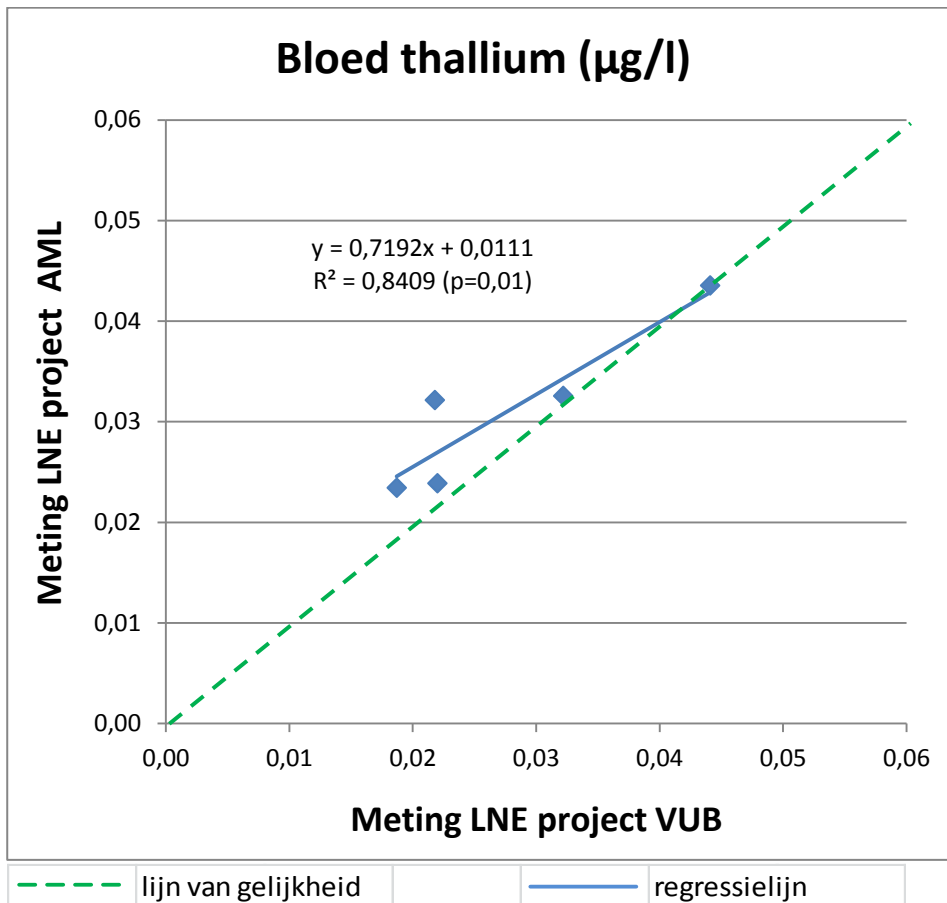
→ **Meting van 5 identieke stalen door VUB en AML**

Vijf stalen van volwassenen uit de Vlaamse referentiecampaagne van het tweede Steunpunt waarvan de waarde nog niet gekend is, maar waarvan een voldoende groot volume bloed beschikbaar was om een dubbele meting toe te laten, werden binnen het huidige project zowel gemeten door VUB als door AML. De resultaten worden weergegeven in Tabel 3. De resultaten worden voorgesteld volgens oplopende waarde van VUB (waarde was vooraf niet gekend, dus stalen zijn niet gekozen op basis van spreiding van de data).

Tabel 3: Thallium in bloed: nieuwe meting door VUB vs. nieuwe meting door AML

Code	Bloed TI ( $\mu\text{g/l}$ ) 'nieuwe' meting VUB	Bloed TI ( $\mu\text{g/l}$ ) 'nieuwe' meting AML	%verschil (VUB als referentie)
1	0,0187	0,0234	25,3
2	0,0218	0,0321	47,5
3	0,0220	0,0239	8,5
4	0,0322	0,0326	1,1
5	0,0441	0,0435	-1,3

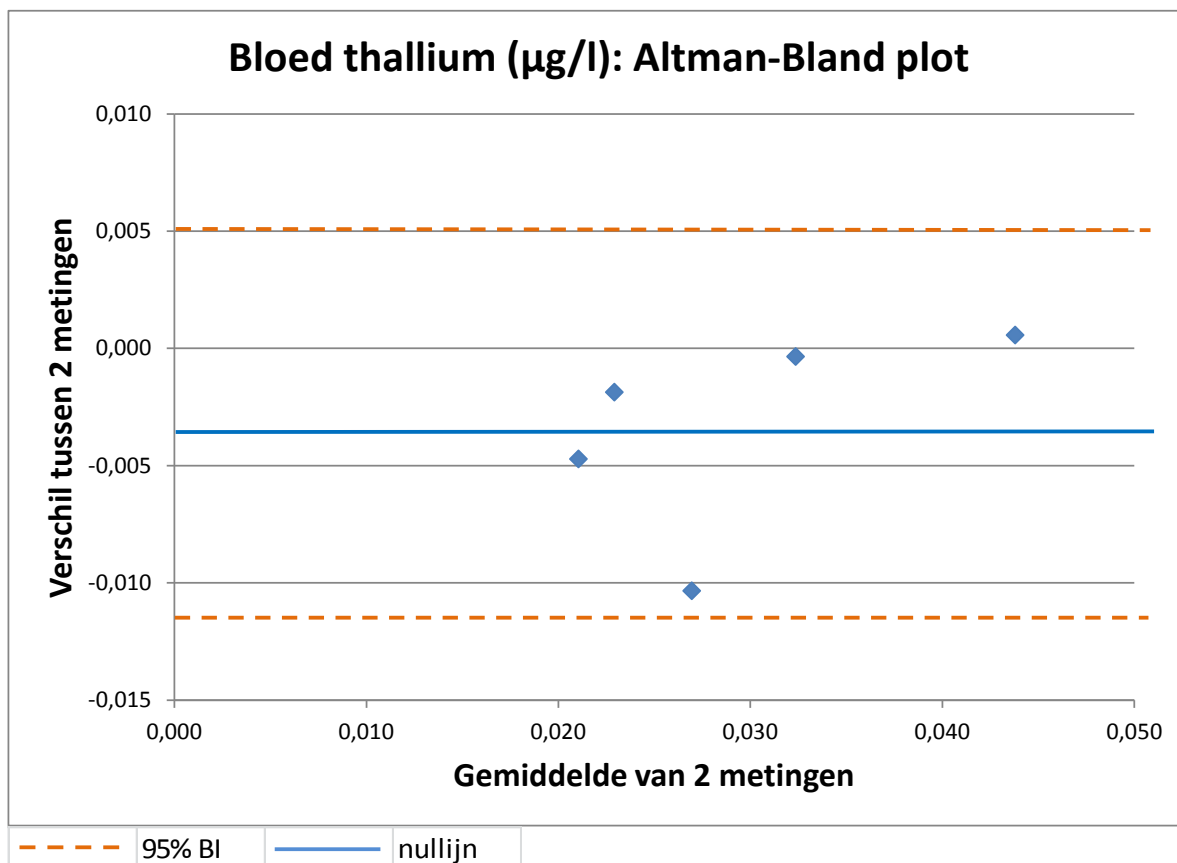
Voor 1 staal wordt er een verschil van 50% vastgesteld, en dit staal verstoort ook de volgorde tussen de twee metingen. De overige stalen vertonen een zeer goede gelijkheid. De correlatiecoëfficiënt tussen beide metingen bedraagt 0,84 en de regressielijn licht zeer dicht in de buurt van de lijn van gelijkheid (zie Figuur 5).



Figuur 5: Thallium in bloed: nieuwe meting door AML vs. nieuwe meting door VUB

De gemiddelde (SD) thalliumwaarde van de vijf stalen bedraagt 0,0278 (0,0105) µg/l bij de metingen van VUB en 0,311 (0,0082) µg/l (gepaarde t-test:  $p=0,16$ ). Gemiddeld liggen de waarden bij AML 16% hoger dan bij VUB, wat aanvaardbaar is voor een chemische meting.

De Altman-Bland plot dient voorzichtig geïnterpreteerd te worden aangezien het slechts om 5 meetpunten gaat (zie Figuur 6). Toch is het nuttig om trends waar te nemen. Het gemiddelde verschil tussen de metingen bedroeg -0,0033 (95%BI: -0,0012 tot 0,0053) µg/l. Alle verschillen lagen binnen het 95% betrouwbaarheidsinterval. Er was geen relatie tussen de grootte van de verschillen en de gemiddelde waarde.



Figuur 6: Bloed thallium: vergelijking nieuwe meting door AML vs. nieuwe meting door VUB: Altman-Bland plot

#### → Besluit metingen thallium in bloed

In deze controletesten werden 14 stalen uit het tweede Steunpunt hermeten door het laboratorium dat in 2008 ook de metingen uitvoerde, nl. door VUB. De vergelijkbaarheid tussen beide metingen was zeer goed: de gemiddelde waarde van de 14 stalen bleef onveranderd; het gemiddeld verschil tussen de gepaarde metingen bedroeg 0,50%; de correlatie was goed en de regressielijn lag zeer kort bij de lijn van gelijkheid; de Altman-Bland plot toonde geen systematische afwijkingen.

In een tweede en derde reeks controles werden de vroegere metingen van VUB en de huidige metingen van VUB ook herhaald door een tweede, onafhankelijk laboratorium, nl. AML. De resultaten toonden een redelijke overeenkomst. De metingen van de 'nieuwe' stalen vertoonde goede overeenkomst, voor de metingen van de oude stalen was er een systematische hogere waarde bij AML. De reden voor de afwijking is niet duidelijk. Gezien de lage concentratierange waarin wordt gewerkt zijn de resultaten aanvaardbaar.

Besluit: het laboratorium van VUB heeft aangetoond dat de vergelijkbaarheid met de methode van 2008 en de vergelijkbaarheid met een ander lab goed is. Er wordt voorgesteld om de metingen van thallium in bloed op de 80 stalen uit het eerste Steunpunt uit te voeren door VUB.

**2.2.2. CONTROLEMETINGEN VAN TOXISCH RELEVANT ARSEEN IN URINE**

Voor de controlemetingen van toxisch relevant arseen (TRA) werden 10 stalen van jongeren van het tweede Steunpunt geselecteerd, nl. 5 stalen van de referentiepopulatie en 5 stalen van de hot spot Genk-Zuid. Zowel de metingen in het 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G als de huidige controlemetingen werden uitgevoerd door AML. Er werd twee maal dezelfde methode gebruikt. Aangezien het niet de bedoeling is om bijkomende metingen van totaal TRA uit te voeren, maar wel om een nieuwe biomarker voor TRA te ontwikkelen, was het niet nuttig om de metingen van totaal TRA ook te laten controleren door een tweede onafhankelijk laboratorium. Het doel van de huidige controlemetingen is om de kwaliteit van de bewaarde stalen te beoordelen, en de herhaalbaarheid van de meting van AML over de tijd te bevestigen.

De resultaten van de 10 TRA resultaten worden weergegeven in Tabel 1. De resultaten worden voorgesteld volgens oplopende waarde van het tweede Steunpunt.

Er was 1 staal met een zeer grote afwijking tussen de 2 metingen, nl. voor staal BLIND02, met de laagste waarde (0,15 µg/l) gaf de hermeting een waarde van 3,38 µg/L. Omwille van de extreem hoge afwijking is een artefact (verwisseling van staal of van nummer, externe contaminatie) niet uit te sluiten. Daarom worden de resultaten van dit staal niet meegenomen in de verdere analyse.

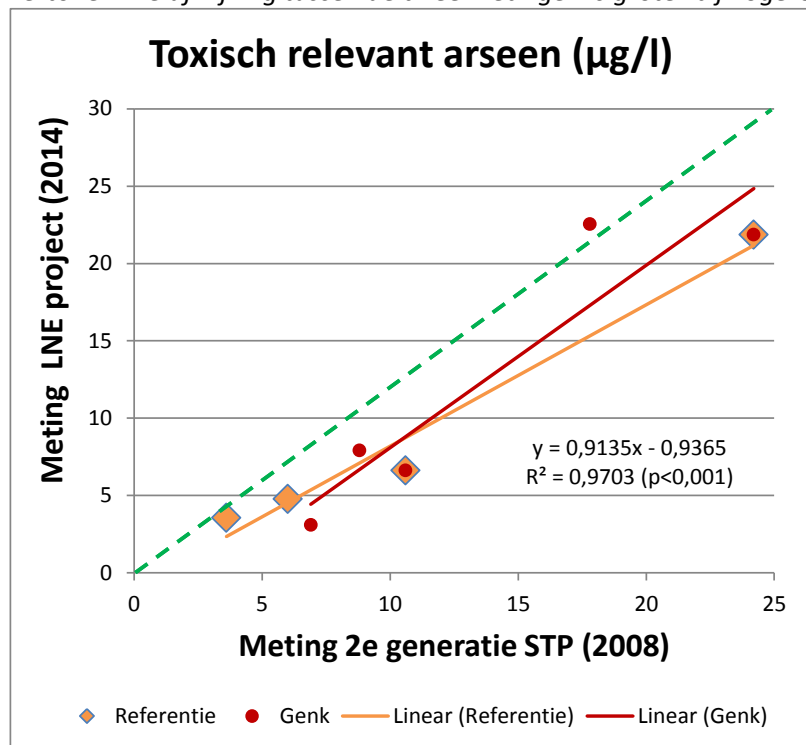
Tabel 4: Toxisch relevant arseen: meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G vs. nieuwe meting door AML

Code	Groep	TRA in urine (µg/l) 2 <sup>e</sup> STP M&G	TRA in urine (µg/l) hermeting AML	%verschil (2e STP als referentie)
BLIND02	REF	0,15	3,38	2155,7
BLIND10	GENK	2,6	3,65	40,5
BLIND05	REF	3,6	3,55	-1,4
BLIND06	GENK	5,7	4,80	-15,8
BLIND04	REF	6,0	4,78	-20,4
BLIND08	GENK	6,9	3,10	-55,0
BLIND07	GENK	8,8	7,91	-10,2
BLIND01	REF	10,6	6,62	-37,6
BLIND09	GENK	17,8	22,55	26,7
BLIND03	REF	24,2	21,87	-9,6

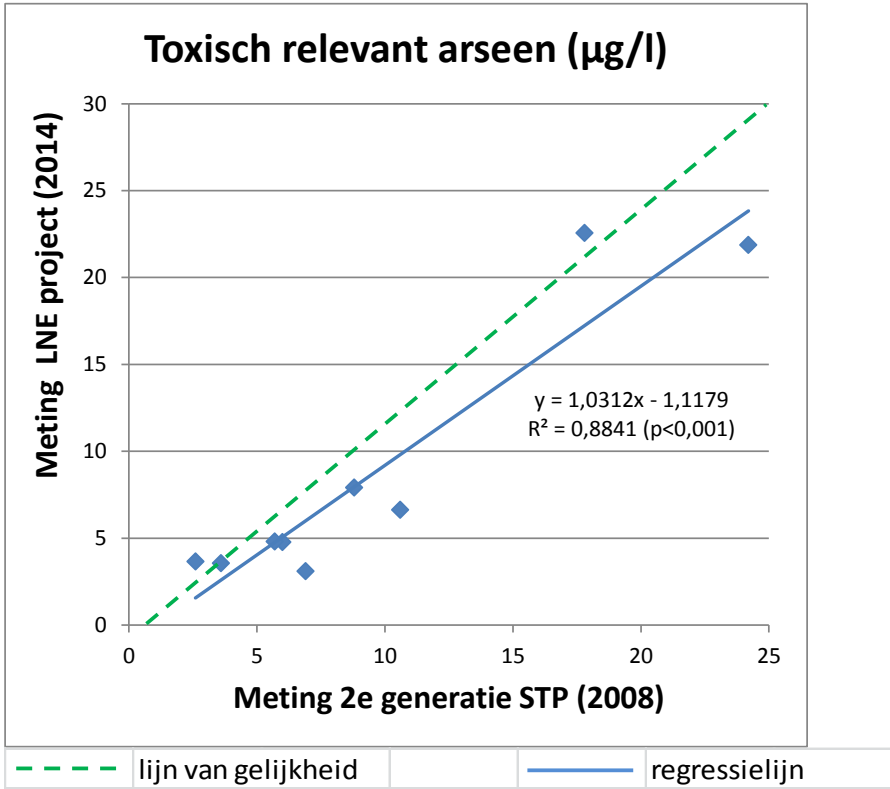
De gemiddelde waarde van de 9 stalen bedroeg 9,58 (SD: 7,09) µg/l in 2008 (2<sup>e</sup> Steunpunt M&G) en 8,76 (SD: 7,78) µg/l (gepaarde t-test: p=0,38). Het gemiddelde verschil tussen de twee metingen bedroeg 9% (SD: 29%). Op groepsniveau waren de resultaten dus vrij goed vergelijkbaar.



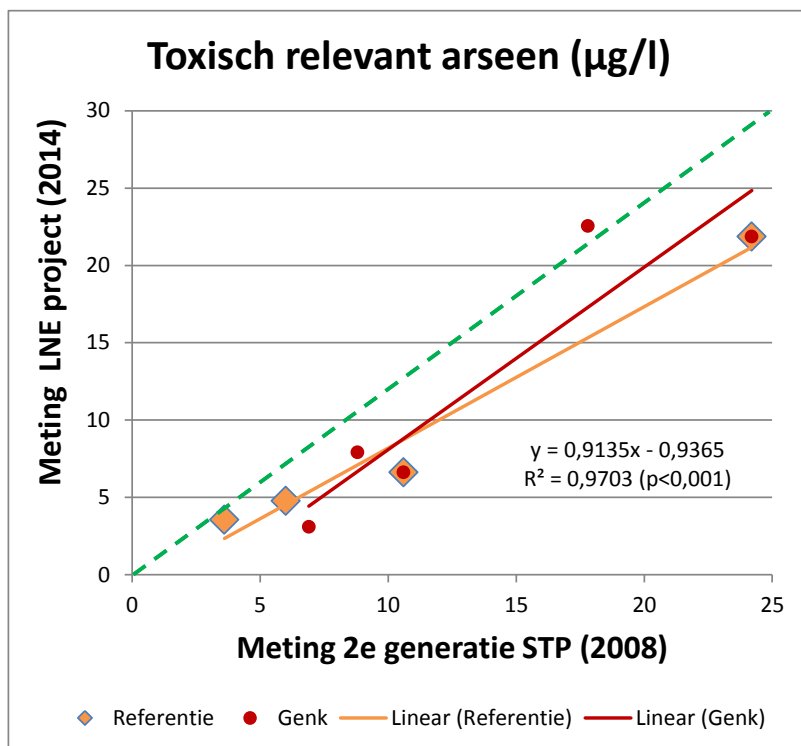
De visuele voostelling van de vergelijking van de 2 metingen (voor de 9 controlestalen) wordt gegeven in Figuur 7. De correlatie-coëfficiënt tussen beide metingen bedroeg 0,88, wat duidt op vrij goede overeenkomst. De regressielijn (zie volle blauwe lijn in figuur) ligt dicht bij de lijn van gelijkheid (zie groene stippellijn in figuur), wat ook weer aangeeft dat de groepsresultaten goede overeenstemming vertonen. De afwijking tussen de twee metingen is groter bij hogere waarden. In



Figuur 8 wordt de regressielijn apart gegeven voor de referentiepopulatie (4 metingen) en Genk-Zuid (5 metingen). Alhoewel het aantal punten beperkt is, is een trend toch duidelijk te observeren omdat de meetrange voor beide lijnen groot is. De regressielijnen liggen zeer dicht bij elkaar, en ook goed parallel met de lijn van gelijkheid. Ze liggen beide onder de lijn van gelijkheid, want aangeeft dat de hermeting systematisch lager ligt. Mogelijk is er verlies van de metabolieten tijdens de bewaring.

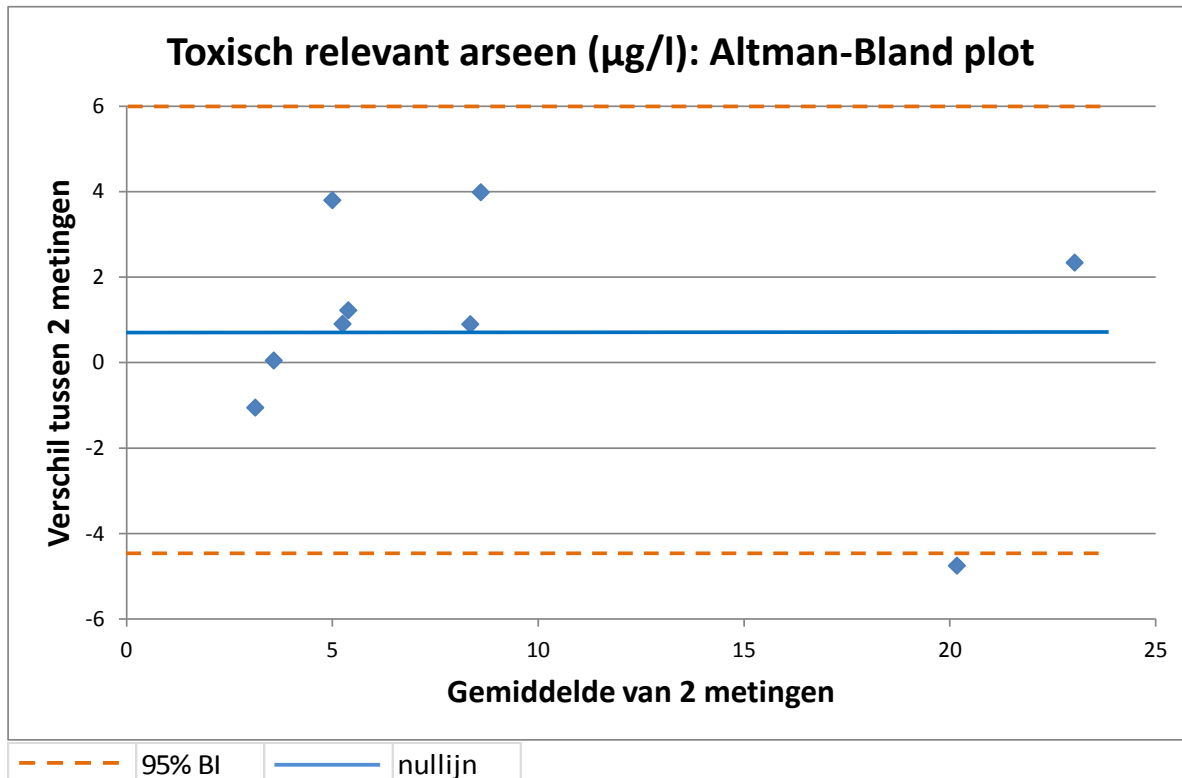


Figuur 7: Toxisch relevant arseen in urine: nieuwe meting door AML vs. meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G



*Figuur 8: Toxisch relevant arseen in urine: nieuwe meting door AML vs. meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G – resultaten voor referentie (n=4) en Genk-Zuid (n=5) apart. De regressievergelijking werd berekend op alle punten samen.*

De Altman-Bland plot voor toxisch relevant arseen wordt weergegeven in Figuur 9. Deze plot geeft het verschil tussen twee metingen vs. het gemiddelde van twee metingen. Het gemiddelde verschil tussen de twee metingen bedroeg 0,82 (SD: 2,66) µg/l. Voor de meerderheid van de punten lag het verschil dicht bij nul. Het 95% betrouwbaarheidsinterval op het verschil bedroeg -4,4 tot 6,0 µg/l (zie oranje stippellijn in figuur) en slechts 1 punt viel buiten dit interval. Verschillen tussen beide metingen waren zowel positief (eerste meting > tweede meting) als negatief (eerste meting < tweede meting). Het verschil tussen de twee metingen toonde geen duidelijke relatie met het gemiddelde tussen de twee metingen (bijv. een systematische daling van het verschil bij hogere waarden).



