

Grootschalig bloedonderzoek PFAS bij omwonenden van de 3M-site in Zwijndrecht.

Overheidsopdracht met besteknummer
AP/MGZ/2022/Bloedonderzoek PFAS 5km 3M

Deelstudie 2: Validatiestudie capillaire afname



DEPARTEMENT
ZORG

Auteurs: Delahaye Lisa, Bernard Dirk, Demoor Tibo (Eurofins)

Publicatiedatum: 10 november 2023

Studie uitgevoerd in opdracht van het Departement Zorg van de Vlaamse Overheid

Dit rapport bevat de mening van externe auteur(s) en niet noodzakelijk die van de Vlaamse overheid. Het rapport werd voorgelegd aan de stuurgroep van het project. De opmerkingen van de stuurgroep werden in de finale versie van het rapport verwerkt.

Wijze van citeren: Eurofins Forensics Belgium, Eurofins Clinical Diagnostics Kortrijk (2023), Grootschalig bloedonderzoek PFAS bij omwonenden van de 3M-site in Zwijndrecht - Deelstudie 2: Validatiestudie capillaire afname, in opdracht van het Departement Zorg van de Vlaamse Overheid, 15 p.

De appendix met statistische analyses is opvraagbaar via pfasvlaanderen@eurofins.com.

Inhoudstafel

1.	Doel van de studie	4
2.	Rekrutering van de deelnemers van de deelstudie.....	5
3.	Gebruikte stalen en bewaarmethode	5
4.	Analytische methode.....	5
5.	Datacollectie.....	5
6.	Gegevensverwerking en data-analyse	6
6.1.	Beschrijvende statistiek.....	6
6.2.	Vergelijking staaltypes en bepaling van de omrekenfactor	6
6.3.	Sub-analyse PFOA en PFOS (som van lineaire en vertakte vorm).....	7
7.	Resultaten en discussie	7
7.1.	Aantal deelnemers/stalensets.....	7
7.2.	Data-analyse	7
7.3.	Toepassing van de omrekenfactor	10
7.4.	Vergelijking resultaten met eerdere studies.....	10
7.5.	Sub-analyse PFOA en PFOS (som van lineaire en vertakte vorm).....	11
8.	Toekomstperspectief staalafname methode	13
9.	Conclusies.....	14
	Referenties	15

1. Doel van de studie

Dit rapport kadert in een grootschalig bloedonderzoek naar per- en polyfluoralkylstoffen (PFAS) bij omwonenden van de 3M-site in Zwijndrecht. Het Departement Zorg van de Vlaamse overheid, verder Aanbestedende Overheid genoemd, is de opdrachtgever van deze studie. Inwoners binnen een straal van 5 km rond de 3M-site in Zwijndrecht kunnen in deze studie een onderzoek laten uitvoeren naar het gehalte PFAS in hun bloed.

Het onderzoek omvat de bepaling van 16 PFAS-componenten in serum. Hiermee kunnen omwonenden inzicht krijgen in hun persoonlijke blootstelling. Deelnemers vullen ook een vragenlijst in, waarbij resultaten van het bloedonderzoek gekoppeld worden aan de antwoorden uit de vragenlijsten. Hiermee wil de Aanbestedende Overheid onderzoeken of, en zo ja, welke verbanden er zijn met levensstijl- en omgevingsfactoren, alsook met gezondheidseffecten. Tot slot wil de Aanbestedende Overheid deze informatie ook gebruiken om te bekijken of de *no regret*-maatregelen aangescherpt moeten worden en de lokale bevolking te sensibiliseren en motiveren om deze maatregelen op te volgen.

Naast bovengenoemde doelen worden ook twee deelstudies uitgevoerd.

Deelstudie 1 onderzoekt het verband tussen PFAS-waarden bij moeders en hun kind(eren). Op basis van specifieke vragen in de vragenlijst rond zwangerschap, geboorte en borstvoeding zal worden nagegaan of verbanden kunnen worden gelegd met bepaalde blootstellingsroutes.

In Deelstudie 2, waarvan de resultaten in dit rapport worden voorgesteld, wordt geëvalueerd of een capillair volbloed staal bekomen door een vinger- of hielprik kan gebruikt worden als alternatief voor een veneuze serumafname. Deze deelstudie kadert in de wil van de Aanbestedende Overheid om deelnemers aan de studie <12 jaar een minder invasieve afnamemethode voor bepaling van PFAS aan te bieden. De afname van het capillaire bloedstaal gebeurt met behulp van het Mitra[®] microsampling device. Dit device werd eerder al gebruikt voor het meten van PFAS in bloed.^{1,2}

Om resultaten bekomen in capillair volbloed te vergelijken met resultaten bekomen in serum zijn omrekenfactoren nodig. Deze mogelijke omrekening is vooral van belang voor de moleculen perfluorooctaansulfonzuur (PFOS) en perfluorooctaanzuur (PFOA) waarvan de concentraties afgetoetst worden aan de HBM-I en HBM-II gezondheidkundige toetsingswaarden, met het oog op een gezondheidkundige interpretatie van het resultaat en daaraan verbonden te nemen blootstellingsbeperkende maatregelen.^{3,4} In deze deelstudie wordt bekeken voor welke PFAS-componenten een omrekenfactor kan worden gevonden, en wat deze factor desgevallend is. De omrekenfactor kan worden gebruikt om een resultaat bekomen in capillair volbloed om te zetten naar een serumequivalente concentratie. Dit is onder andere nodig omdat toetsingswaarden, zoals bijvoorbeeld de HBM-I en HBM-II waarden, enkel beschikbaar zijn voor metingen in serum (of plasma). Aangezien serum de standaard matrix is voor de bepaling van PFAS, wordt ervoor gekozen de bekomen resultaten uit capillair volbloed om te rekenen naar serumequivalenten, en de toetsingswaarden niet om te rekenen.