Figuur 9: Toxisch relevant arseen: vergelijking nieuwe meting door AML vs. meting 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G: Altman-Bland plot

→ **Besluit metingen toxisch relevant arseen**

In deze controletest werden 10 stalen uit het tweede Steunpunt hermeten door het laboratorium dat in 2008 ook de metingen uitvoerde, nl. door AML. Er was 1 meting die een zeer sterke afwijking vertoonde (+2000%). We veronderstellen dat dit is toe te schrijven aan een artefact, en laten deze meting buiten beschouwing in de vergelijking. De vergelijkbaarheid tussen beide metingen was goed: de gemiddelde waarde van de 9 stalen bedroeg 9,58 (SD: 7,09) µg/l in 2008 (2<sup>e</sup> Steunpunt M&G) en 8,76 (SD: 7,78) µg/l (gepaarde t-test: p=0,38). Het gemiddelde verschil tussen de twee metingen bedroeg 9% (SD: 29%). Het is niet uit te sluiten dat er verlies van de arseenmetabolieten optreedt tijdens de bewaring (periode is 6 jaar). De correlatie tussen beide metingen was goed en de regressielijn lag kort bij de lijn van gelijkheid; de Altman-Bland plot toonde geen systematische afwijkingen.

Besluit: het laboratorium van AML heeft aangetoond dat de vergelijkbaarheid met de methode van 2008 goed is.

---

## HOOFDSTUK 3. THALLIUM

---

In deze studie werden 80 stalen van jongeren van het eerste Steunpunt M&G uit de biobank geselecteerd, waarop bloed thallium werd gemeten met een methode die beschikbaar is sinds het tweede Steunpunt. Daardoor is het mogelijk om retrospectief een tijdstrend op te stellen, en een betere toxicologische interpretatie te doen van de resultaten van thallium doorheen de tijd.

In dit hoofdstuk wordt eerst achtergrondinformatie over thallium gegeven (3.1); daarna worden de meetmethode en statistische analysemethoden van de nieuwe metingen toegelicht (3.2); de resultaten van de meting worden besproken in een historisch perspectief (tijdslijn), geanalyseerd in relatie tot gezondheidseffecten en geïnterpreteerd tegenover gezondheidkundige richtlijnen. Een conclusie over de gezondheidkundige interpretatie wordt geformuleerd in hoofdstuk 5.

### 3.1. ACHTERGRONDINFORMATIE

#### 3.1.1. LITERATUURSTUDIE

Thallium (CAS: 7440-28-0) is een metaal dat van nature in zeer lage concentraties voorkomt in de aardkorst. Het wordt voornamelijk gebruikt in de productie van elektronische toestellen, HTS (high temperature super) conductoren (gebruikt in draadloze communicatie systemen), horloges en sloten. Emissie naar de omgeving gebeurt meestal als bijproduct in smeltfabrieken, steenkoolcentrales, baksteenfabrieken en cementfabrieken. Thallium kan voorkomen in pure vorm of gemengd met andere metalen in legeringen. Daarnaast wordt het ook teruggevonden in combinatie met broom, chloor, fluor of jood als zout.

**Verwachte blootstellingswegen naar de mens.** Blootstelling aan thallium gebeurt via drinkwater, voeding (voornamelijk groenten) en via de lucht. De concentraties aan Tl in lucht en water zijn echter zeer laag. De belangrijkste bron is voeding, meer bepaald thuis gekweekte groenten en fruit (enkel bij lokale vervuiling). Deze kunnen gecontamineerd worden met thallium geproduceerd door steenkoolcentrales, cementfabrieken en smeltfabrieken. Vooral kolen zouden gevoelig zijn voor thalliumcontaminatie (Sherlock and Smart, 1986).

Sigarettenrook is ook een belangrijke bron van thallium. Mensen die roken hebben twee maal hogere waarden van thallium in hun bloed.

**(Hoog) blootgestelde groepen.** Populaties met een verhoogd risico op blootstelling aan thallium zijn de mensen die wonen in de buurt van steenkoolcentrales, metaalsmelters en cementfabrieken. Deze mensen kunnen blootgesteld worden door inhalatie of ingestie van groenten en fruit gekweekt op gecontamineerde grond. Werknemers in industrieën die thallium bevattende materialen gebruiken of produceren lopen een verhoogd risico op thallium contaminatie. (ATSDR, 1992). Rokers zijn ook een doelgroep; tabak bevat 0,024 µg Tl/g tabak (EPA, 1980).

**Accumulatie.** Thallium wordt zeer snel en efficiënt geabsorbeerd door slijmvliezen, en in mindere mate door de huid, waarna het via bloedcirculatie gedistribueerd wordt over het lichaam. Het is in staat om door de bloed/hersen- en de placenta-barrière te dringen, en wordt in moedermelk

afgescheiden. De plaatsen van accumulatie in dalende concentratie zijn de nieren, botten, maag, darmen, milt, lever, spierweefsel, longen en hersenen. Excretie gebeurt voornamelijk via urine en faeces, en de halfwaardetijd in het lichaam is geschat op 10 dagen, hoewel bepaalde studies langere halfwaardetijden vonden tot 30 dagen (Peter & Viraraghavan, 2005; Cvjetko et al, 2010).

**Toxisch mechanisme.** Thallium bindt thiolgroepen op proteïnen en mitochondriale membranen, waardoor verschillende enzymen geïnhibeerd worden. Daarnaast bootst  $Tl^+$  het  $K^+$ -ion na omdat ze dezelfde lading en vergelijkbare ionische radius hebben, waardoor het interfereert met  $K^+$ -afhankelijke processen. Het is aangetoond dat thallium kalium kan vervangen in verschillende enzymen, zoals pyruvaat kinase, ATP-ase en aldehyde dehydrogenase, waardoor het de werking van deze enzymen verstoort. Door de hierboven beschreven werking kan thallium een zeer breed toxisch effect hebben op verschillende processen in verschillende weefsels (Peter & Viraraghavan, 2005).

**Acute effecten.** Acute vergiftiging met thallium heeft effect op het centraal en perifeer zenuwstelsel, de longen, het hart, de lever en de nieren. Dit kan leiden tot overgeven, haarverlies (alopecia), ontsteking van maag en darmwand, diarree en kan in extreme gevallen de dood veroorzaken (Peter & Viraraghavan, 2005).

**Chronische effecten.** Gevallen van chronische blootstelling zijn gedocumenteerd in Duitsland nabij een cementfabriek, waar blootstelling voornamelijk kwam door consumptie van zelfgekweekte groenten in thallium-gecontamineerde bodem (Brockhaus et al., 1981). Chronische blootstelling is ook bestudeerd aan de Lanmuchang kwik-thallium mijn in China (Zhang et al., 1998). Verscheidene ziektebeelden werden gelinkt aan chronische blootstelling: anorexia, hoofdpijn, neuropathie (pijn in buik, dijen, bovenarmen, soms het hele lichaam), alopecia, blindheid en de dood (Peter & Viraraghavan, 2005).

**Prenatale effecten.** Beperkte data suggereren dat bij acute blootstelling aan thallium tijdens vroege zwangerschap er een trend is voor premature geboorte en verminderd lichaamsgewicht van de baby bij geboorte. Onderzoek naar de invloed van prenatale blootstelling aan metalen op cognitieve ontwikkeling bij 4-jarigen kon geen significante correlatie tussen thallium en ontwikkeling aantonen (Cvjetko et al, 2010; Forns et al., 2014).

**Genotoxische effecten.** Er zijn nog niet veel studies over genotoxiciteit van thallium, maar er zijn aanwijzingen dat thallium genetische schade kan veroorzaken en de celdeling kan verstoren. Deze studies gebeurden bij verhoogde concentraties, voornamelijk *in vitro*, en geven dus niet aan wat effecten van langdurige, niet-occupationale blootstelling zouden kunnen zijn.

In fibroblast cellen van knaagdieren resulteerde blootstelling aan thallium in meer DNA-schade en een verhoogde celdood. In muiscellijnen werden verschillende vormen van DNA-schade vastgesteld, meer specifiek: structurele chromosomale aberraties (SCA), zuster chromatide verwisseling (SCE, *sister chromatide exchange*) en mutaties in het *hprt* gen. In Chinese hamstercellijnen veroorzaakte thallium inhibitie van DNA-synthese en blokkeerde het de celdeling door inhibitie van kinases. Ook in verschillende andere zoogdiercellijnen remde thallium de celsplitsing en blokkeerde het de celcyclus. In een menselijke cellijn (*human T-lymphoblastoid Jurkat*) veroorzaakte thallium apoptose (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2013).

Het aantal humane bevolkingsstudies is beperkt. In één studie veroorzaakte thallium een hogere frequentie van micronucleus-positieve centromeren (dit zijn afwijkingen in de celkern); maar in deze studie werden geen anderen vormen van schade aan het chromosoom vastgesteld (SCA of SCE). In een andere studie werden wel chromosomale afwijkingen gevonden, maar geen veranderde frequentie van de micronuclei. *In vivo* behandeling van patiënten met  $^{201}Tl$  gaf geen

mutageen effect, maar na drie dagen werden genetische schade en veranderingen in kinetiek van celdeling vastgesteld (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2013).

Het internationale agentschap voor onderzoek naar kanker (IARC) en het EPA (Environmental Protection Agency) hebben thallium niet aangeduid als zijnde kankerverwekkend. Op dit moment zijn studies van het genotoxisch effect van thallium in de mens zeldzaam en onvoldoende om een uitspraak te doen.

**Laagste niveau waarbij schadelijke effecten worden waargenomen.** Enkel voor blootstelling aan thallium via orale route werden LOAEL's gevonden. Deze worden in Tabel 5 weergegeven en werden onderverdeeld naar type van blootstellingsduur, gezondheidseffect en species waarop de LOAEL's werden bepaald.

Tabel 5: LOAEL's voor thallium voor blootstelling via orale route (bron: ATSDR, 1992)

Type Blootstelling	Gezondheids-effect	species	Blootstellings-duur	LOAEL (<ernstig) mg/kg/dag	LOAEL (ernstig) mg/kg/dag
acuut	dood	rat	éénmalig		39
			éénmalig		20
		varken	éénmalig		5
	systemisch	konijn(cardio)	éénmalig	56	
	ontwikkeling	rat	4 dagen	0,08	
intermediair	dood	rat	15 weken	4,5	
			36 weken	1,4	
	systemisch	rat (dermat.)	15 weken	1,8	
	neurologisch	rat	36 weken		1,4
	voortplanting	rat	30-60 dagen		0,7

**Geschatte externe blootstelling (dagelijkse inname).** Er wordt geschat dat de gemiddelde mens dagelijks 5 ppb thallium opneemt via de voeding (ATSDR 1992) (zie: Tabel 6).

Tabel 6: Geschatte dagelijks inname van thallium bij de mens (ATSDR, 1992)

ATSDR 1992	blootstellingsmedium		
Parameter	Water	Lucht	Voeding
Conc. in medium	0,89 µg/l	0,48 ng/m <sup>3</sup>	50 µg/kg (schatting)
Inname van medium*	2 l/dag	20 m <sup>3</sup> /dag	1,5 kg
Geabsorbeerde fractie	1,0	0,35	1
Dagelijkse inname	2 µg	3,4 ng	5 µg

\* Inname werd bepaald voor een volwassen persoon van 70 kg

Uit Environmental Health Criteria (EHC, 1996): In gebieden die niet gecontamineerd zijn met thallium is de concentratie in lucht en water meestal lager dan respectievelijk 1 ng/m<sup>3</sup> en 1 µg/L. Voedsel van plantaardige en dierlijke oorsprong bevat gewoonlijk een concentratie lager dan 1 mg/kg droog gewicht.

Volgens het EPA bedraagt de gemiddelde externe blootstelling voor de algemene bevolking 0,48 ng thallium/m<sup>3</sup> lucht. Gebaseerd op een gemiddelde consumptie van 2 liter water per dag ligt de inname van thallium via drinkwater voor de meeste volwassenen beneden 1 µg/dag.

De gemiddelde inname van thallium via de voeding werd berekend op 0,005 mg/dag (= 5 µg) voor volwassenen (U.K.). Via groenten alleen al zou de dagelijkse opname 3,8 µg bedragen (U.S.).

### Richtwaarden voor interne blootstelling

De HBM I waarde, opgesteld door de Duitse biomonitoringscommissie, bedraagt 5 µg/l urine (Schulz et al. 2012). Deze waarde geeft de concentratie waaronder geen gezondheidseffecten worden verwacht.

### Referentiewaarden humane biomonitoring uit de literatuur

Tabel 7 geeft een overzicht van humane biomonitoringsstudies over thallium in de literatuur.

Tabel 7: Literatuuroverzicht van waarden voor thallium in bloed en urine bij de mens

Leeftijdsgroep	Geslacht	Matrix	Waarde *	Eenheid	Jaar	Land
6-88 jr.	m/v	urine	0,34	µg/g crt	1997	USA <sup>1</sup>
6-88 jr.	m/v	urine	0,44	µg/L	1997	USA <sup>1</sup>
adolescenten	m/v	bloed	<0,06	µg/L	1994	Zweden <sup>2</sup>
adolescenten	m/v	serum	<0,2	µg/L	1994	Zweden <sup>2</sup>
16-70 jr.	m/v	urine	0,26	µg/L	1998	UK <sup>3</sup>
16-70 jr.	m/v	bloed	0,02	µg/L	1998	UK <sup>3</sup>
< 18 jr.		urine	0,11	µg/L	2004	EU <sup>4</sup>
		bloed	0,02	µg/L	2005	Canada <sup>5</sup>
		plasma	0,06	µg/L	2005	Canada <sup>5</sup>
		urine	0,15	µg/L	2005	Canada <sup>5</sup>
		haar	0,0002	µg/L	2005	Canada <sup>5</sup>
18-70 jr.	m/v	bloed	0,019	µg/L	2005	Duitsland <sup>6</sup>
2-17 jr.	m/v	urine	0,18	µg/L	2005	Duitsland <sup>7</sup>
18-65 jr.	m/v	urine	0,15	µg/L	2005	Duitsland <sup>7</sup>
Adolesc. + volw.	m/v	serum	0,03	µg/l	2006	Italië <sup>8</sup>
7-66 jr.	m/v	urine	0,17 (a) (0,40: P95)	µg/l	2010	UK <sup>9</sup>
6-11 jr.	m/v	urine	0,191	µg/l	2003-04	US NHANES <sup>10</sup>
12-19 jr.			0,201			
>20 jr.			0,145			
6-11 jr.			0,161		2009-10	
12-19 jr.			0,150			
>20 jr.			0,142			
>20 jr.			0,138		2011-12	
volwassenen	m/v	urine	0,211 (a)	µg/l	2010-11	België <sup>11</sup>

\* gemiddelde, tenzij (a): mediaan

<sup>1</sup>(Paschal et al. 1998) <sup>2</sup>(Bárány et al. 2002) <sup>3</sup>(White & Sabbioni 1998) <sup>4</sup>(Heitland & Köster 2004) <sup>5</sup>(Goullé et al. 2005) <sup>6</sup>(Heitland & Köster 2006b) <sup>7</sup>(Heitland & Köster 2006a) <sup>8</sup>(Pino et al. 2012) <sup>9</sup>(Staff et al. 2013) <sup>10</sup>(US NHANES) <sup>11</sup>(Hoet et al., 2013)

### 3.1.2. BLOOTSTELLING-EFFECT RELATIES UIT STEUNPUNT M&G

Op basis van de thalliummetingen in bloed en urine bij jongeren van het tweede Steunpunt M&G (n=609, jongeren van referentiepopulatie, Genk-Zuid en Menen), werd bestudeerd of blootstelling aan thallium in verband kan worden gebracht met gezondheidseffecten. De resultaten (Croes et al.



2013) toonden een verband tussen thallium en verschillende eindpunten. Bij jongens was thallium in bloed positief gecorreleerd met vrij testosteron, maar eveneens met totaal estradiol en vrij estradiol. Thallium in urine was negatief gecorreleerd met FSH. Zowel thallium in bloed als thallium in urine was positief geassocieerd met trijodothyronine (fT3), één van de schildklierhormonen. Tevens werden er relaties gevonden tussen urinair thallium en de puberteitsontwikkeling: hogere concentraties van thallium werden in verband gebracht met een vertraagde pubisbehairing (ontwikkeling van schaamhaar), zowel bij jongens als bij meisjes, met een vertraagde ontwikkeling van de geslachtsorganen bij jongens (genitaal stadium) en tragere borstontwikkeling bij meisjes. Bloed thallium was eveneens negatief geassocieerd met pubisbehairing en borstontwikkeling bij meisjes. Thallium was negatief geassocieerd met het voorkomen van allergieën, d.w.z. dat allergie minder voorkwam bij hogere thalliumconcentraties in bloed of urine. Dit werd geobserveerd voor eczeem, dierenallergie en hooikoorts. Wat betreft genotoxiciteit waren er tegengestelde resultaten: enerzijds werd een negatieve associatie vastgesteld tussen thallium en de komeettest (minder % DNA-schade bij hogere thalliumwaarden), maar anderzijds werden hogere concentraties van thallium geassocieerd met hogere urinaire excretie van 8-hydroxy-deoxy-guanosine in de urine, eveneens een maat voor DNA-schade. Thallium in bloed was positief geassocieerd met serum cystatine-C, een merker voor nierschade. En tot slot was thallium in de urine negatief geassocieerd met lichaamslengte.

De blootstelling-effect relaties bij 254 moeder-kind koppels uit het tweede Steunpunt M&G (algemeen Vlaanderen) werden beschreven in een rapport van Govarts et al., 2012.

Er werden associaties bestudeerd tussen thallium in perifeer bloed van de moeder (enkele dagen na de bevalling) en gezondheidseffecten bij de moeder (astma, allergie en fertiliteit), bekomen via vragenlijsten. Een hogere blootstelling aan thallium was geassocieerd met een grotere (borderline niet-significante) kans op hormonale zwangerschapsstimulatie (odds ratio (95% BI): 1,48 (0,98-2,22;  $p=0,06$ ), na correctie voor leeftijd en roken. Blootstelling aan thallium wordt dus in verband gebracht met een grotere kans op vrouwelijke vruchtbaarheidsproblemen.

Thallium in navelstrengbloed werd bestudeerd in relatie tot groei en ontwikkeling van de pasgeborenen en hormoongehalten in navelstrengbloed. Hogere waarden van thallium in navelstrengbloed werden gerelateerd met een kleinere hoofdomtrek van de baby bij de geboorte: per toename van thallium met de interkwartiel range (+ 9 ng/l) werd er een daling van 0,29 (-0,53 tot -0,05) cm van de hoofdomtrek geobserveerd ( $p=0,03$ ). Deze bevindingen tonen dus een effect van thallium op de prenatale groei van de foetus.

## 3.2. METHODE

### 3.2.1. SELECTIE VAN DE STALEN

Er werden *at random* 80 stalen van jongeren (14-15 jaar) uit de biobank van het 1<sup>e</sup> Steunpunt geselecteerd om thallium in volbloed te meten. Van ieder gebied werden 10 stalen geselecteerd, telkens 5 jongens en 5 meisjes (behalve voor Olen, waar slechts 1 staal van een meisje beschikbaar was, en er dus 9 jongens werden uitgesorteerd). De stalen werden sinds het moment van staalafname (2003-2004) bewaard bij -20°C in de oorspronkelijke primaire tube (metaalvrije Vacutainer).

**3.2.2. BESCHRIJVING MEETMETHODE**

De metaalconcentraties in volbloed worden bepaald met een HR-ICP-MS (Element2). Voordat de stalen kunnen gemeten worden, moet eerst een zuurdigestie worden uitgevoerd.

Het gevolgde protocol werd eerder voorgesteld door Schroijen et al. (2008). Samengevat wordt 500 µL bloed met behulp van 500 µL gedestilleerd salpeterzuur (ultrapuur 65%, pro analyse) en 100 µL waterstofperoxide gedigereerd in gesloten tubes (PFA-tubes). Deze tubes worden als volgt onderworpen aan een temperatuursprogramma: 8 minuten stijging tot 70 °C, 8 minuten houden op 70 °C, 8 minuten stijgen tot 100 °C, 8 minuten houden op 100 °C, 8 minuten stijgen tot 120 °C, 20 minuten houden op 120 °C en 10 minuten afkoelen. Tijdens het digestieprogramma wordt de druk steeds beneden de 75 psi gehouden. Na digestie wordt 3.9 mL Milli Q water toegevoegd aan de stalen en worden deze geanalyseerd met de HR-ICP-MS. Hiervoor wordt 2.5 mL van het gedigereerde staal in metaal-vrije tubes in de autosampler geplaatst. Alle metaalconcentraties worden bepaald met behulp van een standaardadditiemethode (minimum 4 calibratiepunten met concentraties in het werkingsgebied van de stalen) en toevoeging van een interne standaard.

Ieder bloedstaal wordt minstens 2 maal gemeten. Indien er meer dan 10% verschil is tussen deze onafhankelijk bepaalde concentraties, wordt nog een derde analyse uitgevoerd.

Om contaminatie van de stalen te vermijden wordt er gewerkt met afgesloten tubes voor zuurdigestie, met ultra-pure reagentia en in een ruimte voorzien van een luchtzuiveringssysteem ("clean lab").

Tijdens iedere digestiecyclus worden naast de te analyseren bloedstalen, 2 procedureblanco's, 2 gecertificeerde referentiestalen en 1 gepoold bloedstaal geanalyseerd. De metaalconcentraties van de bloedstalen worden telkens gecorrigeerd voor de gemiddelde blancowaarde, gemeten tijdens dezelfde digestiecyclus.

**3.2.3. VALIDATIE MEETMETHODE**

**Procedureblanco's en detectielimieten.** Voor de berekening van de procedurele blanco's (ng/l) wordt, zoals voor de bloedstalen, rekening gehouden met een 10-voudige verdunning. LOD en LOQ worden berekend als respectievelijk 3 en 10 keer de standaarddeviatie (SD) (Tabel 8). De verhouding concentratie bloedstaal/concentratie blanco is algemeen groter dan 15.

Tabel 8: Procedurele blanco's en detectielimiet voor bloed thallium in ng/l

Aantal gemeten	44
gemiddelde	1,783
SD	0,979
mediaan	1,444
p25	1,269
p75	2,073
IQR	0,804
LOD in bloed	2,937
LOQ in bloed	9,789

SD: standaard deviatie; p25: 25<sup>e</sup> percentiel; p75: 75<sup>e</sup> percentiel; IQR: interkwartiel range; LOD: detectielimiet; LOQ; kwantificatielimiet;

**Lineariteit en meetbereik.** Gebaseerd op recente kalibraties met een groot bereik aan concentraties is deze methode lineair voor concentraties in meetoplossing van 1 ng/l tot 500 ng/l, wat rekening houdend met verdunning neerkomt op bloedconcentraties van 10 ng/l tot 5000 ng/l

**Recoveries voor referentiestaal en reproduceerbaarheid van een eigen poolstaal.** Als referentiestaal werd een Sero L1 staal herhaaldelijk gemeten, en werd de recovery van de meting berekend. De targetwaarde van de het Sero L1 staal is 8 ng/l. Dit is een lage concentratie in vergelijking met de niveaus die in bloed worden gemeten (grootteorde: 30 ng/l) en een waarde in de buurt van de LOQ.

*Tabel 9: Recoveries van referentiestaal (verhouding gemeten resultaat / gecertificeerd resultaat)*

Aantal gemeten	38
gemiddelde	1,102157
SD	0,16376
RSD	0,148582
Target	1
mediaan	1,096575
p25	0,980675
p75	1,249294
IQR	0,268618

SD: standaard deviatie; p25: 25<sup>e</sup> percentiel; p75: 75<sup>e</sup> percentiel; IQR: interkwartiel range; LOD: detectielimiet; LOQ: kwantificatielimiet;

De recovery wordt uitgedrukt als de verhouding ons resultaat/gecertificeerd resultaat. De resultaten van 38 herhaalde metingen worden gegeven in Tabel 9. De waarde ligt ongeveer 10% hoger in vergelijking met de target waarde. Dit is een aanvaardbaar cijfer, zeker omdat het gaat om een zeer lage concentratie in de buurt van de LOQ.