Omdat in eerdere onderzoeken werd vastgesteld dat de onderzochte PFAS-moleculen hoofdzakelijk in de serumfase van het bloed aanwezig zijn, werd ook een meting van het hematocriet uitgevoerd op de veneuze volbloed stalen om zo de invloed van het hematocriet op de omrekenfactor te kunnen onderzoeken.

In deze studie werden geen resultaten gekoppeld van de vragenlijst ingevuld door de deelnemers gezien dit niet relevant is voor deze deelstudie. Het geslacht en leeftijd van de deelnemers werden wel gebruikt in de data-analyse van deze deelstudie. Dit onderzoek werd goedgekeurd door het Ethisch Comité van het Universitair Ziekenhuis Antwerpen met nummer 2023-5332 (BUN B3002023000064).

Voorafgaand aan de analyse van stalen uit deze deelstudie werden de methoden analytisch gevalideerd, gebaseerd op de ICH M10 richtlijn voor bioanalytische methodevalidatie.⁵ Hierbij werd

voldaan aan de vooraf gedefinieerde acceptatiecriteria, en zijn de gebruikte methoden aldus geschikt voor het beoogde doel.

2. Rekrutering van de deelnemers van de deelstudie

Aan de volwassen deelnemers (≥ 18 jaar), werd bij aanmelding in het afnamecentrum de kans geboden om vrijwillig deel te nemen aan de validatiestudie door de gift van een extra bloedtube (EDTA-volbloed) en een capillair staal afgenomen via een vingerprik en het Mitra[®] device. Voor deze deelname werd een afzonderlijke geïnformeerde toestemming bekomen. Met het oog op het verzamelen van minimaal 500 bruikbare staalsets, werden een 600-tal deelnemers geïncludeerd in deze validatiestudie.

3. Gebruikte stalen en bewaarmethode

Bij de deelnemers werden volgende stalen afgenomen:

- Veneuze afname:
 - serum tube: BD Vacutainer SST II Advance Plus Blood Collection Tubes (Becton Dickinson and Company, Plymouth, UK)
 - volbloed tube: BD Vacutainer K2E (EDTA) Plus Blood Collection Tubes (Becton Dickinson and Company, Plymouth, UK)
- Capillaire afname:
 - Mitra[®] volumetric microsampling (VAMS) device; 30 μ L (Neoteryx Corporation, Torrance, CA, USA)

Serum en volbloed stalen werden bewaard op kamertemperatuur, tot aan het transport naar het analyserend labo. Daar werden ze verder bewaard bij 4°C tot het nemen van een deelmonster voor de hematocrietbepaling. Nadien werden serum en volbloed verder bewaard bij -20°C tot analyse. Het deelmonster voor bepaling van het hematocriet werd bewaard op kamertemperatuur tot aan de meting van het hematocriet. Capillaire vingerprik stalen werden bewaard op kamertemperatuur tot analyse, in aanwezigheid van silica als droogmiddel.

4. Analytische methode

PFAS-bepaling op serum en volbloed (veneuze afname):

Na toevoeging van isotoop gelabelde analogen als interne standaard wordt een proteïneprecipitatie uitgevoerd met methanol. Nadien wordt het staal gecentrifugeerd. Het supernatans wordt vervolgens geïnjecteerd in de vloeistofchromatograaf met massaspectrometer en geanalyseerd met een gevalideerde methode.

PFAS-bepaling op capillair volbloed (capillaire afname):

Op het capillair volbloed dat werd opgevangen met het Mitra[®] device wordt een extractie uitgevoerd met een 80% methanol-oplossing, waaraan ook isotoop gelabelde analogen als interne standaard werden toegevoegd. Het bekomen staal wordt gecentrifugeerd. Het supernatans wordt vervolgens geïnjecteerd in de vloeistofchromatograaf met massaspectrometer en geanalyseerd met een gevalideerde methode.

Hematocriet (veneuze afname):

Het hematocriet werd binnen 24u na afname op het EDTA-volbloed staal bepaald met een Sysmex XN-1000, Sysmex Corporation, Kobe, Japan.

5. Datacollectie

De dataflow voor de meetwaarden voor de bepaling van PFAS-moleculen op serum, volbloed en capillair volbloed zijn identiek.

- Identificatie deelnemer a.d.h.v. een uniek ordernummer

- Toekenning unieke staalnummers voor elk individueel staal
- Overdracht analytische resultaten van TargetLynx (LC-MS/MS data processing software) naar het laboratorium informaticasysteem (LIS) Glims 9 (Clinisys, Gent)
- De resultaten van de hematocriet metingen werden manueel geregistreerd

De resultaten van de PFAS-metingen op serum werden gerapporteerd aan de deelnemer en door hem aangeduide personen (huisarts en/of preventiewerkers PFAS) op het geïnformeerd toestemmingsformulier. De meetresultaten van de PFAS-metingen op veneus volbloed en het capillaire staal werden uitsluitend gebruikt voor deze validatiestudie en worden niet gecommuniceerd naar de deelnemer. De deelnemer werd hiervan op de hoogte gebracht via het geïnformeerd toestemmingsformulier.

6. Gegevensverwerking en data-analyse

Alle gegevens werden verzameld in het Laboratorium Informatie Systeem (LIS). De gegevens werden geëxtraheerd uit het LIS in een csv-bestand en werden verder geanalyseerd met behulp van MedCalc (MedCalc Software Ltd, versie 22.009). Meetwaarden onder de kwantificatielimiet (LOQ) werden vervangen door de $LOQ/\sqrt{2}$.^{1,6} Alle concentraties zijn uitgedrukt in ng/mL.

Voor elke molecule werd de dataverwerking uitgevoerd zoals beschreven in sectie 6.1 en 6.2.

6.1. Beschrijvende statistiek

Voor elke molecule werd per matrix (serum, veneus volbloed en capillair volbloed) een overzicht gemaakt van het aantal stalen met een concentratie < LOQ, de gemiddelde concentratie, de mediane concentratie, de percentielen 90, 95 en 97,5 en de maximaal gemeten concentratie.

6.2. Vergelijking staaltypes en bepaling van de omrekenfactor

Alle statistische analyses werden uitgevoerd op stalen met een concentratie \geq dan de LOQ van 0,10 ng/mL. Indien meer dan 40 concentraties \geq LOQ gemeten werden voor een component in een matrix-combinatie, werd een 2*2 vergelijkingstabel opgemaakt voor het aantal stalen versus de LOQ in de 2^e matrices. Indien meer dan 40 stalen met meetbare concentraties in vergelijkende matrices werden vastgesteld, werd een verdere analyse uitgevoerd om een omrekenfactor tussen serum en capillair volbloed te bepalen.

Gelet op het feit dat geen normale distributie verondersteld wordt van de meetwaarden van de concentratie in serum, veneus volbloed en capillair volbloed, werd geopteerd voor niet parametrische statistische technieken:

- Passing-Bablok regressie, met weergave van:
 - scatterdiagram en regressievergelijking
 - residuals plot
- Berekening van de mediane ratio tussen 2 matrices
 - serum/veneus volbloed
 - serum/capillair volbloed
 - veneus volbloed/capillair volbloed met weergave van:
 - numeriek overzicht bekomen resultaten
 - boxplot van de bekomen ratio's

In deze deelstudie werd voor de drie staaltypes een onderlinge vergelijking uitgevoerd. De ratio serum/veneus volbloed laat o.a. toe de verdeling van PFAS tussen serum en de rode bloedcellen te bestuderen. Met de ratio veneus volbloed/capillair volbloed wordt bekeken of er verschillen zijn in PFAS-concentraties en in de meetmethode tussen veneus en capillair volbloed. De ratio serum/capillair

volbloed wordt gebruikt om de omrekenfactor te bepalen, die nodig is voor het berekenen van de serumequivalente concentratie bij metingen in vinger- of hielprik bloed.

6.3. Sub-analyse PFOA en PFOS (som van lineaire en vertakte vorm)

Gezien het hematocriet bij volwassen vrouwen in de algemene populatie lager is dan bij volwassen mannen, werd voor de stoffen PFOA en PFOS (totaal van de lineaire en vertakte vorm) een niet-parametrische ANOVA volgens Kruskal-Wallis uitgevoerd. Hierbij werd nagegaan of een omrekenfactor kan bepaald worden per geslacht en of dit bijkomend voordeel heeft ten opzichte van een algemene omrekenfactor.

7. Resultaten en discussie

7.1. Aantal deelnemers/stalensets

In totaal stemden 604 deelnemers in om deel te nemen aan de deelstudie. Eén set stalen diende verworpen te worden wegens stolling van het volbloed staal. Er werden dus 603 bruikbare stalen sets geïnccludeerd in de analyse. Het betrof 293 mannen (49%) en 310 vrouwen (51%). De gemiddelde leeftijd van de vrouwen was 53 jaar (Inter Quartile Range (IQR): 44 – 65 jaar), de gemiddelde leeftijd van de mannen was 56 jaar (IQR: 47 – 67 jaar).

7.2. Data-analyse

Een overzicht van de bekomen parameters is opgenomen in **Tabel 1** t.e.m. **Tabel 3**.