Naast het referentiestaal worden ook metingen uitgevoerd op een zelf aangemaakt poolstaal. Dit staal wordt bij iedere analysebatch meegenomen ter controle van de reproduceerbaarheid. De poolmetingen geven over alle analysebatches heen een goede reproduceerbaarheid, met een RSD van 8,34% (Tabel 10). De concentratie van thallium ligt ook bijna 4 x hoger dan in de seronorm L1 en in de grootteorde van wat in de tweede cyclus van FLEHS in bloed van Vlaamse adolescenten gemeten werd.

*Tabel 10: Recoveries van eigen poolstaal (ng/l)*

Aantal gemeten	59
gemiddelde	28,381
SD	2,366
RSD	0,08338
mediaan	28,038
p25	26,773
p75	30,054
IQR	3,281

#### 3.2.4. DATA MANAGEMENT EN STATISTISCHE ANALYSE

De resultaten van de metingen werden gekoppeld aan de databank van het eerste Steunpunt M&G, na toestemming voor toegang tot de data van het Dagelijks Bestuur (aanvraagprocedure volgens spelregels van het Steunpunt).

De statistische analyses werden uitgevoerd in Statistica, versie 10. De gegevens werden In getransformeerd om een normale verdeling te bekomen. Vergelijking van gemiddelde waarden bij

2 groepen gebeurde door middel van Student's t-test; bij meer dan 2 groepen door middel van ANOVA. Correlaties werden bestudeerd door middel van Pearson correlatie-coëfficiënten. Blootstelling-effectrelaties werden bestudeerd door middel van logistische regressie analyse voor binaire parameters en door middel van lineaire regressie analyse voor continue eindpunten.

### 3.3. RESULTATEN BLOED THALLIUM

#### 3.3.1. BLOED THALLIUM METINGEN IN HISTORISCH PERSPECTIEF

##### → **Beschrijvende statistiek**

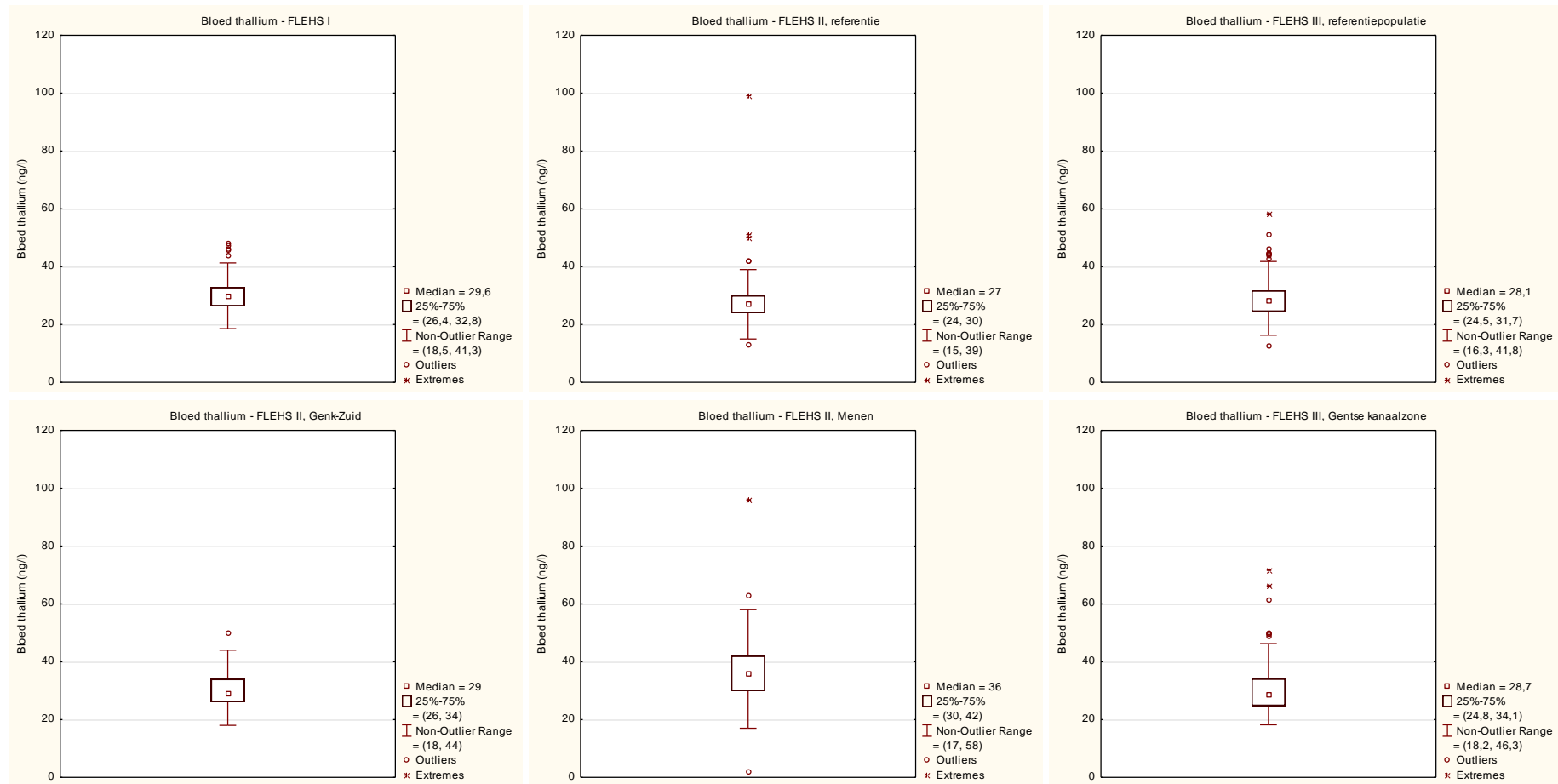
De beschrijvende statistiek voor de 80 nieuwe metingen uit het eerste Steunpunt M&G wordt gepresenteerd in Tabel 11 (eerste lijn), samen met de resultaten van de metingen uit de 2<sup>e</sup> en 3<sup>e</sup> Steunpunt M&G; de grafische weergave van de data onder vorm van box plots wordt gegeven in Figuur 10.

In alle campagnes lagen 100% van de metingen boven de detectielimiet. Deze bedroeg 2,9 ng/l in FLEHS I; 1,0 ng/l in de referentiecampagne in FLEHS II; 1,5 ng/l in de campagnes 'Genk-Zuid' en 'Menen' in FLEHS II; 2,9 ng/l in de referentiecampagne en de campagne 'Gentse kanaalzone' in FLEHS III.

Tabel 11: Beschrijvende statistiek voor bloed thallium (ng/l) in opeenvolgende HBM campagnes in Vlaanderen

Campagne	N	% >LOQ	GM (95% BI)	min.	P10	P25	P50	P75	P90	max.
FLEHS I – referentie	79	100%	29,5 (28,1-30,9)	18,5	23,2	26,4	29,6	32,8	38,5	47,8
FLEHS II – referentie	210	100%	27,0 (26,2-27,8)	13,0	20,0	24,0	27,0	30,0	34,0	99,0
FLEHS III – referentie	207	100%	28,3 (27,4-29,1)	12,5	21,9	24,5	28,1	31,7	37,5	58,2
FLEHS II – Genk-Zuid	197	100%	29,2 (28,4-30,1)	18,0	22,0	26,0	29,0	34,0	38,0	50,0
FLEHS II – Menen	199	100%	34,8 (33,3-36,4)	20,0	25,0	30,0	36,0	42,0	48,0	96,0
FLEHS III – Gentse kanaalzone	199	100%	29,0 (28,0-30,0)	18,2	21,1	24,8	28,7	34,1	38,7	71,8

N: aantal; GM: geometrische gemiddelde; BI: betrouwbaarheidsinterval; P: percentiel; min.: minimum; max.: maximum



Figuur 10: Box plots voor bloed thallium in verschillende jongerencampagnes van Steunpunt M&G

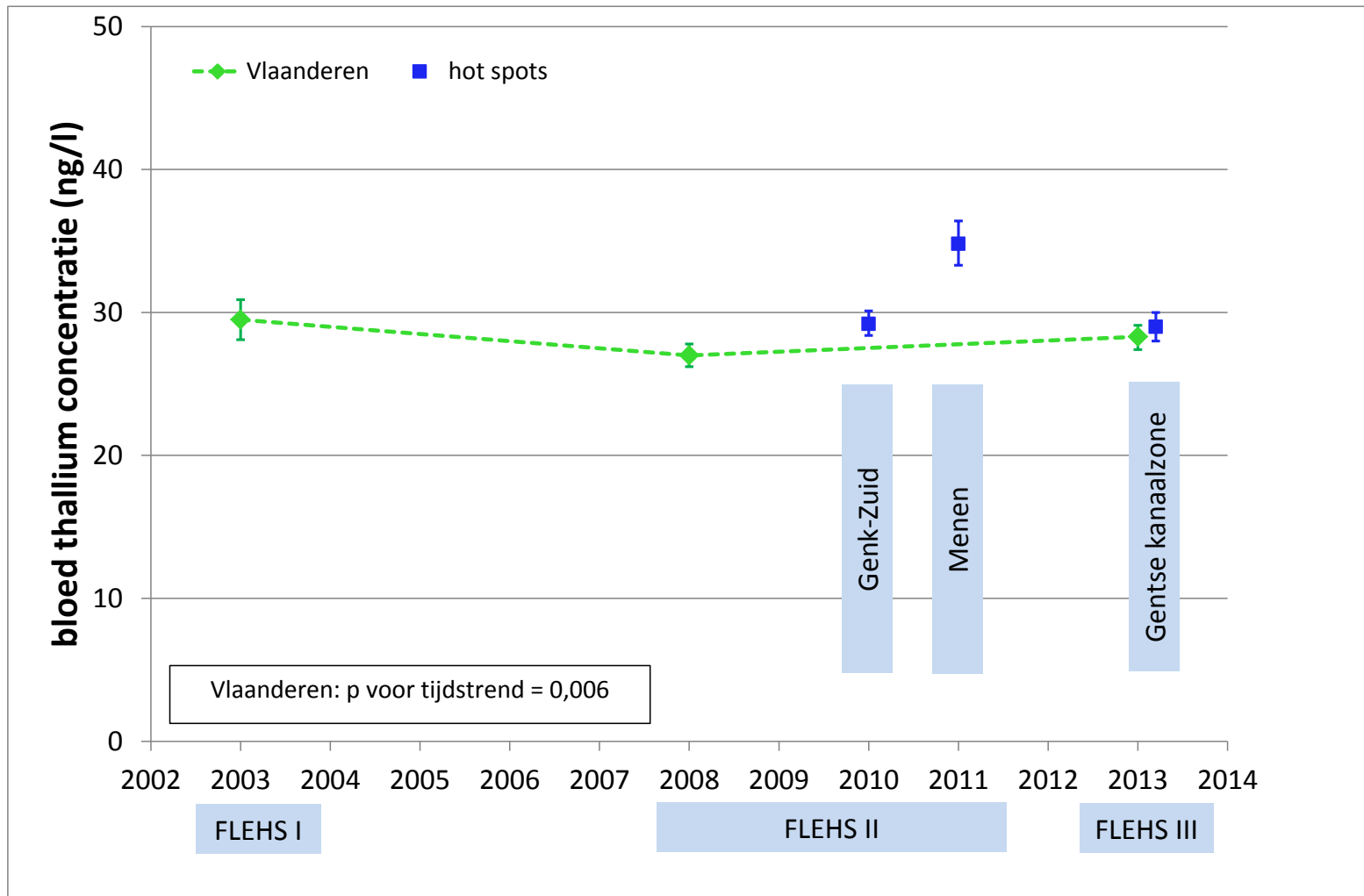
→ **Tijdslijn**

De metingen van bloed thallium die werden gemeten op biobankstalen van het eerste Steunpunt M&G kunnen statistisch vergeleken worden met de reeds beschikbare thallium metingen bij jongeren uit het 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G (referentie, Genk-Zuid en Menen) en het 3<sup>e</sup> Steunpunt M&G (referentie en Gentse kanaalzone) van het Steunpunt M&G. De tijdstrend wordt weergegeven in Figuur 11.

De groene lijn geeft de tijdslijn voor de algemene Vlaamse bevolking. Het geometrisch gemiddelde voor bloed thallium bedroeg 29,5 (28,1-30,9) ng/l in 2003; 27,0 ng/l (26,2-27,8) in 2008 en 28,3 (27,4-29,1) ng/l in 2013. Een statistische analyse voor tijdstrend geeft aan dat de verschillen doorheen de tijd significant zijn: de gemiddelde waarde van bloed thallium bij jongeren uit het eerste Steunpunt ligt hoger dan de gemiddelde waarde in de 2<sup>e</sup> en 3<sup>e</sup> Steunpunt M&G. Mogelijk heeft dit te maken met het feit dat er in het eerste Steunpunt jongeren werden geselecteerd in acht typegebieden, en niet in een algemene Vlaamse populatie. De typegebieden bestonden onder meer uit een aantal industriegebieden zoals de Albertkanaalzone, Olen en de regio rond verbrandingsovens, waar de blootstelling aan thallium mogelijk hoger is dan in algemeen Vlaanderen. Op basis van 10 metingen per regio is echter geen statistische analyse van de gebieden mogelijk omdat de aantallen per groep te klein zijn.

In het tweede Steunpunt M&G werd bloed thallium ook gemeten bij de moeders van de pasgeboren baby's en in navelstrengbloed van de baby. Omwille van de verschillen in matrix en in leeftijdsklasse worden deze cijfers niet mee op de grafiek gepresenteerd. De waarden bij de moeders (n=235) lagen dicht in de buurt van die van de jongeren: het GM (95% BI) bedroeg 28 (27-29) ng/l; de 90<sup>e</sup> percentiel was gelijk aan 38 ng/l. De metingen in navelstrengbloed (n=241) lagen lager in vergelijking met perifeer bloed. Het GM (95% BI) bedroeg 17 (16-18) ng/l en de P90 was 25 ng/l.

In Figuur 11 worden ook de waarden (GM  $\pm$ 95% BI) van bloed thallium weergegeven voor de drie onderzochte hotspot regio's, nl. Genk-Zuid (2010), Menen (2011) en de Gentse kanaalzone (2013). Zowel in Genk-Zuid ( $p < 0,001$ ) als in Menen ( $p < 0,001$ ) werd bij de statistische analyse van de hotspot regio's een significante verhoging geobserveerd voor de bloed thallium concentratie in vergelijking met de Vlaamse referentiepopulatie uit 2008. Voor de Gentse kanaalzone werd geen significante verhoging van bloed thallium ( $p = 0,67$ ) vastgesteld in vergelijking met de referentiepopulatie uit 2013. Indien we de resultaten in een historisch perspectief plaatsen, zien we dat de thallium concentraties in de hotspot Menen inderdaad zeer sterk verhoogd zijn, en duidelijk afwijken van alle gemeten referentiepopulaties (2003, 2008 en 2013). De gemiddelde waarde van Genk-Zuid ligt in verhouding veel dicht bij de waarden van de Vlaamse referentiepopulaties. De conclusie van verhoogde thallium blootstelling in Genk-Zuid blijft geldig aangezien in de eindrapportering van Genk-Zuid een analyse werd uitgevoerd met de best beschikbare referentiepopulatie en er in de statistische analyses maximaal rekening werd gehouden met versturende factoren.



Figuur 11: Tijdstrends voor bloed thallium bij jongeren (14-15 jaar) in opeenvolgende HBM campagnes



### 3.3.2. DETERMINANTEN VAN BLOOTSTELLING

De metingen op de biobankstalen werden gekoppeld aan de databank van de jongeren van het 1<sup>e</sup> Steunpunt, en er werd associaties bestudeerd tussen bloed thallium en determinanten van blootstelling. Voorzichtigheid in interpretatie is geboden omwille van de relatief kleine aantallen (n=79).

De resultaten van de analyse worden samengevat in Tabel 12. Jongens hadden hogere waarden dan meisjes, maar de resultaten waren niet significant. Ook de aanwezigheid van een kachel in huis, blootstelling aan druk verkeer, of contact met zware metalen via hobby's of school (bijv. pottenbakken, lassen, enz..) was niet significant geassocieerd met verschillen in bloed thallium. Er werd wel een effect genoteerd van het eten van lokale voeding: jongeren die lokale groenten of lokaal fruit gebruikten hadden significant hogere thalliumwaarden.

Er kwamen geen rokers voor in de groep van 79 deelnemers (14-15 jaar oud), dus het effect van roken kon niet worden bestudeerd. De vraag over blootstelling aan passief roken was zeer onvolledig ingevuld: 15 jongeren gaven aan niet blootgesteld te zijn; 2 gaven aan dit wel te zijn. Er werd geen significant geobserveerd tussen beide groepen, maar de aantallen zijn te klein voor een duidelijke conclusie.

Voor variabelen met meerdere antwoordcategorieën zoals seizoen, opleidingstype (ASO, TSO, BSO, KSO), BMI klasse (ondergewicht, normaal gewicht, overgewicht) werd een ANOVA analyse uitgevoerd. Er werden geen verschillen gedetecteerd, maar de feitelijke conclusie is dat de aantallen van de subgroepen te klein zijn, en dus geen conclusies toelaten.

Tabel 12: Determinanten van blootstelling voor bloed thallium

Determinant	Klasse	N	Bloed thallium (ng/l) GM (95% BI)	p-waarde
Geslacht	jongens	43	29,96 (27,97-32,09)	0,43
	meisjes	36	28,89 (27,41-30,45)	
Kachel in huis	neen	42	28,65 (27,12-30,26)	0,11
	ja	30	30,85 (28,67-33,19)	
Consumptie lokale groenten	neen	38	28,02 (26,14-30,03)	<b>0,03</b>
	ja	40	30,89 (29,25-32,61)	
Consumptie lokaal fruit	neen	38	28,20 (26,51-30,00)	<b>0,01</b>
	ja	40	33,51 (30,24-34,95)	
Regelmatig in druk verkeer	neen	35	30,30 (28,37-32,36)	0,17
	ja	37	28,44 (26,76-30,22)	
Contact met zware metalen	neen	74	29,50 (28,15-30,91)	0,77
	ja	2	30,81 (23,96-39,61)	

N: aantal; GM: geometrisch gemiddelde; BI: betrouwbaarheidsinterval

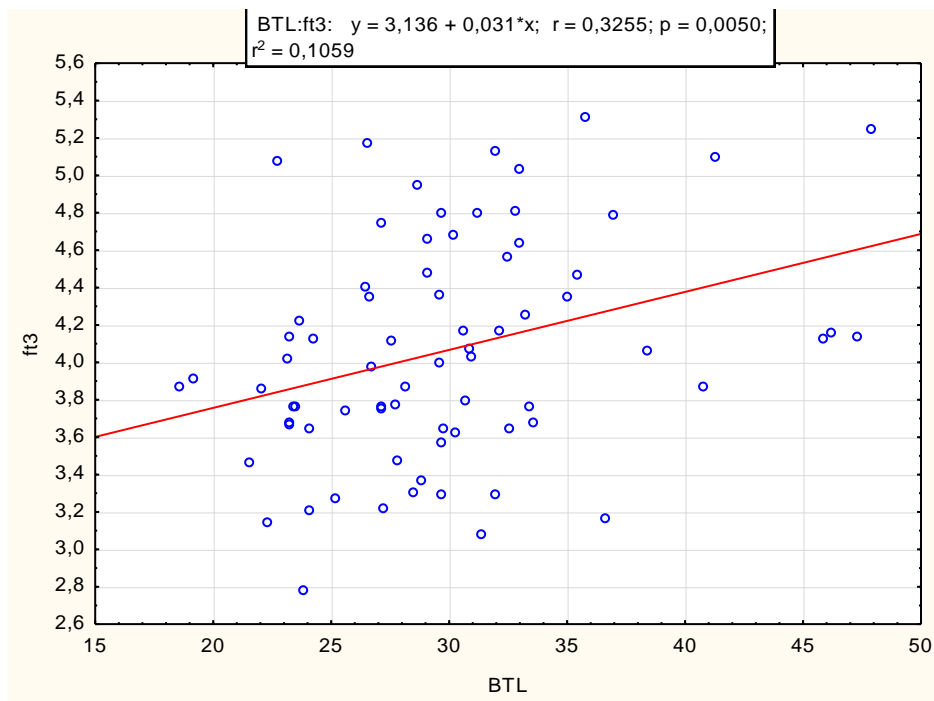
### 3.3.3. DOSIS-EFFECT RELATIES 1<sup>e</sup> STEUNPUNT M&G

De metingen op de biobankstalen werden gekoppeld aan de databank van het de jongeren van het 1<sup>e</sup> Steunpunt, en er werd dosis-effectrelaties berekend. Voorzichtigheid in interpretatie is geboden omwille van de relatief kleine aantallen (n=79).

Er werden geen significante associaties geobserveerd tussen bloed thallium en merkers van DNA-schade, of geslachtshormonen.

Er werd een significante en positieve relatie gedetecteerd tussen bloed thallium en de concentratie van trijodothyronine (ft3) in serum. Voor de andere schildklierhormonen (ft4 en TSH) werden geen relaties gevonden met bloed thallium.

Deze geïsoleerde bevinding is vanuit gezondheidskundig standpunt moeilijk te interpreteren, maar kan mogelijk wel bijdragen tot de kennis indien ze bevestigd wordt in andere, grotere groepen.



Figuur 12: Correlatieplot tussen vrij trijodothyronine (ft3) in serum en bloed thallium

Er werden geen associaties gevonden tussen bloed thallium concentraties en het risico op astma of allergie. Relaties met puberteitsstadia waren heel zwak omwille van de kleine subgroepen (aparte analyses voor jongens en meisjes).

#### 3.3.4. VERGELIJKING MET GEZONDHEIDSKUNDIGE RICHTLIJN EN MET BUITENLANDSE STUDIES

De Duitse Human Biomonitoringscommissie heeft op basis van proefdierstudies een HBM-I waarden voor thallium in urine afgeleid. Deze bedraagt 5 µg/l.

Voor thallium in bloed zijn er geen gezondheidskundige richtlijnen ter beschikking. Het feit echter dat er in de jongeren populaties uit de algemene bevolking in Vlaanderen significante blootstelling-effectrelaties worden geobserveerd, suggereert dat gezondheidsrisico mogelijk is bij relatief lage niveaus (zie 3.1.2 en 3.3.3).

De referentiewaarden bij jongeren in Vlaanderen zijn vrij constant: het geometrische gemiddelde varieert over een periode van 10 jaar tijd binnen een beperkte range, nl. tussen 0,027 en 0,030 µg/l (Figuur 11). Deze waarde is hoog in vergelijking met andere West-Europese landen waar de gemiddelde of mediane waarden voor bloed thallium in bevolkingsstudies meestal onder de 0,020 µg/l liggen (Tabel 7). Ook voor urinair thallium liggen de waarden in Vlaanderen in de hoge range in

vergelijking met andere landen: in FLEHS II ligt de gemiddelde concentratie bij jongeren uit de Vlaamse referentiepopulatie in de buurt van 0,20 µg/l, terwijl de internationaal gerapporteerde waarden in de range van 0,14 tot 0,17 µg/l liggen (Tabel 7). De achtergrondblootstelling voor thallium in de algemene Vlaamse bevolking is dus vrij hoog in vergelijking met de literatuur.

## HOOFDSTUK 4. ARSEEN

---

In deze studie werden arseenspeciaties uitgevoerd op 90 urinestalen uit de biobank, nl. 30 stalen van jongeren uit het eerste Steunpunt M&G, 30 stalen van jongeren uit de referentiepopulatie van het tweede Steunpunt M&G en 30 stalen van jongeren uit de hotspot regio 'Genk-Zuid' van het tweede Steunpunt M&G. Van deze laatste twee groepen waren reeds metingen beschikbaar van toxisch relevant arseen dat werd gemeten als som parameter; van de jongeren uit het 1<sup>e</sup> Steunpunt waren er nog geen individuele arseen metingen beschikbaar. Arseen-speciatie betekent dat de afzonderlijke arseenmetabolieten worden gemeten, nl. As(III), As(V), monomethyl arsenaat (MMA), dimethyl arsenaat (DMA) en arsenobetaine.