Voor volgende moleculen werden minder dan 40 datakoppels geobserveerd, en werd aldus geen verdere ratio berekend en correlatieanalyse uitgevoerd:

- | | |
|--|-----------------|
| - PFBA | - PFOA vertakt |
| - PFPeA | - PFDoDA |
| - PFHxA | - PFBS |
| - PFHpA (serum/capillair volbloed en veneus volbloed/capillair volbloed) | - PFHxS vertakt |

Voor de vergelijking serum/veneus volbloed bevinden de teruggevonden ratio's zich tussen 1,39 en 1,79 (zie **Tabel 1**). Dit toont aan dat de gemeten componenten zich hoofdzakelijk in de serumfractie van het bloed bevinden. Het 95% betrouwbaarheidsinterval (95% CI) rond elke ratio is nauw, met een maximale breedte van 0,13 voor PFHpA, wat aantoont dat de mediane ratio met voldoende nauwkeurigheid kon worden bepaald.

Voor de vergelijking serum/capillair volbloed bevinden de teruggevonden ratio's zich tussen 1,54 en 2,20 (zie **Tabel 2**). Het 95% CI rond elke ratio is opnieuw nauw, met een maximale breedte van 0,27 voor PFUnDA, wat aantoont dat de mediane ratio met voldoende nauwkeurigheid kon worden bepaald, maar echter wel merkkelijk breder is voor PFUnDA.

Voor de vergelijking veneus volbloed/capillair volbloed worden concentratieratio's teruggevonden tussen 1,13 en 1,27, allen met een nauwe IQR (zie **Tabel 3**).

De teruggevonden ratio's serum/capillair volbloed liggen voor elke molecule hoger dan de ratio serum/veneus volbloed, wat ook wordt bevestigd door de ratio's veneus volbloed/capillair volbloed, die allen hoger zijn dan 1, gaande van 1,13 tot 1,27 (zie **Tabel 3**). Er is voor geen enkele molecule overlap in de 95% CI's van de ratio's tussen serum/veneus volbloed en serum/capillair volbloed, deze zijn dus ook significant verschillend van elkaar, alsook kan het verschil als relevant beschouwd worden.

Een eenduidige verklaring voor het verschil in concentraties teruggevonden in veneus volbloed en capillair volbloed gemeten in deze studie kan niet worden gevonden. Verschillende factoren kunnen bijdragen aan een verschil in teruggevonden waarden:

- Een beperkt verschil in hematocriet (vermoedelijk bepalende factor voor de ratio serum/volbloed) tussen veneus bloed en capillair bloed. Daae et al. beschreven slechts een verschil van 1% hematocriet tussen veneus volbloed en capillair volbloed, wat onvoldoende is om de ratio volbloed/capillair bloed te verklaren.⁶
- Een intrinsiek verschil in concentraties in capillair volbloed en veneus volbloed voor PFAS
- Een bias tussen beide meetmethoden
- Invloed van het anticoagulans aanwezig in het veneuze volbloed (EDTA) op de meting of op de concentratie van PFAS aanwezig in het veneuze volbloed
- Een andere mogelijke variabele is de verschillende bewaartermijn en omstandigheden van de stalen voor analyse. Koponen et al. onderzochten het effect van bewaring bij verschillende omstandigheden van stalen afgenomen met een VAMS *device*.¹ Hierbij werd een verschillend effect per PFAS molecule vastgesteld, wat hen deed adviseren om binnen een studie de bewaarcondities minimaal te variëren.

Het verschil tussen de concentratieratio bekomen in veneus volbloed en capillair volbloed is echter beperkt, en heeft in de praktijk weinig effect op de gezondheidskundige interpretatie van de resultaten. Des te meer daar de omrekenfactoren die zullen worden toegepast bekomen zijn met de analytische methode die ook wordt gebruikt om de stalen te meten in het verder verloop van de studie.

Tabel 1: Vergelijking serum/veneus volbloed – resultaat Passing Bablok regressieanalyse en concentratieratio

Molecule	N	PB inter	PB slope	med R	95% CI med R	IQR
PFBA	21	-	-	-	-	-
PFPeA	0	-	-	-	-	-
PFHxA	0	-	-	-	-	-
PFHpA	47	-0,03	2,00	1,79	1,70 – 1,83	1,62 – 1,90
PFOA Lin	600	-0,06	1,79	1,74	1,71 – 1,76	1,59 – 1,90
PFOA Vert	7	-	-	-	-	-
PFOA Tot	600	-0,06	1,79	1,73	1,71 – 1,76	1,59 – 1,89
PFNA	570	-0,02	1,78	1,71	1,69 – 1,73	1,53 – 1,89
PFDA	405	-0,02	1,69	1,61	1,57 – 1,63	1,41 – 1,80
PFUnDa	188	-0,08	1,90	1,39	1,32 – 1,42	1,19 – 1,59
PFDoDA	0	-	-	-	-	-
PFBS	0	-	-	-	-	-
PFHxS Lin	593	-0,03	1,77	1,73	1,71 – 1,74	1,62 – 1,85
PFHxS Vert	0	-	-	-	-	-
PFHxS Tot	593	-0,03	1,77	1,73	1,71 – 1,74	1,62 – 1,85
PFHpS	391	-0,01	1,81	1,77	1,74 – 1,80	1,60 – 1,92
PFOS Lin	599	-0,04	1,57	1,55	1,53 – 1,57	1,42 – 1,69
PFOS Vert	597	-0,07	1,75	1,68	1,65 – 1,70	1,53 – 1,84
PFOS Tot	599	-0,06	1,61	1,59	1,57 – 1,61	1,47 – 1,72