In dit hoofdstuk wordt eerst achtergrondinformatie over arseen gegeven (4.1); daarna worden de meetmethode en statistische analysemethoden van de nieuwe metingen toegelicht (4.2); de resultaten van de meting worden besproken in een historisch perspectief (tijdslijn), geanalyseerd in relatie tot determinanten en gezondheidseffecten en geïnterpreteerd tegenover gezondheidskundige richtlijnen (4.3); tot slot, wordt een conclusie over de gezondheidskundige interpretatie geformuleerd (4.4).

### 4.1. ACHTERGRONDINFORMATIE

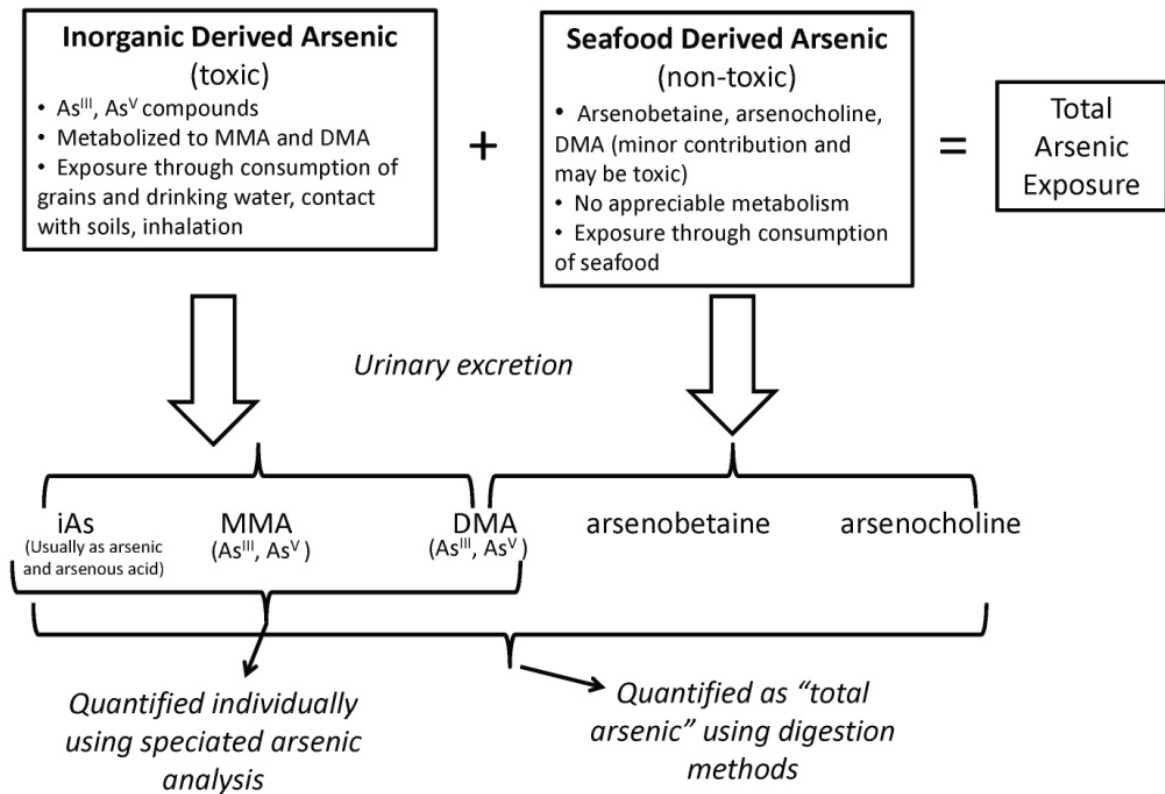
#### 4.1.1. LITERATUURSTUDIE

Arseen (CAS: 7440-38-2) komt van nature voor in de aardkorst en in sommige streken kan het grond- of putwater hoge gehalten aan arseen bevatten.

Arseen werd in de geneeskunde gebruikt als behandeling van syfilis. In de 19<sup>de</sup> eeuw werd koperarsenaat gebruikt als kleurstof in snoepjes. In de 20<sup>ste</sup> eeuw werd loodarsenaat gebruikt als pesticide in de fruitteelten en als een behandelmiddel van hout, om het rotten tegen te gaan (chromium koper arsenaat, CCA). Via recyclage van met CCA behandeld hout, kan arseen ook nog in het milieu terecht komen. (ECHA 2009).

Tegenwoordig wordt arseen nog gebruikt in halfgeleiders (galliumarsenide) met toepassingen in led's en zonnecellen en als lichtgevoelige laag in kopieermachines, faxen en laserprinters en in legeringen voor lood-zuur batterijen van voertuigen. Arseen wordt ook gebruikt in de geneeskunde indien geen antibiotica beschikbaar zijn of als de patiënten immuun zijn geworden. Arseentrioxide wordt in de hematologie gebruikt voor behandeling van leukemie, arseentrijodide (inwendig) voor behandeling van borstkanker, lepra en huidziekten en arseensulfide wordt uitwendig gebruikt bij huidziekten (psoriasis).

**Blootstellingswegen naar de mens.** De mens wordt blootgesteld aan arseen via de voeding (granen, vlees, vis en gevogelte), drinkwater of inademing, o.a. van stofdeeltjes (bodem, lucht). Anorganische arseen is meer toxisch dan de organische vorm (ATSDR, 2005). Het anorganisch arseen - As(III) en As(V) - wordt omgezet tot organische MMA en DMA metabolieten. As(III) en de metaboliet MMA<sup>III</sup> zijn meer toxisch dan As(V) en MMA<sup>V</sup>. De organische vormen arsenobetaine en arsenocholine zijn voornamelijk afkomstig van vis consumptie en zijn weinig toxisch (zie Figuur 13).



Figuur 13: Blootstellingsroutes en toxiciteit van arseenmetaboliëten (bron: Hays et al., 2010)

**Persistentie (halfwaardetijd in de mens).** Het biologisch halfleven in de mens van anorganisch As bedraagt tussen 2 en 4 dagen (German Federal Environmental Agency, 2003), arseen wordt voornamelijk uitgescheiden via urine (WHO 2001).

Het half-leven van arseen in urine is 4 dagen (Lauwerys & Hoet, 2001). Arseen in bloed wordt op slechts enkele uren tijd gemetaboliseerd (ATSDR, 2007; Vahter 1983).

**Perinatale blootstelling (placenta/moedermelk).** Anorganisch arseen kan door de placentabarrière en accumuleert selectief in het neuro-epithelium van de ontwikkelende foetus (Hanlon & Ferm, 1977; Lindgren et al., 1984). Het is in moedermelk aanwezig in lage concentraties (Grandjean et al., 1995; Vahter, 2009).

#### Verwachte gezondheidseffecten.

Acuut toxisch: gastrointestinale, cardiovasculaire, neurologische, hematologische en respiratoire effecten (HSDB)

Chronische blootstelling via inademing geeft vooral irritatie van de huid en van de muceuze membranen; chronische blootstelling via voeding of drinkwater geeft vooral gastro-intestinale effecten, perifere neuropathie, huidproblemen (pigmentatie, keratinisatie).

Er zijn recente aanwijzingen dat arseen ook specifieke schadelijke effecten kan veroorzaken bij kinderen (lagere IQ scores) (Calderon et al., 2001, Tsai et al., 2003)

Anorganisch arsenicum wordt geklasseerd als kankerverwekkend voor de mens (IARC groep 1, 1987) en is geassocieerd met longkanker, huidkanker, blaaskanker, leverkanker.

Bij proefdieren blijkt arseen teratogeen, en veroorzaakt abortus en doodgeboortes.

Er zijn aanwijzingen dat arseen hormoonverstorende eigenschappen heeft en o.a. interfereert met de transcriptie van de oestrogeen receptor en andere steroid receptoren (Davey, 2007), wat op een mogelijk andere werkingsmechanisme wijst dan bij huidletsels en carcinogeniciteit (Rana, 2014).

**Laagste niveau waarbij schadelijke effecten worden waargenomen.**

Er werden LOAEL en NOAEL waarden afgeleid voor dermale effecten bij de mens (Tabel 13): de effecten op de huid worden momenteel beschouwd als de meest gevoelige eindpunten ten gevolge van arseen blootstelling, naast het voorkomen van kankers.

Tabel 13: LOAEL en NOAEL waarden voor dermale effecten bij de mens

LOAEL mg As/kg/dag	NOAEL mg As/kg/dag	Referentie
	0,006-0,007	Southwick et al, 1981
	0,003	Harrington et al., 1978
0,006	0,009	Mazumder et al., 1988
0,002		Haque et al., 2003
0,022	0,0004	Cebrian et al., 1983
0,02		Zaldivar, 1974
0,01		Borgona et al., 1980
	0,02	Valentine et al., 1985

Het EFSA CONTAM panel maakt gebruik van benchmark dose methode. Een benchmark dose of BMD wordt berekend als de gemiddelde schatting van de concentratie waarbij de respons (het eindpunt) met een vooraf bepaald percentage boven de achtergrondwaarde uitstijgt (BMD<sub>01</sub>: 1% boven achtergrond). De Benchmark Dose Lower Confidence Limit of BMDL is de ondergrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de BMD.

In de EFSA studie is de range van de BMDL<sub>01</sub> 0,3-8 µg/kg/dag (EFSA,2009).

**Geschatte externe blootstelling (dagelijkse inname).**

Op basis van de WHO air quality guidelines werd de dagelijkse inname voor de algemene bevolking geschat op 45 µg/dag (WHO, 2000).

De geschatte gemiddelde dagelijkse inname van anorganische arseen wordt door ATSDR (2005) geschat op 10,22 µg/dag met een zeer brede range (0,93 – 104,89 µg/dag).

Volgens de SCOOP 3.2.11-studie bedraagt de dagelijkse inname van totaal As in België voor de volwassen populatie 265 µg/dag (DG Health and Consumer Protection, 2004). Volgens Bierkens et al. (2006) zijn deze resultaten voor België zeer fragmentair. Bierkens et al. (2006) berekenen de blootstelling aan arseen op basis van een gemiddelde blootstelling van 36,1 µg/dag (Deelstra et al., 1996) en rekening houdend met de verschillende bestemmingstypes (type I: natuur, type II: landbouw, type III: wonen, type IV: recreatie en type V: industrie) (Tabel 14).

Tabel 14: Berekende blootstelling aan arseen (uit: Bierkens et al., 2006)

	Oraal (µg/kg.d)		Inhalatoir (µg/kg.d)			
	Type II	Type III	Type IV en V	Ref.	Types II- V	Ref.
Inclusief vis	5,1.10 <sup>-1</sup>	5,14.10 <sup>-1</sup>	5,16.10 <sup>-1</sup>	Deelstra, 1996a	1,37.10 <sup>-3</sup>	VMM, 2004
exclusief vis	2,55.10 <sup>-1</sup>	2,57.10 <sup>-1</sup>	2,58.10 <sup>-1</sup>	Deelstra, 1996a	1,37.10 <sup>-3</sup>	VMM, 2004

Het Europees Voedselagentschap (EFSA) schat de dagelijkse inname via voedsel in Europa op 1,22 µg/kg/dag (mediaan van gemiddelden van alle landen), en in België op 1,19 µg/kg/dag (gemiddeld). De P95 waarden zijn respectievelijk 3,38 µg/kg/dag en 3,11 µg/kg/dag. Andere wegen van blootstelling zouden voor de algemene bevolking relatief verwaarloosbaar zijn (EFSA, 2009). Uitgaande van de gemiddelde inname via voedsel in België en de range voor de BMDL<sub>01</sub> volgens EFSA is de range van de veiligheidsmarge (geschatte inname/dosis referentieniveau) 0.15 tot 3.97.

#### Richtwaarden voor interne blootstelling:

In het boek van Lauwerys en Hoet uit 2001, wordt voor niet-beroepsmatig blootgestelde personen een normaal verwachte waarde voor anorganische As < 1,5 µg/g creatinine en voor TRA (=anorganisch As + MMA + DMA) ≤ 15 µg/L (geen recente consumptie van zeevruchten) vooropgesteld (Lauwerys & Hoet, 2001). Dit zijn geen gezondheidskundige richtlijnen maar referentiewaarden voor blootstelling (op basis van P95 in de populatie).

De beschikbare gezondheidskundige richtwaarde voor de algemene bevolking, nl. de Biomonitoring Equivalent (BE), voor TRA is 6,4 µg/L (Hays et al., 2010). Andere BE's kunnen hieruit afgeleid worden, en worden voorgesteld in Tabel 15.

Tabel 15: Biomonitoring Equivalenten per leeftijdsgroep (op basis van Hays et al., 2010)

	BE 11-16 jaar	BE vanaf 16 jaar
TRA	5,62 µg/L	6,4 µg/L
MMA	1,38 µg/L	1,6 µg/L
DMA	3,13 µg/L	3,52 µg/L
iAs (= As III +IV)	1,11 µg/L	1,28 µg/L
Som iAs en MMA	2,49 µg/L	2,88 µg/L

Bij consumptie van vis of visproducten 4 tot 5 dagen voor staalname, wordt aangeraden om de BE voor som van iAs en MMA te nemen, aangezien het DMA gehalte sterk kan beïnvloed worden door de visconsumptie (Hays et al., 2010).

#### Beroepsblootstelling:

De BEI (Biological Exposure Index) bedraagt 35 µg As/l urine (Cadwell et al., 2009).

De referentiewaarde voor beroepsblootstelling aan totaal arseen bedraagt < 40 µg/g creatinine.

#### Referentiewaarden humane biomonitoring uit de literatuur

Een overzicht van de arseenwaarden in bloed en urine die werden teruggevonden in humane biomonitoringsstudies uit de literatuur wordt gegeven in Tabel 16.

Tabel 16: Referentiewaarden voor arseen in bloed en urine volgens de literatuur

leeftijdsgroep	geslacht	matrix	metabooliet	waarde	jaar	land
23-62	m	urine	As(III)	<LOD	'96-'97	Duitsland
23-62	m	urine	As(V)	<LOD	'96-'97	Duitsland
58,8	m	urine	As (III+V)	204 <sup>a</sup> nmol/L	<1997	Denemarken
57,5	v	urine		150 <sup>a</sup> nmol/L	<1997	Denemarken
18-69	m/v	urine	T_As	3,08 µg/g crt	1998	Duitsland
18-45	v	urine	T_As	55,8 <sup>a</sup> µg/L	'98-'00	Chili
61-65	m	urine	T_As	83,9 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
61-65	m	urine	T_As	36,9 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili

leeftijdsgroep	geslacht	matrix	metaboliët	waarde	jaar	land
61-65	m	urine	T_As	30,8 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
13-15	m	urine	T_As	69,7 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
13-15	m	urine	T_As	26 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
13-15	m	urine	T_As	17,5 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
22-58	m	urine	T_As	62,1 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
22-58	m	urine	T_As	18,5 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
22-58	m	urine	T_As	18,9 <sup>a</sup> µg/g crt	'99-'00	Chili
6-12		urine	T_As	4,8 <sup>b</sup> µg/L	'01-'02	Duitsland
9-11		urine	T_As	4,6 <sup>b</sup> µg/L	'02-'03	Duitsland
5-7	m/v	urine	As (III+V)	5,69 <sup>a</sup> µg/L	<2004	Duitsland
6-12		urine	T_As	15 µg/L	<2004	Duitsland
6-11	m/v	urine	T_As As-betaine DMA	8,25 µg/g crt <LOD 4,43 µg/g crt	'03-'04	USA <sup>5</sup>
12-19	m/v	urine	T_As As-betaine DMA	6,11 µg/g crt <LOD 2,74 µg/g crt	'03-'04	USA <sup>5</sup>
>19	m/v	urine	T_As As-betaine DMA	8,64 µg/g crt 1,79 µg/g crt 3,79 µg/g crt	'03-'04	USA <sup>5</sup>
6-9	m/v	urine	iAs (III+V) MMA DMA T_As	1,0 µg/l 2,9 µg/l 29,3 µg/l 34,5 µg/l	<2005	China <sup>7</sup>
31-39	m/v	urine	iAs (III+V) MMA DMA T_As	0,4 µg/l 0,8 µg/l 7,7 µg/l 9,1 µg/l	<2005	China <sup>7</sup>
20-77	m/v	urine	iAs (III+V) MMA DMA T_As	29,43 µg/l 23,25 µg/l 134,6 µg/l 187,5 µg/l	2005	India <sup>6</sup>
31.8	m	urine	T_As	17,3 <sup>b</sup> µg/g crt	<2006	UK
31.8	v	urine	T_As	16,9 <sup>b</sup> µg/g crt	<2006	UK
12-75		urine	T_As	1,29 <sup>b</sup> µg/g crt	<2006	Spanje
13-71 maanden		urine	T_As	13,55 µg/L	<2006	USA
3-14	m/v	urine	T_As	4,5 µg/l	<2006	Duitsland <sup>1</sup>
18-74	m/v	urine	T_As	11,96 µg/g crt	2006	Frankrijk <sup>2</sup>
18-74	m/v	urine	As (III+V+ MMA+DMA)	3,34 µg/g crt	2006	Frankrijk <sup>2</sup>
>21 Low Seafood diet	m/v	urine	iAs (III+V) MMA DMA As-betaine T_As	0,63 µg/l 1,2 µg/l 10,1 µg/l 14,3 µg/l 24,8 µg/l	2006	Puerto Rico <sup>9</sup>
>21 High Seafood	m/v	urine	iAs (III+V) MMA	0,41 µg/l 1,5 µg/l	2006	Puerto Rico <sup>9</sup>



leeftijdsgroep	geslacht	matrix	metabooliet	waarde	jaar	land
diet			DMA	10,9 µg/l		
			As-betaine	30,5 µg/l		
			T_As	43,4 µg/l		
20-34	m/v	Bloed	T_As	2,34 µg/l	<2010	Italië <sup>3</sup>
30-49	m/v	Bloed	T_As	2,66 µg/l	<2010	Italië <sup>3</sup>
50-64	m/v	Bloed	T_As	3,94 µg/l	<2010	Italië <sup>3</sup>
All ages	m/v	urine	As III	<LOD	2009-2010	NHANES, USA <sup>4</sup>
			As V	<LOD		
			DMA	3,5 µg/l <sup>b</sup>		
			MMA	<LOD (1,02 µg/l <sup>c</sup> )		
			As-betaine	0,94 µg/l <sup>b</sup>		
			T_As	8,15 µg/l <sup>b</sup>		
>18	m/v	urine	iAs III	0,11 µg/l <sup>b</sup>	'12-'13	UK <sup>8</sup>
			iAs V	<LOD (0,23 µg/l <sup>d</sup> )		
			MMA	0,56 µg/l <sup>b</sup>		
			DMA	2,44 µg/l <sup>b</sup>		
			As-betaine	3,87 µg/l <sup>b</sup>		

<sup>a</sup> rekenkundig gemiddelde; <sup>b</sup> mediaan; <sup>c</sup> 75<sup>e</sup> percentiel; <sup>d</sup> 95<sup>e</sup> percentiel

Referenties: uit Van Den Heuvel et al. (2007) en <sup>1</sup>Schulz et al. (2009); <sup>2</sup>Fréry et al. (2011); <sup>3</sup>De Felip et al. (2014); <sup>4</sup>Aylward et al., (2014); <sup>5</sup>(Caldwell et al., 2009); <sup>6</sup>(Hata et al., 2012); <sup>7</sup>(Sun et al., 2007); <sup>8</sup>(Leese et al., 2014); <sup>9</sup>(Mansilla-Rivera et al., 2014)

#### 4.1.2. BLOOTSTELLING-EFFECT RELATIES UIT STEUNPUNT M&G

Bij pasgeborenen was een hogere blootstelling aan arseen (gemeten in navelstrengbloed) geassocieerd met een groter risico op 'small-for-gestational age (SGA)': bij een toename van arseen in navelstrengbloed met de interkwartiel range (+0,93 µg/l) was de odds ratio voor een SGA baby gelijk aan 1,65 (BI: 1,15-2,37; p=0,007) (Govarts et al. 2010).

Bij jongeren werden verschillende significant relaties geobserveerd tussen biomerkers voor blootstelling aan arseen (bloed arseen, totaal arseen in urine of toxisch relevant arseen (TRA) in urine) en gezondheidseffecten. Bloed arseen was significant (p=0,03) en positief geassocieerd met de concentratie van thyroxine (fT4) in serum. TRA in urine was significant (p=0,01) en negatief geassocieerd met de nierfunctie parameter microglobuline A1 (Croes et al., 2012).

Bij volwassenen was de bloedplaatjesfunctie negatief gecorreleerd met totaal arseen in de urine. Bij een stijging van arseen met 22,6 µg/l daalde de gemiddelde bloedingstijd met een factor 0,98 (95% BI: 0,96-0,99; p=0,01), waardoor de bloedplaatjesaggregatie versnelde (Govarts et al. 2010).

## 4.2. METHODE

### 4.2.1. SELECTIE VAN DE STALEN

Er werden 90 stalen uit de biobank van het 1<sup>e</sup> Steunpunt (jongeren) en 2<sup>e</sup> Steunpunt (jongeren referentie + jongeren Genk-Zuid) geselecteerd om arseen-speciatie in urine uit te voeren:

- 30 stalen van 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G – referentiepopulatie: selectie op basis van TRA waarden die in 2010 werden gemeten: 10 stalen per tertiaal;
- 30 stalen van 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G – Genk zuid: selectie op basis van TRA waarden die in 2010 werden gemeten: 10 stalen per tertiaal;
- 30 stalen van 1<sup>e</sup> Steunpunt M&G – willekeurige selectie (geen eerdere metingen van TRA beschikbaar).

#### 4.2.2. MEETMETHODE

De verschillende arseenverbindingen (As(V), As(III), MonoMethylArsonic acid (MMA), Dimethyl Arsonic acid (DMA) en arsenobetaine (AsB)) worden in de urine, na verdunnen en centrifugeren, met behulp van High Performance Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HPLC-ICP-MS) op een C-18 HPLC-kolom gescheiden met behulp van een ionen-paarreagens (butaansulfonzuur) waarna het effluent verneveld wordt met een concentrische verstuiver in een cyclonische vernevelkamer. De verschillende arseenverbindingen worden in het plasma tot As herleid waarna een gedeelte zal ioniseren en verder bepaald zal worden. In de Dynamic Reaction Cell (DRC-cell) reageert het aanwezige arseen met zuurstof waarbij AsO met massa 91 ontstaat waarbij men met veel minder interferenties de aanwezige hoeveelheid As kwantitatief kan bepalen.

#### 4.2.3. VALIDATIE MEETMETHODE

##### Herhaalbaarheid van een onbekend urinestaal

###### Praktijk

- Analyseer de 1LK 20 maal achter elkaar in dezelfde run.
  - Vul de concentraties in het sjabloon “Precisie\Herhaalbaarheid” in.
- Hiervan wordt het gemiddelde, de standaarddeviatie en de VC (%) berekend.

###### Criteria ter goedkeuring

- De VC (%) van de herhaalbaarheid moet kleiner zijn dan of gelijk aan de VC (%) bekomen met de formule van Horwitz vermenigvuldigd met 0,5.  
Voor concentraties kleiner dan 100 µg/l mag de VC (%) bekomen uit de formule van Horwitz niet groter zijn dan 22,5 % vermenigvuldigd met 0,5 (= 11,25 %).
- De VC (%) van de herhaalbaarheid moet kleiner zijn dan de VC (%) van de reproduceerbaarheid.

###### Resultaten

Datum: 24/07/14	Initialen: AB
-----------------	---------------

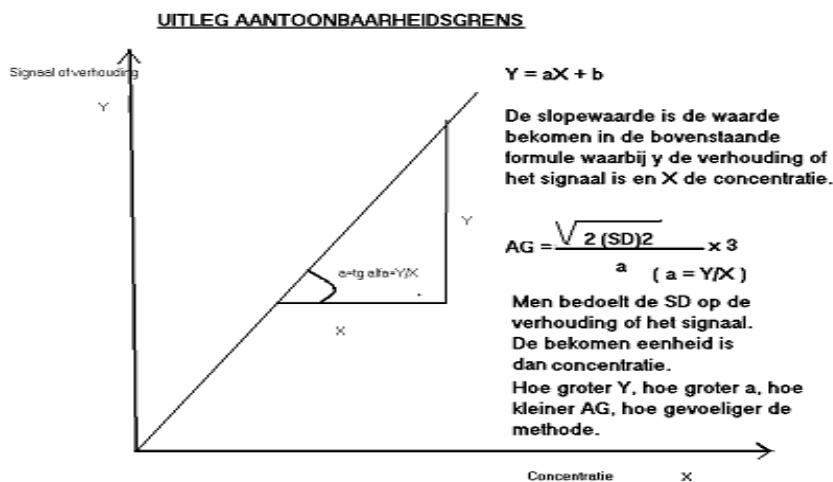
Component	As V	As III	MMA
Gemiddelde (µg/l):	4,96	6,77	2,99
SD (µg/l):	0,19	0,23	0,22
VC (%):	3,79	3,42	7,42

Component	DMA	AsB
Gemiddelde (µg/l):	2,33	3,02
SD (µg/l):	0,10	0,13
VC (%):	4,13	4,14

## Aantoonbaarheid

### Theorie

De **aantoonbaarheidsgrens** is de kleinste hoeveelheid of concentratie die met een vastgestelde redelijke waarschijnlijkheid kan worden aangetoond (analytische gevoeligheid).



### Praktijk

- Maak 10 maal een standaard met een concentratie kleiner dan of gelijk aan de laagste standaard van de kalibratiecurve.
- Analyseer de standaarden achter elkaar in dezelfde run.
- Vul de gevonden signalen in het sjabloon in.

De LLR (Lower Limit of Reporting) wordt gebaseerd op deze aantoonbaarheidsgrens en bepaald in samenspraak met de klinisch bioloog. Bij het bepalen van de LLR wordt er ook rekening gehouden met de klinische relevantie van de parameter.

### Resultaat

Datum: 02/07/14	Initialen: AB
-----------------	---------------

Component	As V	As III	MMA
AG ( $\mu\text{g/l}$ ):	0,273	0,215	0,263
LLR ( $\mu\text{g/l}$ ):	0,5	0,5	0,5

Component	DMA	AsB
AG ( $\mu\text{g/l}$ ):	0,295	0,332
LLR ( $\mu\text{g/l}$ ):	0,5	0,5

### Lineariteit

Datum: 10/07/14	Initialen: AB
-----------------	---------------

Standaardoplossing	As V	As III	MMA
--------------------	------	--------	-----

Lineair in de matrix tot ... ( $\mu\text{g/l}$ ):	1800	2500	990
---	------	------	-----

Standaardoplossing	DMA	AsB
Lineair in de matrix tot ... ( $\mu\text{g/l}$ ):	765	1340

### Meetbereik

Datum: 10/7/04	Initialen: AB
----------------	---------------

Standaardoplossing	As V	As III	MMA
Meetbereik van ... tot ... ( $\mu\text{g/l}$ ):	0,5 – 1800	0,5 – 2500	0,5 - 990

Standaardoplossing	DMA	AsB
Meetbereik van ... tot ... ( $\mu\text{g/l}$ ):	0,5 – 765	0,5 - 1340

### Overdracht

#### Theorie

Deze parameter test de overdracht van een component van het ene staal naar het daaropvolgende staal tijdens het uitvoeren van de analyse.

#### Praktijk

- Maak acht maal een standaard 0 en één standaard waarvan de concentratie hoger is dan de hoogste standaard van de kalibratiecurve en binnen het lineair gebied ligt.
- Plaats deze, zoals aangegeven in sjabloon "[Overdracht](#)" op het toestel.
- Zet de gevonden signalen in het sjabloon.  
Er wordt berekend hoeveel % overdracht er is.

#### Criteria

We beschouwen overdracht met een concentratie gelijk aan LLR/5 als significant.

Aan de hand van het percentage overdracht (gevonden in het sjabloon) wordt berekend vanaf welke concentratie men een overdracht heeft met een concentratie gelijk aan LLR/5.

#### Resultaat

Datum: 17/07/14	Initialen: AB
-----------------	---------------

Component	Besluit:
As V	Een staal na een staal met concentratie $\geq 200 \mu\text{g/l}$ in de matrix moet opnieuw geanalyseerd worden.
As III	Een staal na een staal met concentratie $\geq 200 \mu\text{g/l}$ in de matrix moet opnieuw geanalyseerd worden.
MMA	Een staal na een staal met concentratie $\geq 200 \mu\text{g/l}$ in de matrix moet opnieuw geanalyseerd worden.
DMA	Een staal na een staal met concentratie $\geq 408 \mu\text{g/l}$ in de matrix moet opnieuw geanalyseerd worden.
AsB	Een staal na een staal met concentratie $\geq 200 \mu\text{g/l}$ in de matrix moet opnieuw geanalyseerd worden.

**Juistheid**

Resultaten G-EQUAS:

Ronde	Opgegeven waarde G-Equas $\mu\text{g/l}$	Som As-speciatie $\mu\text{g/l}$
49A	47,6	50,2
53A	107	112
53B	116	118

**4.2.4. DATA MANAGEMENT EN STATISTISCHE ANALYSE**

De metingen van de arseen-speciatie werden in eerste instantie als afzonderlijke metabolieten beschouwd. Metingen onder de detectielimiet werden op de helft van de detectielimiet gezet. De detectielimiet bedroeg 0,1  $\mu\text{g/l}$  voor iedere afzonderlijke metaboliet. Daarna werd de som van de toxische metabolieten (TRA) berekend als  $\text{As(V)} + \text{As(III)} + \text{MMA} + \text{DMA}$ . Resultaten werden uitgedrukt in  $\mu\text{g/l}$  en in  $\mu\text{g/g}$  creatinine.

De resultaten van de metingen werden gekoppeld aan de databank van het eerste Steunpunt M&G, na toestemming voor toegang tot de data van het Dagelijks Bestuur (aanvraagprocedure volgens spelregels van het Steunpunt).

De statistische analyses werden uitgevoerd in Statistica, versie 10. De gegevens werden In getransformeerd om een normale verdeling te bekomen. Waarden onder de LOQ werden vervangen door  $\frac{1}{2}$  LOQ. Vergelijking van gemiddelde waarden bij 2 groepen gebeurde door middel van Student's t-test; bij meer dan 2 groepen door middel van ANOVA. Correlaties werden bestudeerd door middel van Pearson correlatie-coëfficiënten.

Blootstelling-effectrelaties werden bestudeerd door middel van logistische regressie analyse voor binaire parameters en door middel van lineaire regressie analyse voor continue eindpunten.

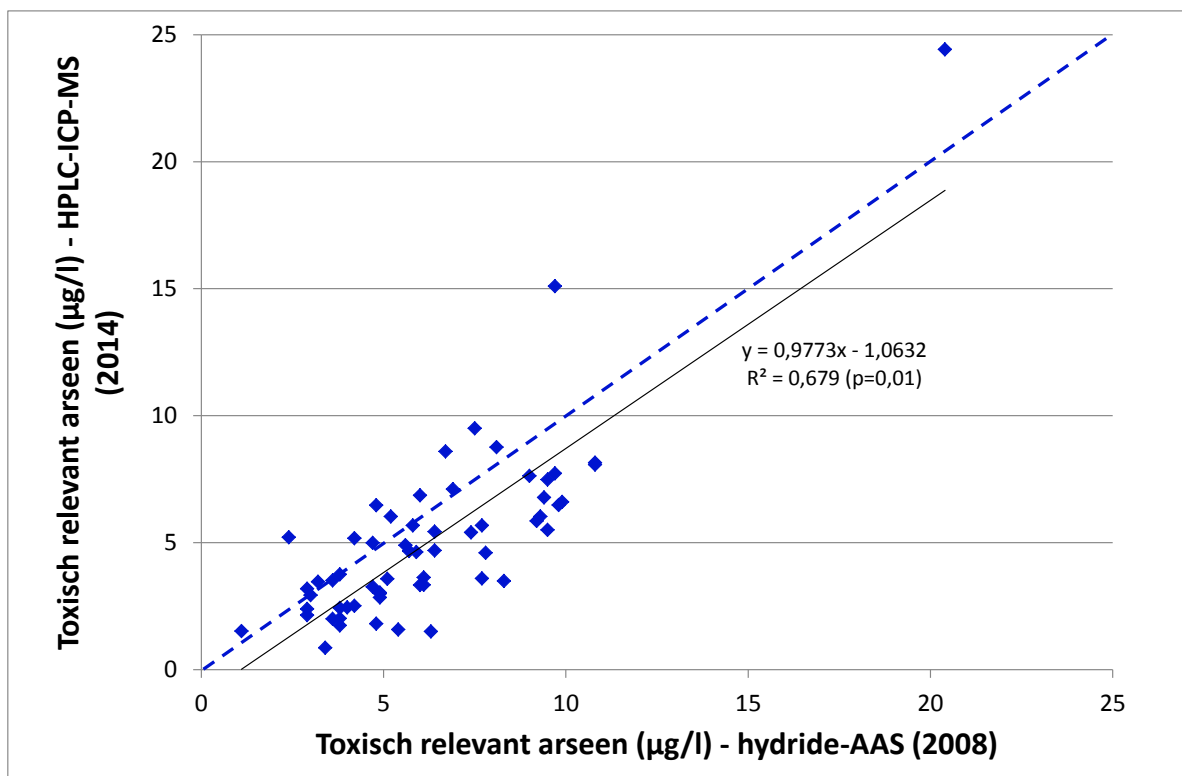
Gegevens uit het eerste Steunpunt M&G worden in tabellen en figuren aangeduid als 'FLEHS I' (first Flemish Environment and Health Survey); gegevens uit de referentiepopulatie van het tweede Steunpunt M&G als 'FLEHS II' en gegevens uit de hot spot 'Genk-Zuid' van het tweede Steunpunt M&G als 'Genk-Zuid'.

**4.3. RESULTATEN ARSEEN-SPECIATIE****4.3.1. VERGELIJKING VAN TWEE MEETMETHODEN**

Voor 60 stalen uit het tweede Steunpunt M&G (30 uit referentiepopulatie en 30 uit Genk-Zuid) zijn dubbele metingen beschikbaar, nl. (1) meting van de som fractie TRA d.m.v. hydride AAS en (2) meting arseen-speciatie d.m.v. HPLC-ICP-MS. Deze laatste methode laat toe om op basis van de afzonderlijke metabolieten, de som parameter voor toxisch arseen te berekenen, nl. som van  $\text{As(III)}$ ,  $\text{As(V)}$ , MMA en DMA.

Figuur 14 toont de resultaten van de vergelijking tussen de 'oude' methode waarbij de som parameter van toxisch relevant arseen (TRA) wordt gemeten d.m.v. hydride-AAS en de 'nieuwe' methode waarbij de afzonderlijke metabolieten worden gemeten d.m.v. HPLC-ICP-MS en er daarna een somparameter wordt berekend. Er is een zeer goede correlatie tussen beide metingen ( $R^2=0,68$ ;  $p<0,001$ ). De regressielijn tussen beide metingen (volle zwarte lijn in figuur) ligt dicht bij de lijn van gelijkheid (blauwe stippellijn in figuur). Beide lijnen lopen parallel wat betekent dat de afwijking tussen de twee metingen constant is over de hele meetrange. De regressielijn ligt

systematisch onder de lijn van gelijkheid wat betekent dat er een systematisch lagere waarde wordt gerapporteerd met de 2<sup>e</sup> methode.



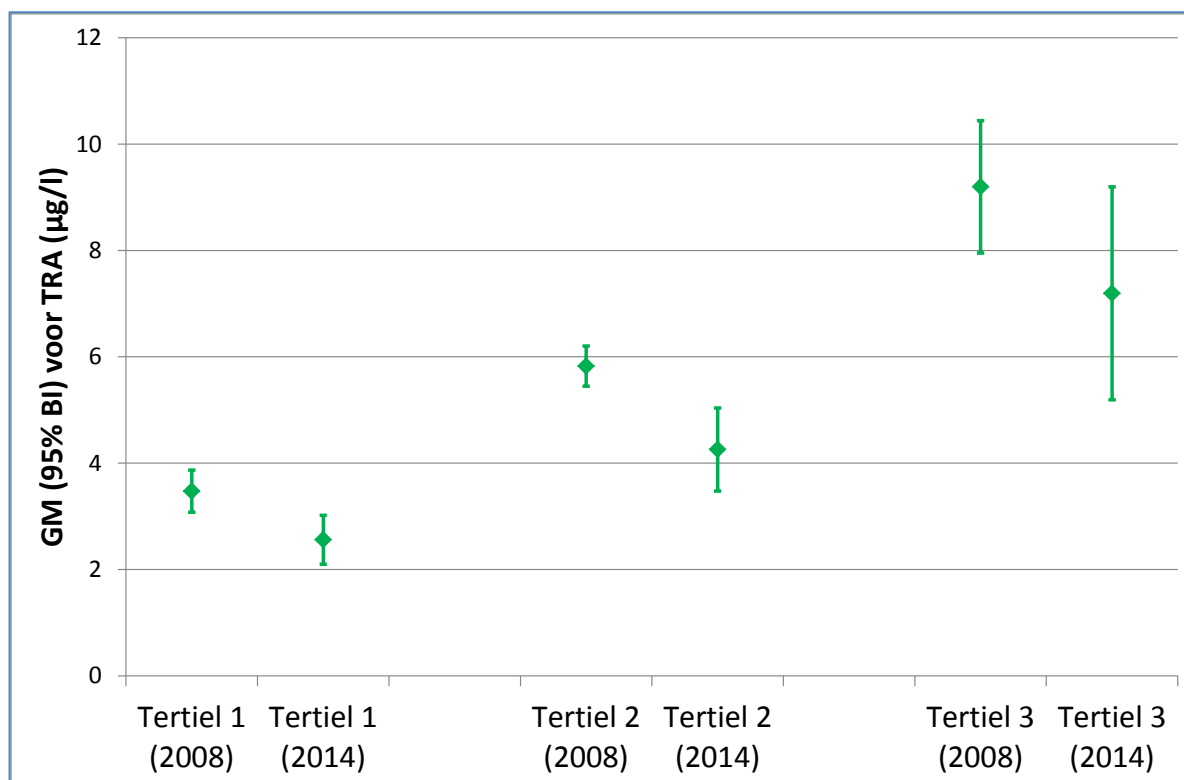
*Figuur 14: Vergelijking tussen meting van toxisch relevant arseen met hydride-AAS (2008) en meting van toxisch relevant arseen met HR-ICP-MS (2014)*

De cijfermatige vergelijking tussen de twee methoden wordt gegeven in Tabel 17. Het geometrisch gemiddelde bedraagt 5,66 (95% BI: 4,89-6,42) µg/l volgens de ‘oude’ methode en 4,24 (3,34-5,15) µg/l volgens de ‘nieuwe’ methode. Dit bevestigt dus de conclusies uit de correlatie-analyse: de waarden van de nieuwe methode liggen gemiddeld 25% lager, maar de betrouwbaarheidsintervallen overlappen.

De selectie van de stalen gebeurde op basis van de ‘oude’ metingen: zowel in de referentiepopulatie als in Genk-Zuid werden er 10 stalen geselecteerd uit ieder tertiel. In de referentiepopulatie waren de tertielen als volgt: 1,1-4,2 µg/l; 4,2-6,2 µg/l; 6,3-20,4 µg/l; in Genk-Zuid lagen de tertielgrenzen op 1,8-5,2 µg/l; 5,4-7,8 µg/l; 7,9-36,0 µg/l. De beschrijvende statistiek voor de stalen uit de 3 tertielgroepen wordt gegeven in Tabel 17. De gemiddelde waarde (GM en 95% BI) voor beide methoden wordt per subgroep grafisch voorgesteld in Figuur 15. Er was een systematisch verschil tussen de ‘oude’ en ‘nieuwe’ meting: de gemiddelde waarde van de nieuwe meting lag 26,3% lager voor het 1<sup>e</sup> tertiel, 27,0% lager voor het 2<sup>e</sup> tertiel en 21,8% lager voor het 3<sup>e</sup> tertiel. De waarden in het eerste en laatste tertiel worden meer bepaald door de outliers, en daardoor is de spreiding op deze gegevens groter. Door het kleine betrouwbaarheidsinterval op de metingen in het 2<sup>e</sup> tertiel, worden de verschillen tussen de metingen meer uitgesproken, maar globaal zijn de afwijkingen over de hele range vergelijkbaar.

Tabel 17: Vergelijking tussen meting van toxisch relevant arseen met hydride-AAS (2008) en meting van toxisch relevant arseen met HR-ICP-MS (2014), voor totale groep, en per tertiel.

Subgroep	Indicator	TRA met hydride-AAS (meting uit 2008) $\mu\text{g/l}$	TRA met HR-ICP-MS (meting uit 2014) $\mu\text{g/l}$
Alle deelnemers (n=60)	GM (95% BI)	5,66 (4,89-6,42)	4,24 (3,34-5,15)
	mediaan (P25-P75)	5,85 (4,15-7,88)	4,65 (2,98-6,47)
	minimum-maximum	1,10 – 20,40	0,86 – 24,42
Deelnemers uit 1 <sup>e</sup> tertiel (op basis van metingen 2008) (n=20)	GM (95% BI)	3,47 (3,08-3,87)	2,56 (2,10-3,02)
	mediaan (P25-P75)	3,8 (3,0-4,2)	2,5 (2,0-3,2)
	minimum-maximum	1,1– 4,9	0,9 – 5,2
Deelnemers uit 2 <sup>e</sup> tertiel (op basis van metingen 2008) (n=20)	GM (95% BI)	5,82 (5,45-6,20)	4,26 (3,48-5,04)
	mediaan (P25-P75)	5,9 (5,3-6,2)	4,7 (3,5-5,5)
	minimum-maximum	4,7 – 7,8	1,5 – 8,6
Deelnemers uit 3 <sup>e</sup> tertiel (op basis van metingen 2008) (n=20)	GM (95% BI)	9,20 (7,95-10,44)	7,19 (5,19-9,20)
	mediaan (P25-P75)	9,3 (8,0-9,7)	6,9 (5,8-8,1)
	minimum-maximum	6,4 – 20,4	3,5 – 24,42



GM: geometrische gemiddelde; BI: betrouwbaarheidsinterval; TRA: toxisch relevant arseen

Figuur 15: Gemiddelde TRA op basis van twee metingen (hydride-AAS uit 2008 en HR-ICP-MS uit 2014) per tertiel (op basis van metingen uit 2008).

**Besluit:** de twee methoden voor het meten van toxisch relevant arseen vertonen een zeer sterke correlatie, maar de metingen op basis van HR-ICP-MS liggen systematisch ongeveer 25% lager dan de metingen met hydride-AAS. De meting met HR-ICP-MS geeft een belangrijke meerwaarde omdat het informatie geeft over de aparte arseenmetabolieten. Wegens de goede correlatie met de 'oude' methode zijn de waarden ook geschikt om tijdstrends op te volgen, zeker omdat er een overlap is waarbij metingen voor beide methoden beschikbaar zijn.

**Beleidsconclusies:** De resultaten van de vergelijkende studie tussen de twee analytische meetmethoden werden terug gecommuniceerd naar het Steunpunt M&G. Na overleg met de wetenschappers (veldwerkcomité en Dagelijks Bestuur) en de beleidsmakers (Stuurgroep) van het derde Steunpunt M&G werd in september 2014 beslist om de metingen van toxisch relevant arseen in de referentiepopulatie jongeren en in de hotspot 'Gentse kanaalzone' uit te voeren volgens de nieuwe methode, nl. met HR-ICP-MS. De argumenten waren de meerwaarde voor de interpretatie dank zij de beschikbaarheid van aparte metabolieten, en de goede correlatie met de oude methode waardoor de tijdslijn kan worden opgevolgd. Een nadeel is de hogere prijs voor de meting (ongeveer dubbel), maar aangezien er ook een meerwaarde is voor de interpretatie, weegt de kostprijs niet door.

#### 4.3.2. BESCHRIJVENDE STATISTIEK EN CORRELATIES TUSSEN URINAIRE ARSEENMETABOLIETEN

De beschrijvende statistiek van de arseenmetabolieten bij de 90 deelnemers uit het 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G wordt gegeven in Tabel 18. De detectiefrequenties variëren sterk per metaboliet: As(III) ligt boven de detectielimiet in ongeveer 30% van de stalen; As(V) wordt gedetecteerd in 60% van de stalen; MMA en arsenobetaine is detecteerbaar bij ongeveer 80% van de deelnemers en DMA ligt overal boven de LOD. Als we rekening houden met de verschillen in detectielimieten, kunnen we stellen dat deze cijfers in de lijn liggen van wat in de literatuur wordt gerapporteerd.

In onderstaande tabel worden de detectiefrequenties gerapporteerd voor de Amerikaanse humane biomonitoring, NHANES, uit 2009-10 voor de algemene U.S. bevolking. Voor As(III) en As(V) lag de detectielimiet ongeveer 10x hoger dan in de huidige studie; deze metabolieten werden in minder dan 5% van de deelnemers gedetecteerd. MMA en DMA hadden een detectielimiet die 1 tot 1,5 keer hoger was dan in de huidige studie en werd gedetecteerd in respectievelijk 30% en 80% van de deelnemers. De detectielimiet van arsenobetaine lag ongeveer 4 keer hoger in NHANES, en de detectiefrequentie was vergelijkbaar in de U.S. en in Vlaanderen.

**Table 1**

Selected population-weighted statistics for urinary arsenic species in the NHANES 2009–2010 dataset.

Species	% Detected	LOD
Arsenous acid (As-III)	4.0	1.20
Arsenic acid (As-V)	2.2	1.00
Monomethylarsonic acid (MMA)	30.4	0.91
Dimethylarsinic acid (DMA)	80.7	1.70
Trimethylarsine oxide (TMA)	0.7	1.00
Arsenocholine	2.1	0.59
Arsenobetaine	60.3	0.40
Total arsenic	99.5	0.74

LOD = limit of detection.

Bron: Aylward et al. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014; 69:49.



Tabel 18: Beschrijvende statistiek voor urinaire arseenmetabolieten bij 90 jongeren uit de HBM campagnes in Vlaanderen

Campagne	N	% >LOQ	GM (95% BI)	min.	P10	P25	P50	P75	P90	max.
As (III), µg/l	90	28,9%	*	0,050	0,050	0,050	0,050	0,215	0,534	1,260
As (III), µg/g creatinine	90	28,9%	*	0,018	0,025	0,035	0,053	0,145	0,345	1,032
As (V), µg/l	90	61,1%	0,191 (0,150-0,244)	0,050	0,050	0,050	0,255	0,468	0,836	1,640
As (V), µg/g creatinine	90	61,1%	0,153 (0,122-0,192)	0,020	0,034	0,052	0,176	0,321	0,639	1,838
MMA, µg/l	90	85,6%	0,53 (0,43-0,66)	0,05	0,05	0,50	0,74	0,99	1,29	2,99
MMA, µg/g creatinine	90	85,6%	0,45 (0,345-0,50)	0,03	0,12	0,31	0,55	0,73	0,92	1,73
DMA, µg/l	90	100%	3,14 (2,73-3,63)	0,48	1,53	2,10	3,03	4,54	6,02	51,76
DMA, µg/g creatinine	90	100%	2,51 (2,20-2,87)	0,79	1,25	1,64	2,30	3,31	5,62	38,01
arsenobetaïne, µg/l	90	78,9%	1,81 (1,11-2,96)	0,05	0,05	0,29	2,83	10,11	34,03	202,63
arsenobetaïne, µg/g creatinine	90	78,9%	1,45 (0,88-2,37)	0,02	0,04	0,19	2,46	8,47	21,89	450,88
TRA, µg/l	90	-	5,23 (4,62-5,91)	0,63	2,90	3,80	5,15	7,48	9,70	52,54
TRA, µg/g creatinine	90	-	4,32 (3,81-4,89)	0,80	2,26	3,01	3,96	5,97	9,44	38,58
creatinine, mg/dl	90	100%	121,8 (110,0-134,9)	24,5	77,0	94,6	128,7	168,7	225,8	324,5

N: aantal; GM: geometrische gemiddelde; BI: betrouwbaarheidsinterval; P: percentiel; min.: minimum; max.: maximum

\* gemiddelde wordt niet gerapporteerd indien meer dan 50% van metingen onder de LOQ ligt.