N: aantal staalkoppels met 2 meetwaarden > LOQ; PB inter: Passing-Bablok regressie snijpunt met de x-as; PB slope: Passing-Bablok regressie richtingscoëfficiënt; med R: mediane ratio; 95% CI: 95% betrouwbaarheidsinterval; IQR: interkwartiel range of P25 en P75 van de ratio

Tabel 2: Vergelijking serum/capillair volbloed – resultaat Passing Bablok regressieanalyse en concentratieratio

Molecule	N	PB inter	PB slope	med R	95% CI med R	IQR
PFBA	17	-	-	-	-	-
PFPeA	0	-	-	-	-	-
PFHxA	0	-	-	-	-	-
PFHpA	25	-	-	-	-	-
PFOA Lin	598	-0,01	2,13	2,12	2,08 - 2,16	1,90 - 2,39
PFOA Vert	4	-	-	-	-	-
PFOA Tot	598	-0,01	2,14	2,12	2,08 - 2,16	1,90 - 2,39
PFNA	535	-0,02	2,20	2,12	2,08 - 2,16	1,88 - 2,41
PFDA	349	-0,07	2,25	1,83	1,77 - 1,90	1,54 - 2,17
PFOUnDa	108	-0,16	2,80	1,54	1,45 - 1,72	1,30 - 2,00
PFOdoDA	0	-	-	-	-	-
PFBS	0	-	-	-	-	-
PFHxS Lin	593	-0,03	2,09	2,04	2,00 - 2,07	1,86 - 2,23
PFHxS Vert	0	-	-	-	-	-
PFHxS Tot	593	-0,03	2,09	2,04	2,00 - 2,07	1,86 - 2,23
PFHpS	319	-0,01	2,25	2,20	2,15 - 2,25	1,95 - 2,48
PFOS Lin	598	-0,02	1,91	1,90	1,87 - 1,92	1,70 - 2,11
PFOS Vert	595	-0,11	2,22	2,06	2,03 - 2,10	1,84 - 2,33
PFOS Tot	598	-0,02	1,97	1,90	1,87 - 1,92	1,70 - 2,11

N: aantal staalkoppels met 2 meetwaarden > LOQ; PB inter: Passing-Bablok regressie snijpunt met de x-as; PB slope: Passing-Bablok regressie richtingscoëfficiënt; med R: mediane ratio; 95% CI: 95% betrouwbaarheidsinterval; IQR: interkwartiel range of P25 en P75 van de ratio

Tabel 3: Vergelijking veneus volbloed/capillair volbloed – resultaat Passing Bablok regressieanalyse en concentratieratio

Molecule	N	PB inter	PB slope	med R	95% CI med R	IQR
PFBA	13	-	-	-	-	-
PFPeA	0	-	-	-	-	-
PFHxA	0	-	-	-	-	-
PFHpA	23	-	-	-	-	-
PFOA Lin	598	0,02	1,22	1,24	1,23 - 1,26	1,12 - 1,38
PFOA Vert	4	-	-	-	-	-
PFOA Tot	598	0,02	1,22	1,24	1,23 - 1,26	1,12 - 1,38
PFNA	533	0,00	1,22	1,24	1,22 - 1,26	1,11 - 1,40
PFDA	332	-0,03	1,29	1,13	1,09 - 1,18	0,95 - 1,31
PFOUnDa	100	-0,05	1,50	1,14	1,09 - 1,21	1,00 - 1,33
PFOdoDA	0	-	-	-	-	-
PFBS	0	-	-	-	-	-
PFHxS Lin	592	-0,01	1,19	1,18	1,17 - 1,19	1,09 - 1,27
PFHxS Vert	0	-	-	-	-	-
PFHxS Tot	592	-0,01	1,19	1,18	1,17 - 1,19	1,09 - 1,27
PFHpS	319	0,00	1,25	1,27	1,25 - 1,29	1,15 - 1,39
PFOS Lin	598	0,01	1,22	1,22	1,21 - 1,25	1,12 - 1,34
PFOS Vert	595	-0,04	1,29	1,24	1,22 - 1,26	1,11 - 1,39
PFOS Tot	598	0,01	1,23	1,24	1,23 - 1,25	1,13 - 1,33

N: aantal staalkoppels met 2 meetwaarden > LOQ; PB inter: Passing-Bablok regressie snijpunt met de x-as; PB slope: Passing-Bablok regressie richtingscoëfficiënt; med R: mediane ratio; 95% CI: 95% betrouwbaarheidsinterval; IQR: interkwartiel range of P25 en P75 van de ratio

7.3. Toepassing van de omrekenfactor

Globaal gezien wordt een spreiding genoteerd (IQR) tot ongeveer 0,5 rond de bekomen mediane ratio serum/capillair volbloed (**Tabel 2**), met uitzondering van PFDA en PFUnDA die een spreiding vertonen tot 0,7 rond de mediane waarde. Voor PFDA blijft de variatie in ratio (95% CI) echter beperkt en aanvaardbaar, en gelijkaardig aan de variatie die wordt opgetekend voor de andere moleculen met een groter aantal meetwaarden alsook een grotere spreiding in concentratierange. Voor PFUnDA wordt ook een groter verschil gezien in de slope bekomen bij de Passing-Bablok regressie en de bekomen mediane ratio, waarbij dit verschil het meest uitgesproken is bij de vergelijking serum/capillair volbloed (zie **Tabel 2**). Voor PFUnDA worden voornamelijk concentraties opgetekend rond de LOQ, die in grote mate de bekomen resultaten voor de regressievergelijking bepalen. Omwille van deze reden wordt ervoor gekozen in deze studie de omrekenfactoren te bepalen op basis van de mediane ratio, en niet op basis van de slope (richtingscoëfficiënt) van de regressievergelijking.