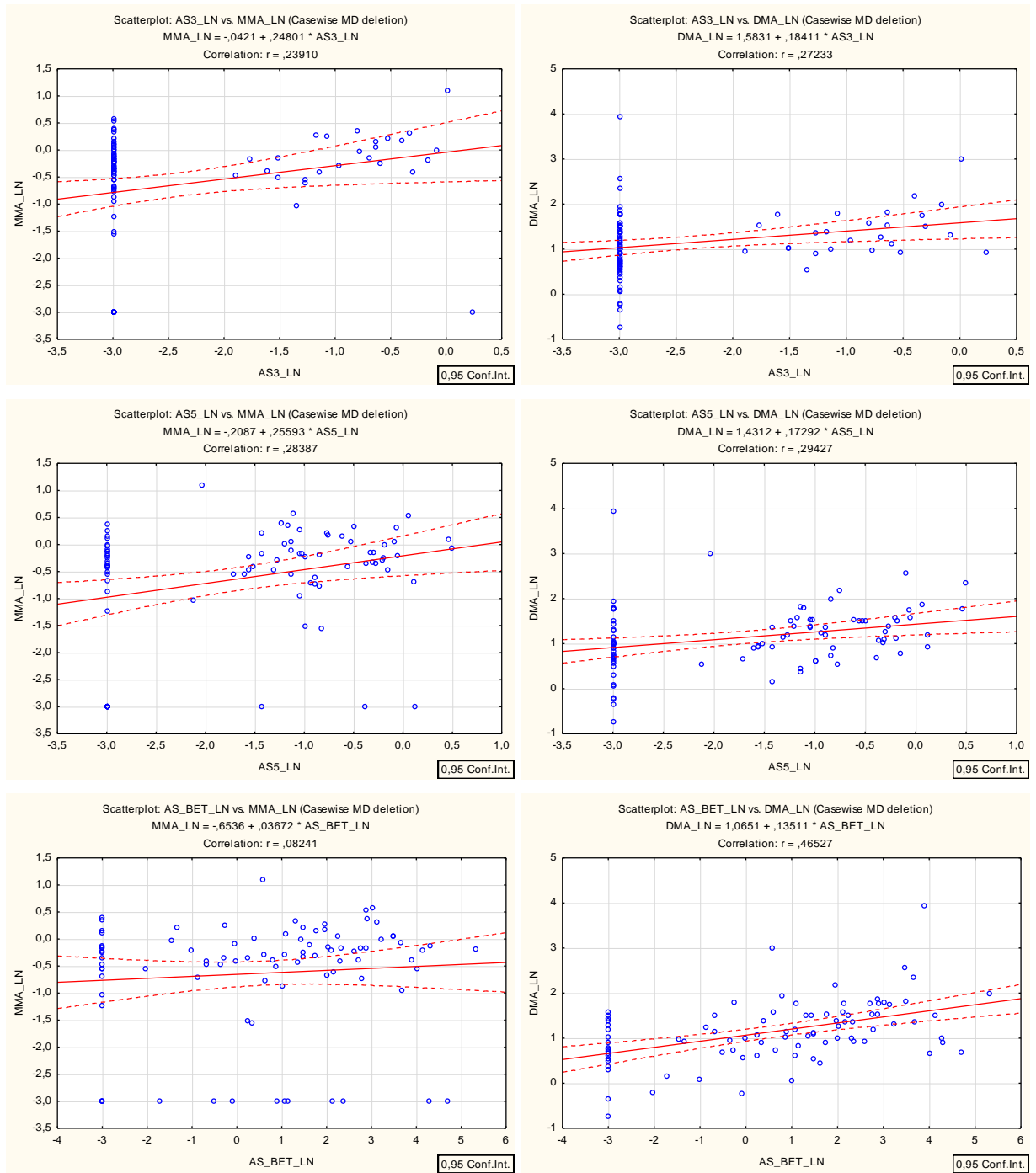
Voor As(III), As(V) en MMA is de range van blootstelling beperkt: de ratio tussen de minimum en maximum blootstelling ligt in de buurt van een factor 20-30. Voor DMA is deze range veel groter, nl. ongeveer een factor 100. Voor arsenobetaine is de ratio tussen de minst en de meest blootgestelde deelnemer meer dan een factor 400. Zowel DMA als arsenobetaine worden sterk beïnvloed door het eten van vis, en deze kan grote individuele variatie vertonen.

De concentratie van de arseenmetabolieten onderling is sterk gecorreleerd. De correlatiematrix wordt gegeven in Tabel 19. TRA is toegevoegd ter informatie maar is in deze context minder belangrijk: aangezien het de som parameter is van vier parameters (As(III), As(V), DMA en MMA), en aangezien MMA en DMA kwantitatief het meest doorwegen in de som, is het logisch dat er een hoog significante ( $p < 0,001$ ) correlatie is zowel tussen TRA en MMA als tussen TRA en DMA.

We zijn vooral geïnteresseerd in de correlatie tussen de vijf aparte arseenmetabolieten onderling. De correlatiematrix geeft ons informatie over gemeenschappelijke bronnen, en gemeenschappelijke routes in het lichaam. Zoals geïllustreerd in Figuur 13 worden As(III) en As(V) in het lichaam omgezet tot MMA en DMA, maar niet tot arsenobetaine. Dit verklaart de positieve en vrij sterke correlatie van As(III) of As(V) met MMA of DMA, maar niet met arsenobetaine. Deze metaboliseroutes zorgen ervoor dat MMA en DMA onderling ook hoog gecorreleerd zijn. Eveneens uit Figuur 13 kunnen we afleiden visconsumptie een bron kan zijn van arsenobetaine en DMA, maar niet (of weinig) van MMA. Dit verklaart de sterke correlatie tussen DMA en arsenobetaine en de minder sterke correlatie tussen MMA en arsenobetaine. Deze relaties worden nog eens visueel voorgesteld in Figuur 16 en geven aan dat MMA sterk gecorreleerd is met de anorganische arseen vormen As(III) en As(V) terwijl DMA sterk gecorreleerd is met anorganische én organische (arsenobetaine) vormen.

Tabel 19: Correlatie matrix tussen arseenmetabolieten (in  $\mu\text{g/l}$ , ln getransformeerd),  $N=90$

	As(III)	As(V)	MMA	DMA	arsenobetaine	TRA
As(III)	$r^2 = 1,00$	$r^2 = 0,17$ ( $p=0,12$ )	$r^2 = 0,24$ ( $p=0,02$ )	$r^2 = 0,27$ ( $p=0,009$ )	$r^2 = 0,10$ ( $p=0,34$ )	$r^2 = 0,24$ ( $p=0,02$ )
As(V)		$r^2 = 1,00$	$r^2 = 0,28$ ( $p=0,007$ )	$r^2 = 0,29$ ( $p=0,005$ )	$r^2 = 0,13$ ( $p=0,21$ )	$r^2 = 0,11$ ( $p=0,28$ )
MMA			$r^2 = 1,00$	$r^2 = 0,49$ ( $p < 0,001$ )	$r^2 = 0,08$ ( $p=0,44$ )	$r^2 = 0,50$ ( $p < 0,001$ )
DMA				$r^2 = 1,00$	$r^2 = 0,47$ ( $p < 0,001$ )	$r^2 = 0,84$ ( $p < 0,001$ )
arsenobetaine					$r^2 = 1,00$	$r^2 = 0,36$ ( $p=0,001$ )
TRA						$r^2 = 1,00$



Figuur 16: Correlatieplots van MMA en DMA met de andere arseenmetabolieten

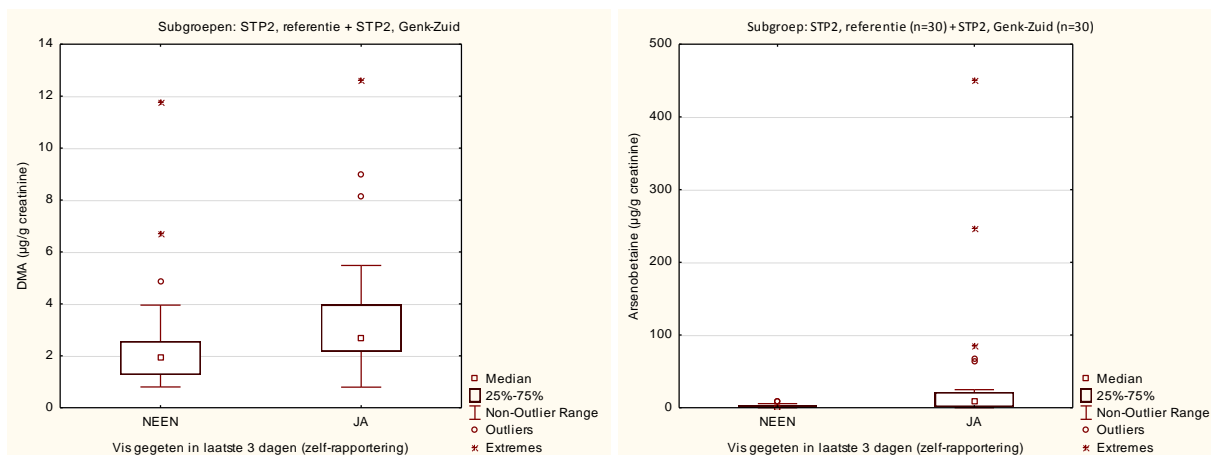
## 4.3.3. DETERMINANTEN VAN ARSEENMETABOLIETEN IN URINE

Op basis van de gegevens van de jongeren van het tweede Steunpunt M&G (n=60) werd nagekeken wat het effect is van recente visconsumptie op de verschillende urinaire arseenmetaboliëten. De vraag naar visconsumptie in de 3 dagen voorafgaand aan de staalafname voor de biomonitoring werd niet gesteld bij de jongeren van het 1<sup>e</sup> Steunpunt; daarom konden deze niet mee worden opgenomen in de analyses.

Van de 60 jongeren waren er 25 die in de voorbije 3 dagen vis of visproducten hadden gegeten. Bij deze groep was de urinaire concentratie van arsenobetaine (in µg/l en µg/g creatinine) en de concentratie van DMA (enkel µg/g creatinine) significant hoger dan bij jongeren die geen vis hadden gegeten (Tabel 20). De grafische weergave van de data wordt gegeven in Figuur 17. Recente visconsumptie had geen invloed op de urinaire concentratie van As(III), As(V), MMA of de som parameter TRA (Tabel 20).

Tabel 20: Vergelijking van arseenmetaboliëten in urine volgens recente visconsumptie

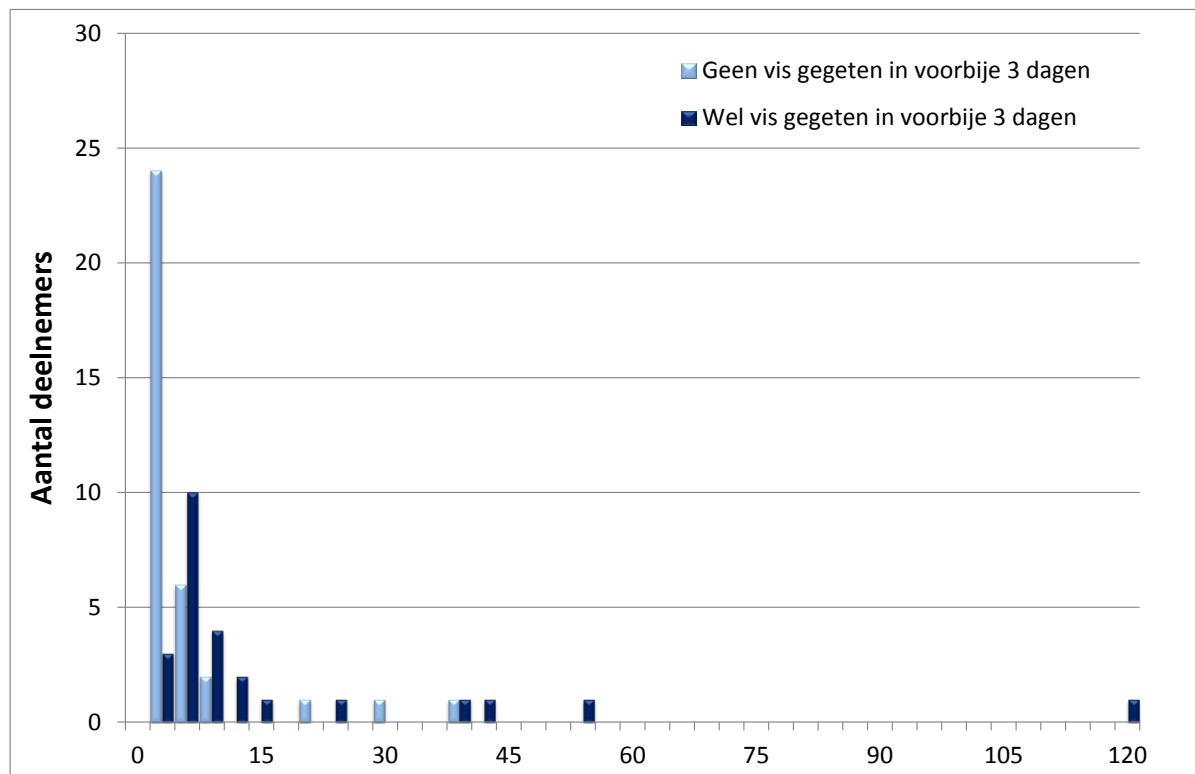
Biomarker	Geen vis gegeten in laatste 3 dagen GM (95% BI) N=35	Vis gegeten in laatste 3 dagen GM (95% BI) N=25	p-waarde
As (III), µg/l	0,118 (0,081-0,172)	0,096 (0,063-0,148)	0,49
As (III), µg/g creatinine	0,085 (0,059-0,121)	0,081 (0,052-0,127)	0,88
As (V), µg/l	0,149 (0,100-0,223)	0,166 (0,102-0,270)	0,74
As (V), µg/g creatinine	0,108 (0,074-0,156)	0,140 (0,090-0,217)	0,36
MMA, µg/l	0,59 (0,41-0,85)	0,44 (0,27-0,70)	0,29
MMA, µg/g creatinine	0,43 (0,32-0,57)	0,37 (0,25-0,53)	0,52
DMA, µg/l	2,84 (2,26-3,58)	3,57 (2,85-4,46)	0,17
DMA, µg/g creatinine	2,05 (1,69-2,49)	3,01 (2,33-3,88)	<b>0,02</b>
arsenobetaine, µg/l	0,63 (0,30-1,30)	6,16 (2,24-16,97)	<b>&lt;0,001</b>
arsenobetaine, µg/g creatinine	0,45 (0,23-0,90)	5,20 (1,78-15,13)	<b>&lt;0,001</b>
TRA, µg/l	5,82 (5,02-6,74)	5,45 (4,35-6,81)	0,60
TRA, µg/g creatinine	4,41 (3,69-5,26)	4,84 (3,66-6,39)	0,55



Figuur 17: Urinair DMA en arsenobetaine (µg/g creatinine) volgens visconsumptie in voorbije 3 dagen bij jongeren van 2<sup>e</sup> Steunpunt M&G (referentie + Genk-Zuid)

Een andere manier om de data te bekijken, is het berekenen van een secundaire methylatie index (SMI), i.e. de ratio van urinair DMA / urinair MMA, zoals voorgesteld door Aylward et al. (2014). In de NHANES studie was deze SMI bij deelnemers met detecteerbare concentraties van arsenobetaine in de urine duidelijk hoger dan bij personen met arsenobetaine onder de detectielimiet.

De SMI in de huidige studie werd berekend voor de deelnemers van het tweede Steunpunt M&G, omdat hier informatie over recente visconsumptie beschikbaar is. Het histogram in Figuur 18 toont dat de SMI index duidelijk hoger is bij viseters dan bij niet-viseters. De gemiddelde SMI (GM en 95% CI) bedroeg 8,18 (5,37-12,45) voor viseters en 4,80 (3,55-6,47) voor niet-viseters; dit verschil was statistisch significant ( $p=0,03$ ).



Figuur 18: Distributie van SMI (ratio DMA / MMA) bij viseters en niet-viseters

Bij de jongeren van het eerste Steunpunt M&G werd de visconsumptie van het laatste jaar bevestigd. Er werd nagevraagd: 'Eet je vis?' Van de 30 jongeren, waren er 9 die aangaven dat ze in het voorbije jaar geen vis hadden gegeten en 21 die antwoordden dat ze wel vis eten. Deze vraag is minder specifiek, aangezien de periode van bevraging (1 jaar) en de periode van meting (arsenenmetabolieten in de urine geven een indicatie voor blootstelling van voorbije dagen) niet helemaal matchen. Toch werden er significante verschillen in de urinaire concentratie van arsenobetaine geobserveerd, nl. 3,56 (1,71-7,39)  $\mu\text{g/g}$  creatinine bij viseters vs. 0,44 (0,07-2,55)  $\mu\text{g/g}$  creatinine bij niet-viseters ( $p=0,01$ ). De urinaire concentratie van de overige arseenmetabolieten was niet significant verschillend tussen de twee subgroepen.

Naast visconsumptie werden andere determinanten nagekeken, nl. leeftijd, geslacht, onderwijstype (ASO/TSO/BSO), urbanisatie (landelijk vs. stedelijk), verkeersblootstelling (>30 minuten per dag in druk verkeer), BMI-klasse. Voor geen enkele van de metabolieten werden er significante verschillen geobserveerd tussen de subgroepen. Merk op dat de totale groep slechts 90

deelnemers omvat, en dat sommige subgroepen dus klein zijn, en dat er bijgevolg weinig power is om verschillen aan te tonen. Er kwam slechts 1 roker voor in de groep van 90, waardoor het effect van roken niet kon worden bestudeerd.

### 4.3.4. GEZONDHEIDSKUNDIGE RICHTLIJNEN

In de eindrapporten van het tweede Steunpunt M&G werd als gezondheidkundige richtlijn de Biomonitoring Equivalent (BE) van 6,4 µg/l gebruikt. Deze BE is afgeleid voor de som van inorganische arseenmetabolieten in urine (iAs, MMA en DMA) en is gebaseerd op de US-EPA's 'Reference Dose' en ATSDR 'Minimal Risk Level' voor risico-evaluatie van de niet-kanker gerelateerde aandoeningen (Hays et al., 2010). In het rapport van Genk-Zuid werd gerapporteerd dat 33,8% van de jongeren uit algemeen Vlaanderen en 64,5% van de deelnemers uit Genk-Zuid een waarde van TRA boven de gezondheidkundige richtlijn van 6,4 µg/l hadden. Deze resultaten zijn mogelijk nog te nuanceren indien de visconsumptie hoog is: indien de deelnemer in de dagen voorafgaand aan het onderzoek veel vis eet, zal ook de niet-toxische fractie van DMA bijdragen tot een verhoging van TRA en dus een overschatting geven van de toxiciteit. Bij de deelnemers van Genk-Zuid werd echter geen hogere visconsumptie vastgesteld dan bij de jongeren uit algemeen Vlaanderen: in Genk-Zuid rapporteerde 75 jongeren (38,1%) dat ze in de drie dagen voorafgaand aan het HBM onderzoek vis hadden gegeten, tegenover 89 jongeren (43,0%) in algemeen Vlaanderen; deze percentages waren niet significant verschillend ( $p=0,31$ ) tussen beide groepen. De hoge proportie deelnemers met een TRA waarde boven de gezondheidkundige richtlijn in Genk-Zuid kon dus niet worden verklaard door de visconsumptie zoals die door de jongeren zelf was gerapporteerd.

Door het meten van de aparte arseenmetabolieten is er extra informatie beschikbaar voor de toxicologische interpretatie.

Op basis van de publicatie van Hays et al. (2010) werd in eerste instantie een herrekening van de BE voor TRA gedaan voor de leeftijdsklasse van 11 tot 16 jaar. Na inbreng van gemiddeld lichaamsgewicht, 24-uur urinair volume en 24-uur creatinine-excretie, wordt de BE van 6,4 µg/l voor volwassenen omgerekend naar een BE van 5,6 µg/l voor jongeren van 11-16 jaar. Vanuit de BE voor TRA is er dan afleiding mogelijk van de richtlijnen voor de andere metabolieten. De BE voor inorganisch arseen (As(III) + As(V)), MMA en DMA kan berekend worden door de BE van TRA te vermenigvuldigen met respectievelijke factor 0,20; 0,25 en 0,55.

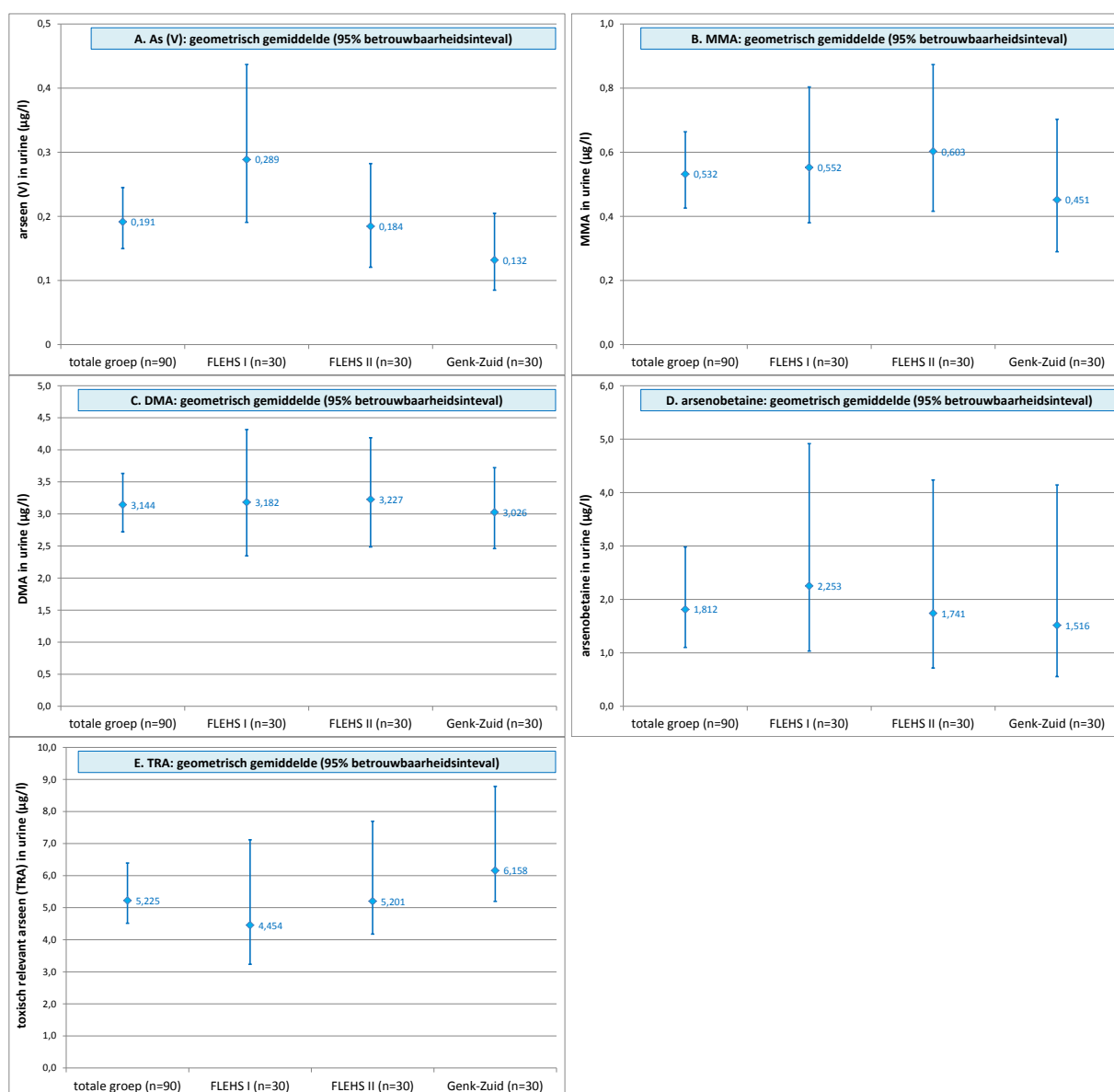
Het percentage deelnemers met een urinaire arseenconcentratie boven de BE wordt gegeven in Tabel 21. Voorzichtigheid bij de interpretatie is geboden omwille van de kleine aantallen: de berekeningen voor de totale groep zijn gebaseerd op 90 deelnemers, maar in iedere subgroep (FLEHS I, FLEHS II en Genk-Zuid) komen slechts 30 jongeren voor (Tabel 21). Bovendien zijn deze 30 deelnemers per gebied geen willekeurige selectie, maar werd een gestuurde selectie gedaan, nl. 10 deelnemers per tertiël van TRA (oude meting).

Toch worden de aparte subgroepen vergeleken met de gezondheidkundige richtlijnen om een betere toxicologische interpretatie toe te laten. Het aantal jongeren met een waarde van toxisch relevant arseen boven de gezondheidkundige richtlijn (5,6 µg/l) was vergelijkbaar in de drie subgroepen, nl. 30% in FLEHS I, 37% in FLEHS II en 33% in Genk-Zuid (Tabel 21). Indien we de cijfers voor de aparte arseenmetabolieten bekijken zien we dat het percentage met jongeren boven de norm voor MMA en DMA vrij goed vergelijkbaar is in de 3 subgroepen, nl. ongeveer 7-10% voor MMA en ongeveer 50% voor DMA. Voor anorganisch arseen, daarentegen, hadden dubbel zo veel jongeren uit de referentiepopulatie van het tweede Steunpunt M&G (FLEHS II) een waarde boven de BE in vergelijking met de jongeren uit Genk-Zuid, nl. 20% vs. 6,7%. Het percentage in Genk-Zuid is vergelijkbaar met dat van de jongeren in het eerste Steunpunt M&G.

Tabel 21: Aantal (%) jongeren met arseenmetabolieten boven gezondheidskundige richtlijn

As metabooliet	BE (11-16 jaar)	Totaal		FLEHS I		FLEHS II		Genk-Zuid	
		N >BE	% >BE	N >BE	% >BE	N >BE	% >BE	N >BE	% >BE
TRA	5,6 µg/l	30	33,3%	9	30,0%	11	36,7%	10	33,3%
MMA	1,4 µg/l	7	7,8%	2	6,7%	3	10,0%	2	6,7%
DMA	3,1 µg/l	43	47,8%	13	46,7%	15	50,0%	14	46,7%
iAs	1,1 µg/l	11	12,2%	3	10,0%	6	20,0%	2	6,7%

iAs = As(III) + As(V)



Figuur 19: Gemiddelde blootstelling voor totale groep en per subgroep: A. As(V); B. MMA; C. DMA; D. arsenobetaine; E. toxisch relevant arseen (TRA, som van As(III), As(V), MMA en DMA)

De gemiddelde waarden van de aparte arseenmetabolieten per subgroep worden gegeven in Figuur 19. De gemiddelde waarde van toxische relevant arseen (TRA) (zie subfiguur E) was hoger in Genk-Zuid, maar dit was niet het geval voor de aparte arseenmetabolieten. Omwille van de kleine

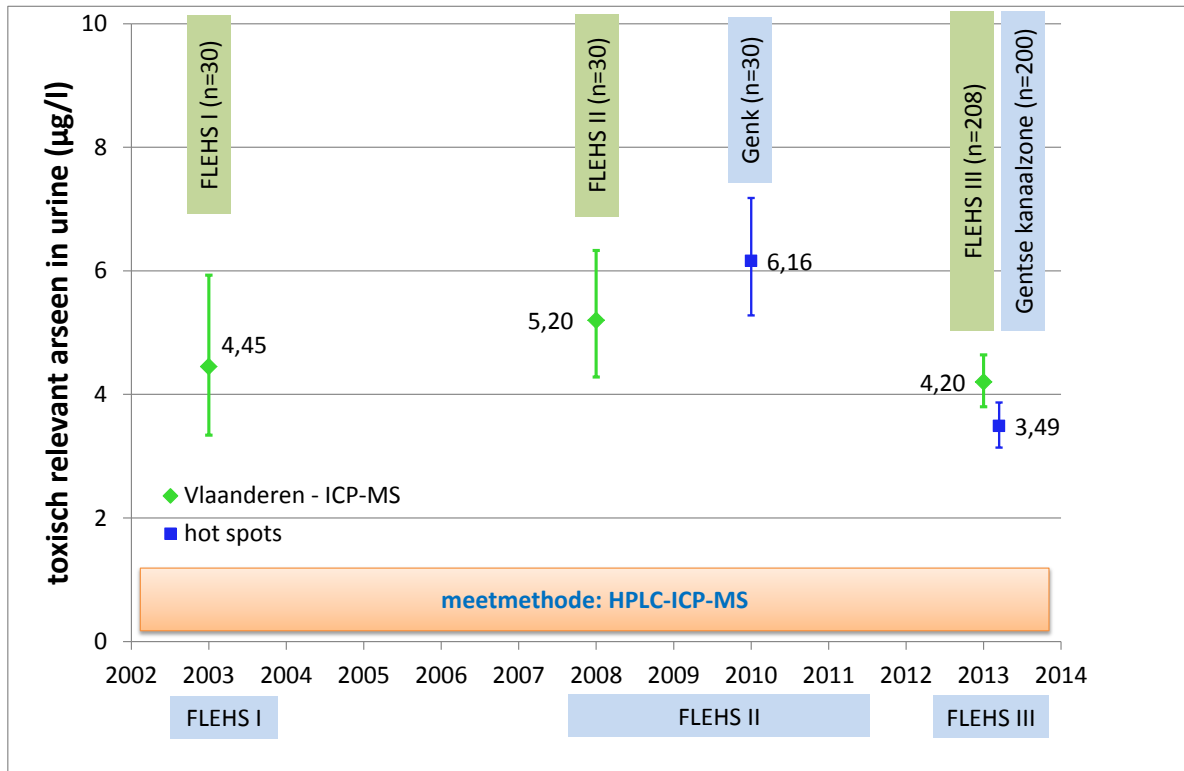
aantallen werd er geen statistische test uitgevoerd om de gemiddelde waarden in de subgroepen te vergelijken.

**Besluit:** De afzonderlijke meting van de arseenmetaboliëten levert belangrijke bijkomende informatie op naar de toxicologische interpretatie van arseen. Deze interpretatie was niet mogelijk op basis van de informatie over visconsumptie vanuit de vragenlijsten.

**4.3.5. TIJDSLIJN**

Binnen dit project werd een nieuwe ontwikkelde methode toegepast om arseenspecië uit te voeren op een selectie van urinestalen uit 3 HBM campagnes uit het verleden, nl. FLEHS I, FLEHS II en de hotspot ‘Genk-Zuid’. Daarnaast was dit project de aanleiding om voor FLEHS III en de hotspot ‘Gentse kanaalzone’ de volledige set van deelnemers (208 in FLEHS III en 200 in GKZ) te meten met de nieuw ontwikkelde methode. Alhoewel er voor FLEHS I en FLEHS II slechts metingen beschikbaar zijn op een fractie van de stalen, kunnen de resultaten toch een indicatie geven voor de tijdstrends. De metingen van toxisch relevant arseen in de referentiepopulaties vertoonden geen duidelijk tijdstrend. De gemiddelde waarde varieerde tussen 4,2 en 5,2 µg/l, maar er was geen lineaire verandering doorheen de tijd.

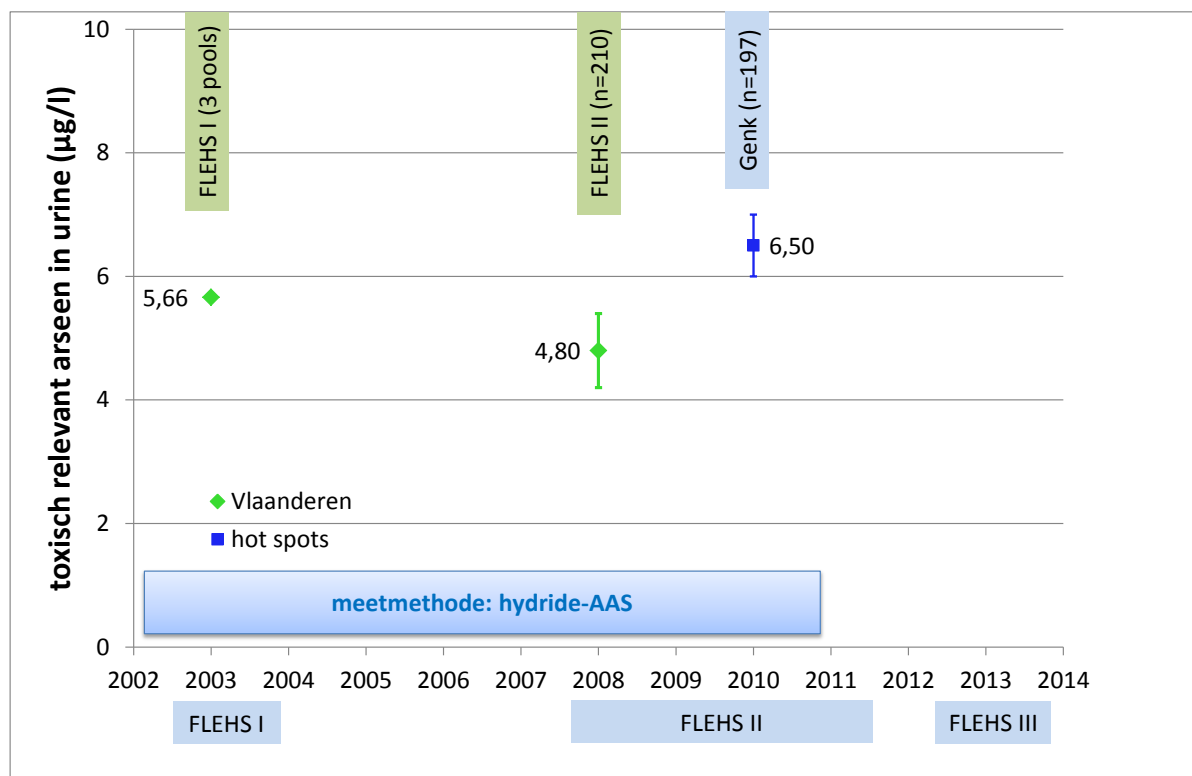
De waarden voor de hotspots zijn duidelijk verschillend: in Genk-Zuid werden hogere gemiddelde waarden (6,2 µ/l) geobserveerd, terwijl in de Gentse kanaalzone geen verhoging werd vastgesteld (3,5 µg/l). De nauwere betrouwbaarheidsintervallen in FLEHS III en de Gentse kanaalzone zijn toe te schrijven aan de grotere aantallen in deze subgroepen.



Figuur 20: Tijdstrends voor toxisch relevant arseen op basis van alle beschikbare metingen met HR-ICP-MS



De 'oude' methode, nl. de hydride-AAS, waarbij de som van toxisch relevant arseen in 1 som parameter wordt bepaald, werd in het verleden ook op verschillende tijdstippen toegepast. Op basis van de stalen van FLEHS I werden poolstalen aangemaakt (1 pool per gebied). Hiervan werden slechts 3 van de 8 pools op de correcte manier gemeten. De metingen in de pools gaven volgende resultaten: 4,72 µg/l in gebied 'Olen'; 5,01 µg/l in gebied 'havens' en 7,27 µg/l in gebied 'Albertkanaal'. De gemiddelde waarde van de 3 pools bedroeg 5,67 µg/l. Daarnaast waren er TRA metingen met hydride-AAS beschikbaar voor de volledige groep van FLEHS II (n=210) en voor alle deelnemers in Genk-Zuid (n=197). De waarden van deze 3 tijdstippen worden weergegeven in Figuur 21. Het is moeilijk om op basis van 2 tijdstippen van referentiepopulatie (FLEHS I en FLEHS II) tijdstrends te definiëren, maar de waarden liggen ook hier weer relatief kort bij elkaar. De verschillen tussen de referentiepopulatie van FLEHS II en de hotspot Genk-Zuid zijn hier meer uitgesproken dan in Figuur 20 omwille van de groteren aantallen, en bijgevolg kleinere betrouwbaarheidsintervallen op het gemiddelde.



Figuur 21: Tijdstrends voor toxisch relevant arseen op basis van beschikbare metingen met hydride-AAS

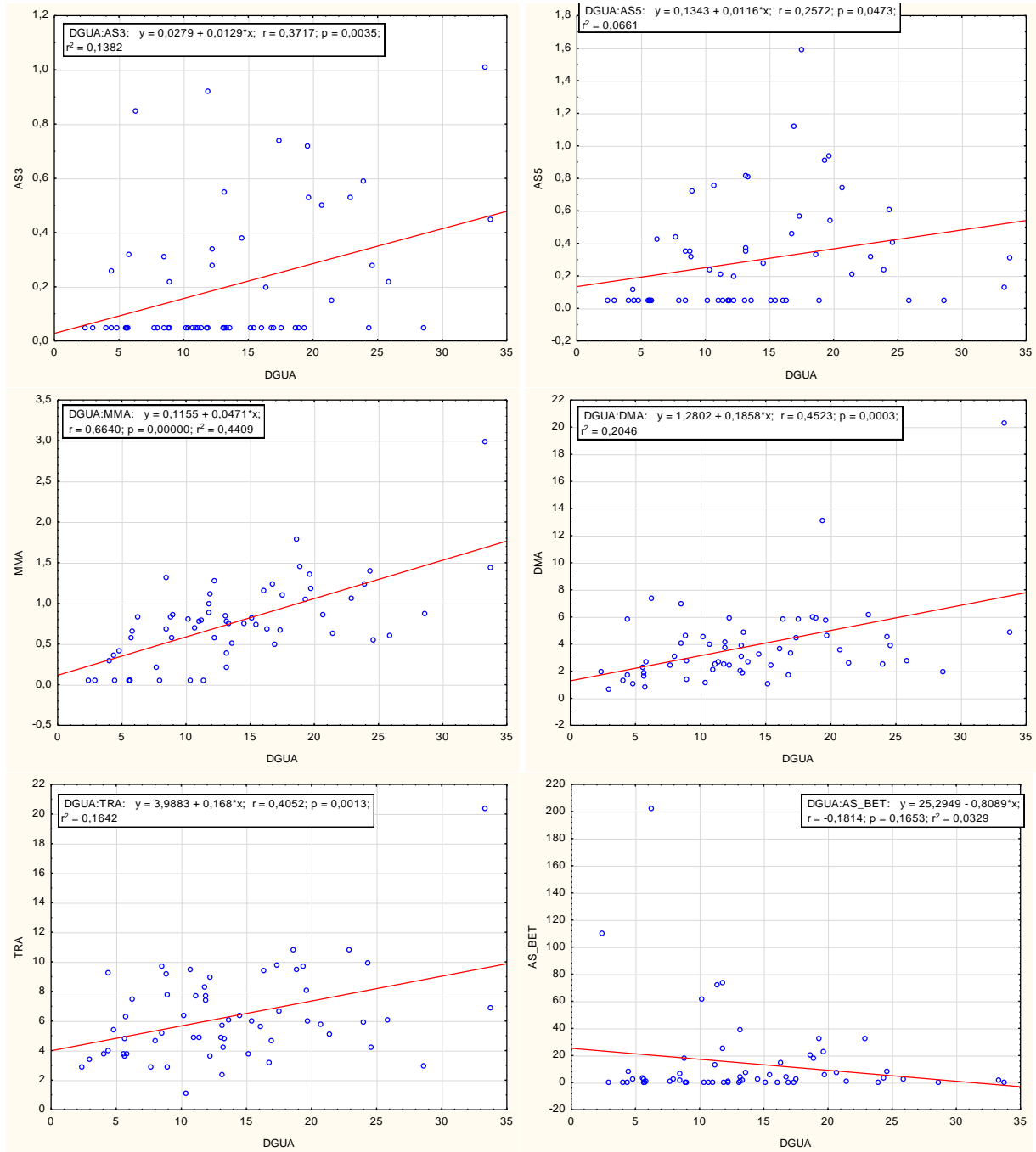
**Besluit:** De metingen van arseenspeciatie door middel van HR-ICP-MS geeft een voorzichtige indicatie voor de tijdstrends. Binnen de Vlaamse referentiepopulaties lijkt er relatief weinig variatie in de blootstelling aan toxisch relevant arseen. Voorzichtigheid is geboden omwille van de kleine aantallen. Meer metingen in de toekomst kunnen dit helpen bevestigen.

#### 4.3.6. BLOOTSTELLING-EFFECTRELATIES

Op basis van de groep van 90 deelnemers werden blootstelling-effectrelaties berekend tussen de verschillende arseenmetabolieten en gezondheidseindpunten. Voor de analyses die apart werden uitgevoerd voor jongens en meisjes (puberteit, leeftijd menarche, geslachtshormonen) dient te worden opgemerkt dat de subgroepen zeer klein waren (47 meisjes en 43 jongens), en dat er

bovendien voor sommige parameters zoals puberteit (CLB data) bovendien ook nog ontbrekende waarden voorkwamen. De power  $p$  voor deze analyses was dus te klein.

Ook de totale groep van 90 deelnemers was relatief klein om associaties tussen arseen en gezondheidseindpunten te bestuderen. Er werden geen verhoogd risico gevonden voor allergieën (astma, hooikoorts, dierallergie of huidallergie) bij hogere arseen blootstelling. Er werden ook geen associaties geobserveerd tussen de arseenmetabolieten en schildklierhormonen, of tussen de arseenmetabolieten en de komeetttest (maat voor DNA-schade).



Figuur 22: Correlatiematrixes tussen verschillende arseenmetabolieten en 8-hydroxy-deoxy-guanosine in urine

Bij de 90 deelnemers uit FLEHS I, FLEHS II en Genk-Zuid werden wel significante associaties gedetecteerd tussen de arseenmetabolieten en 8-hydroxy-deoxyguanosine in de urine (Figuur 22). Deze metaboliet is een maat voor herstelbare DNA-schade op korte termijn. Alle toxische arseenmetabolieten – As(III), As(V), MMA, DMA – evenals de som parameter TRA waren significant en positief geassocieerd met 8-hydroxy-deoxyguanosine. Dit betekent dat hogere blootstelling aan arseen geassocieerd was met meer DNA-schade. De sterkste relatie werd geobserveerd voor de concentratie van MMA in urine ( $R^2=0,44$ ;  $p<0,001$ ). Voor arsenobetaine – de niet-toxische arseenmetaboliet – werd er geen significante relatie gevonden met 8-hydroxy-deoxyguanosine in de urine. Dit suggereert dus dat de toxische metabolieten selectieve informatie kunnen geven over de toxiciteit.

Besluit: de meting van de aparte arseenmetabolieten laat toe om de toxiciteit van de verschillende metabolieten apart te bestuderen.

## HOOFDSTUK 5. BELEIDSRELEVANTE INTERPRETATIE EN CONCLUSIES

---

### 5.1. THALLIUM

In deze studie werden met een gevalideerde methode extra metingen op biobankstalen uitgevoerd van bloed thallium.

In eerste instantie werd de **kwaliteit van de analytische methode** voor het meten van thallium in bloed getest. Dit werd gerealiseerd door nieuwe metingen uit te voeren op reeds eerder gemeten stalen waarvan nog reststaal in de biobank beschikbaar was, en de vergelijking uit te voeren tussen deze gepaarde metingen (n=14). Deze vergelijking was zeer goed. Het gemiddelde verschil tussen de twee metingen bedroeg 0,50% (SD: 15,0%); de gepaarde vergelijking gaf een p-waarde van 0,97. De correlatie-coëfficiënt tussen beide metingen bedroeg 0,73 en de regressielijn lag dicht in de buurt van de lijn van gelijkheid. De Altman-Bland plot toonde geen systematische afwijkingen.

Op basis van deze conclusies werd beslist om nieuwe metingen uit te voeren op 80 biobankstalen van jongeren uit het 1<sup>e</sup> Steunpunt M&G. Tot op heden hadden we nog geen informatie over de concentraties van thallium in de stalen van de periode 2002-2004. Er werden tot nu toe nog geen metingen van thallium uitgevoerd op stalen van het 1<sup>e</sup> Steunpunt M&G: noch in bloed, noch in urine; in geen van de leeftijdsgroepen: pasgeborenen, jongeren, volwassenen. De huidige studie liet dus toe om metingen uit te voeren op biobankstalen van het 1<sup>e</sup> Steunpunt M&G, met een identieke methode als degene die gebruikt werd in 2<sup>e</sup> en 3<sup>e</sup> Steunpunt M&G.

Dankzij deze bijkomende metingen was het mogelijk om een bijkomend tijds punt toe te voegen aan de tijdslijn. De stalen uit 2003 (1<sup>e</sup> Steunpunt M&G), samen met de metingen uitgevoerd in 2008 (2<sup>e</sup> Steunpunt M&G) en de nieuwe data van 2014 (3<sup>e</sup> Steunpunt M&G) maken het mogelijk om **tijdstrends over een periode van 10 jaar** weer te geven voor de blootstelling aan thallium **bij de algemene Vlaamse bevolking**. De variatie in bloed thallium waarden binnen één onderzoeksgroep is vrij klein. Ook de variatie doorheen de tijd is klein. Het geometrische gemiddelde van de drie opeenvolgende Vlaamse HBM campagnes varieert tussen 27,0 en 29,5 ng/l. We kunnen dus stellen dat de achtergrondblootstelling aan thallium bij de algemene Vlaamse bevolking vrij stabiel is, en dat er weinig variatie optreedt in de tijd.

Indien we de **resultaten van de hotspot regio 's 'Genk-Zuid' uit 2010 en 'Menen' uit 2011** kaderen ten opzicht van de nieuw opgestelde tijdstrends binnen Vlaanderen kunnen we een meer genuanceerde evaluatie doen van de blootstelling, en de vastgestelde verhogingen in een bredere kader plaatsen. De conclusies van de campagnes uit Genk-Zuid (2010) en Menen (2011) waren in beide gevallen dat de blootstelling aan thallium bij jongeren in de buurt van het industriegebied significant verhoogd was. Op basis van de bijkomende metingen, kunnen we stellen dat de sterke verhoging van bloed thallium in Menen wordt bevestigd. De conclusie van verhoogde thallium blootstelling in Genk-Zuid blijft geldig aangezien in de eindrapportering van Genk-Zuid een analyse werd uitgevoerd met de best beschikbare referentiepopulatie en er in de statistische analyses maximaal rekening werd gehouden met versturende factoren. Maar in het licht van de historische tijdslijn kunnen we stellen dat de verhoging van bloed thallium in Genk-Zuid eerder beperkt is.

Als **advies naar beleidsmakers** toe zijn er momenteel een aantal argumenten om de humane biomonitoring van thallium in de toekomst nog verder te zetten.