Gezien het beperkter aantal datakoppels voor PFUnDA in vergelijking met de andere moleculen, alsook de lage gemeten concentraties zou voor PFUnDA een uitbreiding van de dataset mogelijks een meer nauwkeurige inschatting van de bekomen ratio geven. Gelet op de detectiegraad in de huidige stalenset, dienen 600 bijkomende personen (300 mannen en 300 vrouwen) geïncludeerd te worden om het aantal vergelijkingspunten te verdubbelen. In tussentijd wordt voorgesteld te werken met de huidige mediane verhouding.

Voor de omrekening van resultaten bekomen in capillaire vingerprik stalen naar serumequivalenten kan de mediane ratio serum/capillair volbloed worden toegepast, zoals voorgesteld in volgende vergelijking:

$$\text{Serumequivalent (ng/mL)} = \text{Gemeten concentratie in capillair volbloed (ng/mL)} \times \text{mediane ratio serum/capillair volbloed}$$

Het gebruik van een mediane conversiefactor voor de omrekening van resultaten bekomen in capillair volbloed naar serum-equivalenten introduceert op individueel niveau een bepaalde bijkomende variatie op de bekomen serumequivalenten t.o.v. een meting in serum. Er wordt echter besloten dat de spreiding op de ratio, zoals gezien in deze studiepopulatie en weerspiegeld door de IQR, aanvaardbaar is voor het beoogde doel, namelijk een inschatting maken van de mate van blootstelling van de studiepopulatie aan bepaalde PFAS en die blootstelling gezondheidskundig kaderen. Op groepsniveau wordt de variatie die wordt geïntroduceerd door toepassing van de omrekenfactor uitgemiddeld, dit in tegenstelling tot de variatie op individueel niveau. Twee belangrijke voorwaarden hiervoor, namelijk toepassing bij een vergelijkbare populatie en een voldoende groot aantal deelnemers, zijn voldaan voor deze studie. Hierdoor kunnen bekomen data op groepsniveau, indien gewenst, gebruikt worden voor verdere data-analyse en vergelijking met eerder bekomen resultaten via de bepaling van PFAS in serum.

In de huidige studieregio lijkt het onmogelijk voldoende datapunten te verzamelen voor PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA vertakt, PFDoDA, PFBS en PFHxS vertakt. Een uitbreiding van het aantal deelnemers in de validatiestudie zoals momenteel voorzien door de Aanbestedende Overheid is weinig zinvol, gelet op de zeer lage detectiefrequentie van deze moleculen. Het uitbreiden of opzetten van een validatiestudie naar een zone met een ander blootstellingsprofiel kan de mogelijkheid scheppen om voor deze PFAS-moleculen ook een omrekenfactor te bepalen. Gezien er tot op heden in Vlaanderen geen regio's gekend zijn met een blootstellingsprofiel specifiek gekenmerkt door deze PFAS-moleculen, is dit in de praktijk momenteel echter niet haalbaar.

7.4. Vergelijking resultaten met eerdere studies

De wisselende concentratieratio's voor de verschillende PFAS binnen 1 vergelijking worden ook in andere studies vastgesteld.^{2,7,8} De absolute waarde van de ratio's is verschillend van studie tot studie.

Dit kan mede verklaard worden door verschillen in de opzet van de studies en de uitgevoerde statistische analyse.

- Zo werd de capillaire afname in onze studie uitgevoerd door een zorgprofessional en werden de capillaire stalen in de studie van Carrignan et al. door de deelnemers zelf afgenomen (*self sampling*).² Hoewel het Mitra[®] device speciaal ontworpen werd om de variabiliteit bij de staalcollectie te reduceren, is het niet uitgesloten dat zorgprofessionals anders omgaan met een VAMS-staalafname dan ongetrainde studiedeelnemers.
- Daarnaast is de pre-analytische staalbehandeling sterk verschillend van studie tot studie. In deze studie werden de stalen op kamertemperatuur bewaard in de periode tussen afname en aankomst in het labo. In de studie van Carrignan et al. werden volbloed stalen onmiddellijk op ijs bewaard en werd het serum na 1 uur stolling ook eveneens op ijs bewaard tot verdere verwerking.² Het is niet uitgesloten dat deze koeling een invloed kan hebben op de individuele distributie en redistributie van de bestudeerde moleculen tussen de serum/plasma fractie van het bloed en de rode bloedcel.

De resultaten uit deze studie alsook deze van andere onderzoeksgroepen tonen duidelijk aan dat de verschillende PFAS moleculen mogelijks een licht verschillende distributie hebben tussen serum en de rode bloedcel, waarbij verschillende factoren hiertoe kunnen bijdragen, b.v. verschillen in staalafnametechniek, pre-analytische staalbehandeling zoals mate en duur van koeling en type anticoagulans. Daarnaast kunnen nog niet bekende fysiologische parameters een rol spelen.

De hogere ratio voor de verhouding serum/capillair volbloed dan voor de verhouding serum/veneus volbloed wordt ook geobserveerd in de studie van Carrignan et al. voor sommige componenten, hoewel ook hier de studieopzet op bepaalde punten verschillend is van de huidige studieopzet, en de data dus niet 1 op 1 te vergelijken zijn.² Bovendien is ook het aantal componenten waarvoor een ratio werd bekomen beperkter, waardoor niet voor elke molecule de vergelijking met eerdere studies kan worden gemaakt.

Globaal gezien liggen in deze studie de ratio's voor de verschillende moleculen in dezelfde orde van grootte per vergelijking en is het onderling verschil beperkt. Hierop is PFUnDA een uitzondering, en ligt de verhouding voor zowel serum/veneus volbloed als serum/capillair volbloed lager dan deze van de andere moleculen. Poothong et al. observeerden een gelijkaardig fenomeen voor PFDoDA, waarbij de verhouding serum/capillair volbloed voor PFDoDA lager was dan voor de andere bepaalde moleculen.⁷ Beide studies tonen aan dat een zekere variatie in bekomen omrekenfactoren aanwezig is, hoewel hier niet steeds een eenduidige verklaring voor gevonden kan worden op basis van de fysicochemische eigenschappen van de PFAS-moleculen in de studie.

De bepaling van de omrekenfactor werd uitgevoerd in volwassen personen, daar waar de toepassing voornamelijk bij kinderen jonger dan 12 jaar zal liggen. Er zijn, voor zover gekend, geen redenen om aan te nemen dat deze factoren verschillend zouden zijn bij volwassenen en kinderen. Voor zeer jonge kinderen (< 2 jaar) zal in plaats van een vingerprik een hielprik worden uitgevoerd. Ook daar is er geen reden om aan te nemen dat de omrekenfactor niet zou kunnen worden toegepast, aangezien er fysiologisch geen relevante verschillen zijn tussen bloed bekomen via hielprik of vingerprik, indien beide worden afgenomen van een prikplaats met goed doorbloed vaatbed.

7.5. Sub-analyse PFOA en PFOS (som van lineaire en vertakte vorm)

Gelet op het grote aantal datapunten voor deze moleculen en de mogelijke invloed van het hematocriet dat geslachtsafhankelijk is, werd besloten tot een bijkomende data-analyse uit te voeren. Hierbij werd gekeken naar de mogelijkheid en het nut om een geslachtsafhankelijke ratio serum/capillair volbloed te berekenen voor PFOA en PFOS (som van lineaire en vertakte vormen), de twee componenten waarvoor gezondheidkundige toetsingswaarden bestaan (HBM I en II). Deze

toetsingswaarden zijn van belang voor een gezondheidkundige interpretatie van het resultaat, zowel op individueel- als op groepsniveau.

In deze analyse werden 2 maal 291 mannelijke stalen en 307 vrouwelijke stalen geïncubeerd met een concentratie boven de LOQ. Mede dankzij het grote aantal stalen kon met een $P < 0,000001$ aangetoond worden dat de ratio bij de man hoger is dan bij de vrouw, wat vermoedelijk het verschil in hematocriet op populatieniveau weerspiegelt (niet parametrische ANOVA volgens Kruskal en Wallis). Het verschil in hematocriet bij de deelnemers van deze deelstudie werd ook onderzocht, en gekaderd ten opzichte van de bekomen mediane ratio per geslacht.

Tabel 4: Mediane ratio en interkwartiel range (IQR) serum/capillair bloed voor PFOS (som lineaire en vertakte vorm) en PFOA (som lineaire en vertakte vorm).

	N	PFOS (som lineaire en vertakte vorm)		PFOA (som lineaire en vertakte vorm)	
		Mediane ratio	IQR	Mediane ratio	IQR
Man	291	2,04	1,88 – 2,28	2,24	2,03 – 2,52
Vrouw	307	1,85	1,67 – 2,05	2,01	1,84 – 2,26

N: aantal staalkoppels met 2 meetwaarden > LOQ; IQR: interkwartiel range of P25 en P75 van de ratio

Het hematocriet in de huidige studiepopulatie (mediaan, P5 – P95) bedraagt:

- man: 0,46 (0,40 – 0,53)
- vrouw: 0,42 (0,37 – 0,48)

Bij ANOVA-analyse werd zoals fysiologisch verwacht een statistisch significant verschil in hematocriet gevonden tussen beide geslachten ($P < 0,001$). De relatieve verhouding tussen de ratio's voor mannen en vrouwen bedraagt 1,10 voor PFOS (som lineaire en vertakte vorm), 1,11 voor PFOA (som lineaire en vertakte vorm). De verhouding tussen het hematocriet van mannen en vrouwen bedraagt 1,09. Dit is een sterke aanwijzing dat het verschil in factor tussen mannen en vrouwen bepaald wordt door het verschil in hematocriet.