- Op basis van de huidige studie blijkt dat de referentiewaarden bij jongeren in Vlaanderen vrij constant zijn doorheen de tijd. Er is dus geen daling, maar ook geen stijging vast te stellen in de loop van de tijd.
- De waarden die in algemeen Vlaanderen worden gemeten zijn vrij hoog in vergelijking met de waarden uit het buitenland die gerapporteerd worden in de literatuur. Ook de gemiddelde concentraties voor urinair thallium die gemeten werden in de referentiepopulatie jongeren in 2008 (dus niet in dit project) lagen hoog in vergelijking met de literatuur.
- De concentraties van thallium in bloed en/of urine in sommige hotspots zijn verhoogd. Het opvolgen van thallium in specifieke regio's is dus belangrijk. Om deze resultaten goed te kaderen, is het essentieel om referentiewaarden voor algemeen Vlaanderen beschikbaar te hebben.
- Bij de huidige niveaus werden in de Vlaamse populaties significante blootstelling-respons relaties vastgesteld. In de analyses van de resultaten van het 2<sup>e</sup> Steunpunt Milieu en Gezondheid op basis van de gegevens van de Vlaamse referentiepopulatie, Genk-Zuid en Menen samen (n=609) werden effecten van thallium vastgesteld op de puberteitsontwikkeling, schildklierhormonen, voorkomen van allergieën, nierfunctie en op de genotoxiciteitsmarkers bij adolescenten. Bij moeders van de pasgeborenen uit het 2<sup>e</sup> Steunpunt (n=254) werd thallium in bloed in verband gebracht met het voorkomen van allergieën en met vruchtbaarheidsproblemen. Thallium in navelstrengbloed was geassocieerd met effecten op de groei van de baby en met hormoongehalten in het bloed. Dit betekent dus dat er bij de gangbare achtergrondwaarden effecten op de gezondheid worden vastgesteld.
- In de huidige studie werden metingen uitgevoerd van thallium in bloed. De pre-analytische fase is hier heel belangrijk: bloedstalen dienen verzameld en bewaard te worden in metaalvrije tubes, externe contaminatie tijdens de collectie, bewaring en voorbereiding van de stalen moet worden uitgesloten. Bij nieuwe metingen is het belangrijk om een goed protocol op te stellen om voldoende kwaliteit te garanderen.
- Op dit moment zijn er geen internationaal erkende gezondheidkundige richtlijnen beschikbaar voor bloed thallium. Representatieve studies, zoals het humane biomonitoringsonderzoek in Vlaanderen, kunnen een belangrijke bijdrage leveren voor het opstellen van richtlijnen op internationaal niveau
- In Vlaanderen is er een lange traditie van de opvolging van lood en cadmium in de mens. De huidige analytische methode, en de ruime beschikbaarheid van standaarden laat toe om de simultane meting uit te voeren van meerdere metalen in bloed (of urine). Dit kan zonder meerkost naar de analyse toe. Dit is een belangrijk argument bij het opstellen van Vlaamse referentiewaarden: met eenzelfde staalvolume en met eenzelfde budget kunnen meerder metalen worden opgevolgd. Er moet wel rekening worden gehouden met een meerprijs voor de interpretatie van de gegevens.

## 5.2. ARSEEN

Toxisch relevant arseen (TRA) in urine werd in het verleden in de Vlaamse humane biomonitoringsprogramma's als som parameter gemeten. In de algemene Vlaamse bevolking hadden ongeveer 1/3 van de deelnemers een waarde voor TRA boven de gezondheidkundige richtlijn. In hotspot gebieden was dit soms meer dan 50% van de deelnemers.

TRA is de som parameter van anorganisch arseen (As (III) en As (V)) en van MMA en DMA. Er zijn echter indicaties dat een deel van het DMA afkomstig is van vis of zeeproducten en minder toxisch is dan MMA en DMA dat in het lichaam gevormd wordt vanuit iAs. Daardoor is er mogelijk een overschatting van de toxiciteit en een overschatting van de proportie van de bevolking met een blootstelling boven de gezondheidskundige richtlijn. Daarom zou het relevant zijn om de arseenmetabolieten apart te meten en interpreteren.

In deze studie werd een nieuwe methode ontwikkeld en gevalideerd voor het meten van arseenmetabolieten in de urine. Deze methode liet toe om de urinaire concentratie van As(III), As (V), MMA, DMA en arsenobetaine apart te kwantificeren.

De **nieuwe methode (HR-ICP-MS) werd in eerste instantie gevalideerd ten opzichte van de oude meettechniek (hydride-AAS)**. De som parameter van TRA was sterk gecorreleerd tussen beide methoden. De nieuwe methode leidde tot een waarde die gemiddeld 25% lager lag dan de oude waarde, maar de correlatie tussen beide meettechnieken was sterk ( $R^2=0,68$ ) en hoog significant. De resultaten lagen in de buurt van de lijn van gelijkheid, en op basis van de Altman-Bland plot was er geen systematische afwijking. De meting met HR-ICP-MS geeft een belangrijke meerwaarde omdat het informatie geeft over de aparte arseenmetabolieten. Wegens de goede correlatie met de 'oude' methode zijn de waarden ook geschikt om tijdstrends op te volgen, zeker omdat er een overlap is waarbij metingen voor beide methoden beschikbaar zijn.

De resultaten van de vergelijkende studie tussen de twee analytische meetmethoden werden terug gecommuniceerd naar het Steunpunt M&G en hebben geleid tot de beslissing om de metingen van toxisch relevant arseen in de referentiepopulatie jongeren en in de hotspot 'Gentse kanaalzone' uit te voeren volgens de nieuwe methode, nl. met HR-ICP-MS. De argumenten waren de meerwaarde voor de interpretatie dank zij de beschikbaarheid van aparte metabolieten, en de goede correlatie met de oude methode waardoor de tijdslijn kan worden opgevolgd. Een nadeel is de hogere prijs voor de meting (ongeveer dubbel), maar de **kosten-baten is goed** omdat er ook een meerwaarde is voor de interpretatie.

De meting van de aparte metabolieten levert een **meerwaarde naar bronnen en metabolisme** bij de mens. De concentratie van de arseenmetabolieten onderling is sterk gecorreleerd. Op groepsniveau worden positieve en sterke correlaties geobserveerd tussen DMA en arsenobetaine, maar geen sterke correlatie tussen MMA en arsenobetaine. Dit is in overeenstemming met de hypothese dat visconsumptie een bron kan zijn van arsenobetaine en DMA, maar niet (of weinig) van MMA. Verder werd een positieve en significante correlatie gedetecteerd tussen As(III) / As(V) en MMA / DMA, maar niet met arsenobetaine. Dit is in overeenstemming met de kennis over metabolisme: As(III) en As(V) worden in het lichaam omgezet tot MMA en DMA. Arsenobetaine volgt een andere metaboliseroute.

De afzonderlijke meting van de arseenmetabolieten levert belangrijke **bijkomende informatie** op naar de **toxicologische interpretatie** van arseen. Aangezien er voor alle aparte metabolieten gezondheidskundige richtlijnen beschikbaar zijn, is het mogelijk om de aparte metabolieten te evalueren. De resultaten tonen aan dat visconsumptie – met zijn niet-toxische vormen van arseen – soms leidt tot een verhoging van TRA, maar dat dit niet altijd gepaard gaat met een verhoging van de toxische vormen van arseen. Deze interpretatie was niet mogelijk op basis van de informatie over visconsumptie vanuit de vragenlijsten. Het meten van de aparte metabolieten levert dus een meerwaarde naar toxicologische interpretatie. Deze richtlijnen leveren ook nieuwe inzichten bij de interpretatie van de gegevens van Genk-Zuid, maar voorzichtigheid is geboden omdat de aantallen zeer klein zijn. Naar toekomstige hotspots toe waar bezorgdheid is omtrent arseenblootstelling kan wel geadviseerd worden om de metabolieten apart te meten.

Binnen de groep van 90 extra metingen werden **relaties** bestudeerd tussen de aparte arseenmetabolieten en **gezondheidskundige eindpunten** in de populatie. Er werden geen associaties gevonden tussen arseen blootstelling en astma, allergie, puberteit, hormoonconcentraties of de komeetttest. Er werd wel een relatie gevonden met 8-hydroxy-deoxyguanosine in de urine, een merker voor DNA-schade. Alle toxische arseenmetabolieten – As(III), As(V), MMA, DMA – evenals de som parameter TRA waren significant en positief geassocieerd met 8-hydroxy-deoxyguanosine. Dit betekent dat hogere blootstelling aan arseen geassocieerd was met meer DNA-schade. De sterkste relatie werd geobserveerd voor de concentratie van MMA in de urine ( $R^2=0,44$ ;  $p<0,001$ ). Voor arsenobetaine – de niet-toxische arseenmetaboliet – werd er geen significante relatie gevonden met 8-hydroxy-deoxyguanosine in de urine. Dit suggereert dat de toxische metabolieten selectieve informatie kunnen geven over de toxiciteit.

Als **advies naar beleidsmakers** toe zijn er momenteel dus meerdere argumenten om in humane biomonitoringcampagnes, zowel van algemeen Vlaanderen als van hotspots de aparte arseenmetabolieten in urine te meten omdat dit een meerwaarde geeft naar toxicologische interpretatie toe.

### 5.3. ALGEMEEN BESLUIT

In deze studie werd de beschikbare methode voor het meten van **thallium in volboed** gevalideerd en toegepast op biobankstalen. De nieuw uitgevoerde metingen vormen een meerwaarde omdat ze op verschillende vlakken bijkomende informatie opleveren voor de interpretatie van humane biomonitoringstudies: ze laten toe om tijdstrends meer in detail te bestuderen, om resultaten van hotspots beter te kaderen, om relaties tussen blootstelling en gezondheidseffecten te bestuderen, en om de niveaus in Vlaanderen te evalueren ten opzichte van buitenlandse studies. Voor toekomstige biomonitoringstudies zou het een meerwaarde zijn om bloed thallium verder op te volgen. De meting kan simultaan met andere zware metalen gebeuren zonder meerkost; het vereist wel bijkomende interpretatie.

In deze studie werd een nieuwe methode opgesteld voor het meten van de aparte **arseenmetabolieten in urine**, nl. voor As(III), As(V), MMA, DMA en arsenobetaine. Op basis hiervan kan toxisch relevant arseen (TRA) berekend worden. De berekende waarde van TRA werd gevalideerd ten opzichte van de methode die vroeger gebruikt werd om de somparameter TRA te meten (alle metabolieten samen in 1 run). De vergelijking van de twee methoden toont aan dat er een zeer sterke correlatie is tussen beiden metingen maar dat de waarden van de nieuwe methode systematisch lager liggen. Aangezien we voor 1 periode (2008) dubbele metingen beschikbaar hebben, is het mogelijk om tijdstrends op te volgen, en extrapolaties te doen zowel naar het verleden als naar de toekomst.

De interpretatie van de aparte arseenmetabolieten levert informatie over metabolisme in het lichaam, en iedere metaboliet is specifiek gecorreleerd met mogelijke bronnen. De metingen in de urine zijn een meerwaarde ten opzicht van data over visconsumptie op basis van vragenlijstgegevens.

Aangezien er voor de verschillende arseenmetabolieten aparte toxicologische richtlijnen beschikbaar zijn, leveren de afzonderlijke metingen belangrijke informatie voor de interpretatie op gezondheidskundig vlak. Studies in de toekomst moeten uitwijzen of er ook specifieke blootstelling-effect relaties kunnen worden opgesteld op basis van de aparte metingen. Hiervoor zijn de aantallen nu nog te klein ( $n=90$ ).

Voor toekomstige biomonitoringstudies zou het een meerwaarde zijn om arseenmetabolieten in de urine verder op te volgen. De meting betekent een meerprijs ten opzicht van de vroegere methode maar de kosten-baten is goed omdat er ook een meerwaarde is voor de interpretatie.

Een belangrijke randopmerking bij deze studie is dat er voor het eerst op grote schaal werd aangetoond dat **biobankstalen** uit de Vlaamse humane biomonitoringscampagnes zeer nuttig zijn om metingen uit te voeren met bestaande of nieuw ontwikkelde methoden om op deze manier waardevolle informatie te bekomen over tijdstrends, over bronnen en metabolisatie in het lichaam, en over toxische effecten op het lichaam.



## LITERATUURLIJST

- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). (2012). *TLVs and BEIs*.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1992). *Toxicological profile for thallium*.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1998). *Toxicological Profile for Arsenic (Draft)*.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2005). *Toxicological profile for arsenic*.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2007). *Toxicological profile for Arsenic*.
- Aylward LL, Ramasamy S, Hays SM, Schoeny R, Kirman CR. (2014). *Evaluation of urinary speciated arsenic in NHANES: issues in interpretation in the context of potential inorganic arsenic exposure*. Regul Toxicol Pharmacol 69(1):49-54.
- Baeyens W, et al. (2014). *Trace metals in blood and urine of newborn/mother pairs, adolescents and adults of the Flemish population (2007-2011)*. Int J Hyg Environ Health 217(8):878-90.
- Bárány E, et al. (2002). *Trace element levels in whole blood and serum from Swedish adolescents*. Sci Total Environ 286(1-3):129-141.
- Begerow J, Dunemann L, Sur R. (2012). *Arsenic species (As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid)* [Biomonitoring Methods, Vol. 7, 2000]. The MAK Collection for Occupational Health and Safety. p97-117.
- Bierkens J, De Raeymaecker B, Cornelis C, et al. (2006). *Voorstel voor herziening bodemsaneringsnormen voor arseen*. VITO Eindrapport.
- Borgoño JM, Venturino H, Vicent P. (1980). *Clinical and epidemiological study of arsenism in northern Chile*. Rev Med Chile 108:1039-1048. (Spanish).
- Calderón J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, et al. (2001). *Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children*. Environ Res. 85(2):69-76.
- Caldwell KL, Jones RL, Verdon CP, et al. (2009). *Levels of urinary total and speciated arsenic in the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004*. J Expo Sci Environ Epidemiol 19(1):59-68.
- CalEPA (California Environmental Protection Agency). (2008). *Technical Support Document for the Determination of Non cancer Chronic Reference Exposure Levels*.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2014). *National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals – Fourth Report - Updated tables*. <http://www.cdc.gov/exposurereport>
- Cebrián ME, Albores A, Aguilar M, et al. (1983). *Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico*. Hum Toxicol 2:121-133.

Croes K, Vrijens J, Bruckers L, Govarts E, Baeyens W, Van Larebeke N (2012). Vlaams Humaan Biomonitoringsprogramma 2007-2011. Eindrapport dosis-effect relaties adolescenten. Steunpunt Milieu en Gezondheid, november 2012.

Cvjetko P, Cvjetko I, Pavlica M. (2010). *Thallium toxicity in humans*. Arh Hig Rada Toksikol 61(1):111-9.

Dakeishi M, Murata K, Tamura A, Iwata T. (2006). *Relation between benchmark dose and no-observed-adverse-effect level in clinical research: effects of daily alcohol intake on blood pressure in Japanese salesmen*. Risk Anal 26(1):115-123.

Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, Hamilton JW. (2007). *Arsenic as an Endocrine Disruptor: Effects of Arsenic on Estrogen Receptor-Mediated Gene Expression In Vivo and in Cell Culture*. Toxicol. Sci 98(1):75-86.

De Felip E, Bianchi F, Bove C, et al. (2014). *Priority persistent contaminants in people dwelling in critical areas of Campania Region, Italy (SEBIOREC biomonitoring study)*. Sci Total Environ 487:420-435.

Deelstra H, Massart DL, Van Peteghem C. (1996). *Een actiegericht food monitoring programma. Federale Diensten voor Wetenschappelijke, Technische en Culturele aangelegenheden, Impuls Programma: Gezondheidsrisico i.v.m. voeding (1990-1995)*.

DG Health and Consumer Protection. (2004). *Assessment of dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States*. Reports on tasks for scientific cooperation - Task 3.2.11.

ECHA (European Chemicals Agency). (2009). report: Data on manufacture, import, export, uses and releases of: diarsenic trioxide (CAS N° 1327-53-5); diarsenic pentaoxide (CAS N° 1303-28-2); lead hydrogen arsenate (CAS N° 7784-40-9); and triethyl arsenate (CAS N° 15606-95-8), as well as information on potential alternatives to their use. <http://echa.europa.eu>

EFSA (European Food Safety Authority). (2009). *Scientific Opinion on Arsenic in Food*. EFSA Journal 7(10):1351

EPA (Environmental Protection Agency). (1980a). *Ambient water quality criteria for thallium*. EPA-440/5-80-074. NTIS N° PB81-117848.

EPA (Environmental Protection Agency) (1988). *Inorganic arsenicals; Intent to cancel registrations for pesticide products registered for nonwood preservative use; conclusion of special review*. Fed Regist 53(126):24787-24796.

EPA (Environmental Protection Agency) (1999). *Integrated Risk Information System (IRIS) on Arsenic*.

EPA (Environmental Protection Agency). (2000). *Chronic Toxicity Summary: Arsenic and Arsenic Compounds*.

Fréry N, Saoudi A, Garnier R, et al. (2010). *Exposition de la population française aux polluants de l'environnement – Volet environnemental de l'Étude nationale nutrition santé – Premiers résultats*. Saint-Maurice (FR): Institut de veille sanitaire, 12 p. [www.invs.sante.fr](http://www.invs.sante.fr)

German Federal Environmental Agency (2003). *Substance Monograph: arsenic – reference value in urine*. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 46(12):1098-1106.

Goullé JP. et al. (2005). *Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values*. Forensic Sci Int 153(1):39–44.

Govarts E, Bruckers L, Paulussen M, Den Hond E, Koppen G, Sioen I, Nelen V, Van de Mierop E, Uyttendaele M, Covaci A, Vrijens J, Van Larebeke N, Schoeters G (2012). Vlaams Humaan Biomonitoringsprogramma 2007-2011: blootstelling-effectrelaties bij moeder-kind koppels en jong volwassenen. VITO rapport 2012/MRG/R/194.

Grandjean P, Weihe P, Needham LL, et al. (1995). *Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk*. Environ Res 71(1):29-38.

Haque R, Mazumder DN, Samanta S, et al. (2003). *Arsenic in drinking water and skin lesions: Dose-response data from West Bengal, India*. Epidemiology 14(2):174-182.

Harrington JM, Middaugh JP, Morse DL, et al. (1978). *A survey of a population exposed to high concentrations of arsenic in well water in Fairbanks, Alaska*. Am J Epidemiol 108(5):377-385.

Hata A, Yamanaka K, Habib MA, et al. (2012). *Arsenic speciation analysis of urine samples from individuals living in an arsenic-contaminated area in Bangladesh*. Environ Health Prev Med 17(3):235–45.

Hays SM, Aylward LL, Gagné M, et al. (2010). *Biomonitoring equivalents for inorganic arsenic*. Regul Toxicol Pharmacol 58(1):1-9.

Heath A, et al. (1983). *Thallium poisoning--toxin elimination and therapy in three cases*. J Toxicol Clin Toxicol 20(5):451-463.

Heitland P, Köster HD. (2004). *Fast, simple and reliable routine determination of 23 elements in urine by ICP-MS*. J Anal At Spectrom 19:1552-1558.

Heitland P, Köster HD. (2006a). *Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS*. Clin Chim Acta 365(1-2):310-318

Heitland P, Köster HD. (2006b). *Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS*. J Trace Elem Med Biol 20(4):253-262.

Hoet P, Jacquerye C, Deumer G, et al. (2013). *Reference values and upper reference limits for 26 trace elements in the urine of adults living in Belgium*. Clin Chem Lab Med 51:839-849.

Hanlon DP, Ferm VH. (1986). *Concentration and chemical status of arsenic in the blood of pregnant hamsters during critical embryogenesis. I. Subchronic exposure to arsenate utilizing constant rate administration*. Environ Res 40:372-379.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). *Arsenic Compounds*. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2004). *Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 84.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2005). *Overall evaluations of carcinogenicity to humans: As evaluated in IARC Monographs volumes 1-82 (at total of 900 agents, mixtures and exposures)*.

IRIS (Integrated Risk Information System). <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?IRIS>

JECFA. (2006). *Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 1956-2005)*.

KB. (2002). *Koninklijk Besluit van 11 maart 2002 betreffende de bescherming van de gezondheid en de veiligheid van de werknemers tegen de risico's van chemische agentia op het werk. (B.S. 14.3.2002, Ed. 2; erratum: B.S. 26.6.2002, Ed. 2)*

Lauwerys RR, Hoet P. (2001). *Industrial Chemical exposure: guidelines for biological monitoring. Third edition*.

Leese E, Morton J, Tan E, et al. (2014).  $\mu$ LC-ICP-MS determinations of unexposed UK urinary arsenic speciation reference values. *J Anal Toxicol* 38(1):24-30.

Lindgren A, Danielsson BRG, Dencker L, et al. (1984). *Embryotoxicity of arsenite and arsenate: Distribution in pregnant mice and monkeys and effects on embryonic cells in vitro*. *Acta Pharmacol Toxicol* 54:311-320.

Mansilla-Rivera I, Nazario CM, Ramírez-Marrero FA, et al. (2014). *Assessing arsenic exposure from consumption of seafood from Vieques-Puerto Rico: a pilot biomonitoring study using different biomarkers*. *Arch Environ Contam Toxicol* 66(2):162-175.

NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health). <http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>

OSHA (Occupational Safety and Health Administration). <http://www.osha.gov/index.html>

Paschal D, Ting B, Morrow J. (1998). *Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations*. *Environ Res* 76(1):53-59.

Peter AL, Viraraghavan T. (2005). *Thallium: a review of public health and environmental concerns*. *Environ Int* 31(4):493-501.

Pino, A. et al. (2012). *Human biomonitoring for metals in Italian urban adolescents: data from Latium Region*. *Int J Hyg Environ Health* 215(2):185-190.

Radic S, et al. (2009). *Oxidative stress and DNA damage in broad bean (Vicia faba L.) seedlings induced by thallium*. *Environ Toxicol Chem* 28(1):189-196.

Rana SVS. (2014). Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals--a review. *Biol Trace Elem Res* 160(1):1-14.

Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA. (2013). *Genetic toxicology of thallium: a review*. *Drug Chem Toxicol* 36(3):369-383.

Schulz C, et al. (2012). *Reprint of "Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission"*. *Int J Hyg Environ Health* 215(2):150-158.

Schulz C, Angerer J, Ewers U, et al. (2009). *Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German environmental survey on children 2003-2006 (GerES IV)*. *Int J Hyg Environ Health* 212(6):637-647.

Sherlock J, Smart G. (1986). *Thallium in foods and the diet*. *Food Addit Contam* 3(4):363-70.

Southwick JW, Western AE, Beck MM, et al. (1981). *Community health associated with arsenic in drinking water in Millard County, Utah*. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, Health Effects Research Laboratory. EPA600/181064. PB82108374.

Staff JF, Cotton RJ, Warren ND, Morton J. (2014). *Comparison of urinary thallium levels in non-occupationally exposed people and workers*. *Int Arch Occup Environ Health* 87(3):275-284.

Sun G, Xu Y, Li X, et al. (2007). *Urinary arsenic metabolites in children and adults exposed to arsenic in drinking water in Inner Mongolia, China*. *Environ Health Perspect* 115(4):648-652.

Tam GKH, Charbonneau SM, Bryce F, et al. (1979). *Metabolism of inorganic arsenic (74As) in humans following oral ingestion*. *Toxicol Appl Pharmacol* 50:319-322.

Tsai SY, Chou HY, The HW, et al. *The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence*. *Neurotoxicology* 24(4-5):747-753.

Vahter M. (1983). *Metabolism of arsenic*. In: Fowler BA, ed. *Biological and environmental effects of arsenic*. NY: Elsevier Science Publishers, p171-198.

Valentine JL, Reisbord LS, Kang HK, et al. (1985). *Arsenic effects on population health histories*. In: Mills CF, Bremner I, Chesters JK, eds. *Trace elements in man and animals - TEMA 5: Proceedings of the Fifth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux, p289-294.

Van Den Heuvel R, Bayens W, Den Hond E, et al. (2007). *Biomerkermetingen in mengstalen van Vlaams Humaan Biomonitoringsprogramma Milieu & Gezondheid (2002-2006)*. VITO-rapport 2007/TOX/R/022.

Vlaamse Regering. (2002). *Besluit van de Vlaamse regering van 13 december 2002 houdende reglementering inzake de kwaliteit en levering van water bestemd voor menselijke consumptie (BS.28.I.2003)*.

VMM (Vlaamse Milieumaatschappij). (2004). *Luchtkwaliteit in het Vlaamse Gewest, Jaarverslag immisiemeetnetten, kalenderjaar 2003 en Meteorologisch jaar 2003-2004*. 270p.

Vrijens J, et al. (2014). *Trace metal concentrations measured in blood and urine of adolescents in Flanders, Belgium: reference population and case studies Genk-Zuid and Menen*. Int J Hyg Environ Health 217(4-5):515-527.

White MA, Sabbioni E. (1998). *Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. X. A study of 13 elements in blood and urine of a United Kingdom population*. Sci Total Environ 216(3):253-270.

WHO (2000). Air quality guidelines, 2<sup>nd</sup> edition. Chapter 6.1 Arsenic.  
([http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0014/123071/AQG2ndEd\\_6\\_1\\_Arsenic.PDF](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0014/123071/AQG2ndEd_6_1_Arsenic.PDF))

WHO/IPCS (International Programme on Chemical Safety). (2001). *Arsenic and arsenic compounds*. Environmental Health Criteria 224:1-501.

Zaldívar R. (1974). *Arsenic contamination of drinking water and foodstuffs causing endemic chronic poisoning*. Beitr Pathol 151:384-400.