Dit verschil in ratio per geslacht werd ook reeds bestudeerd door Ehresman et al.⁸ Gezien deze studie slechts een zeer beperkt aantal deelnemers kende (18), was men niet in staat verschillen in ratio aan te tonen in functie van het geslacht. Bij onze kennis zijn deze gegevens de eerste gegevens die aantonen dat concentratieratio's significant verschillend zijn tussen mannen en vrouwen ($P < 0,000001$ bij Kruskal-Wallis analyse). In de dagelijkse klinische praktijk wordt evenwel geen gebruik gemaakt van geslachtsafhankelijke factoren om capillaire analyses om te rekenen naar serum/plasma equivalent. Zo wordt voor de bepaling van glucose op capillair bloed dezelfde factor gebruikt bij mannen en vrouwen voor de omrekening van de capillaire waarden naar serum, en dit in overeenstemming met de richtlijn van de International Federation of Clinical Chemistry.⁹ Daarnaast dient vermeld te worden dat voor het hematocriet de impact van het geslacht slechts speelt vanaf de leeftijd van 14 jaar en de capillaire afname in dit grootschalig bloedonderzoek bedoeld is voor deelnemers jonger dan 12 jaar.¹⁰

Het gemeten hematocriet van de veneuze volbloed stalen laat toe verdere analyse te doen van de bekomen dataset, indien diepgaander onderzoek gewenst zou zijn. Het hematocriet speelt vermoedelijk een cruciale rol in de omrekenfactor tussen serum en (capillair) volbloed, waarbij verdere data-analyse deze veronderstelling verder zou kunnen ondersteunen. Op deze manier zou bijkomend onderzocht kunnen worden of na in rekening brengen van het hematocriet nog verdere factoren moeten worden gezocht, die bijdragen tot de variatie die wordt gezien in de ratio tussen (capillair) volbloed en serum. Verder zou ook kunnen worden nagegaan of de invloed van het hematocriet voor elke molecule speelt in dezelfde mate, en of dit kan worden gerelateerd aan bepaalde chemische eigenschappen van de verschillende PFAS. Dit onderzoek heeft evenwel geen invloed op het praktisch verder verloop van de huidige studie.

8. Toekomstperspectief staalafname methode

Voor deze studie

In het kader van het verder verloop van de huidige studie wordt een verdere afname van serum via veneuze bloedafname voor volwassenen (≥ 12 j) aanbevolen. De belangrijkste factor hiervoor is de maximale vergelijkbaarheid van de bekomen data met ander (bevolkings)onderzoek rond PFAS wereldwijd. Op individueel niveau biedt dit ook de mogelijkheid de bekomen resultaten voor PFOS en PFOA te toetsen aan de HBM-I en II- toetsingswaarden, bepaald op de referentiematrix serum.

Het aantal vergelijkingspunten voor PFUnDA voor de bepaling van een omrekenfactor naar serum is actueel vrij beperkt ($N = 108$). Om een statistisch robuuste factor te bepalen is een uitbreiding van de validatiestudie aangewezen. Gelet op de detectiegraad in de huidige stalenset, dienen 600 bijkomende personen (300 mannen en 300 vrouwen) geïnccludeerd te worden om het aantal vergelijkingspunten te verdubbelen.

Voor kinderen (< 12 jaar) wordt aanbevolen de deelname aan het grootschalig bloedonderzoek te laten verlopen via een capillaire staalafname met vinger- of hielprik. In doelgroepen, zoals kinderen, waar een veneuze staalafname moeilijker realiseerbaar is, biedt het gebruik van de capillaire staalafname potentiële voordelen, die sterker doorwegen dan de beperkingen verbonden aan de staalafnametechniek. De achterliggende redenering is dat de gemakkelijkere afname leidt tot een lagere psychologische weerstand tegen staalafname en zo tot een hogere participatiegraad aan populatiestudies en hierdoor tot een meer volledig beeld van de PFAS-contaminatie van de bestudeerde populatie. Aangezien op dit moment voor de meest prevalentie PFAS een omrekenfactor kon worden bepaald, is het voor de deelnemer mogelijk zijn resultaten voor PFOS en PFOA te toetsen aan de bestaande HBM-I en HBM-II toetsingswaarden, mits een omrekening van capillair volbloed naar een serumequivalent. Op groepsniveau kan het omrekenen van resultaten bekomen in capillair volbloed naar een serumequivalent o.a. toelaten resultaten te vergelijken met resultaten van eerdere onderzoeken uitgevoerd in serum.

Voor toekomstig onderzoek

De resultaten van deze studie bevestigen dat capillaire volbloed stalen, afgenomen met behulp van een VAMS-device, een geschikt alternatief zijn voor een veneuze bloedafname voor de bepaling van PFAS. Op die manier kunnen ook doelgroepen beter worden bereikt die met een veneuze staalafname voor analyse van serum, de referentiematrix, moeilijker te includeren zijn. De mogelijke voordelen, nadelen en opportuniteiten van een veralgemeend gebruik van capillaire vingerprikstalen dienen zorgzaam afgewogen te worden:

- Een staalafname via vingerprik heeft als belangrijkste voordeel de potentieel hogere participatiegraad aan grootschalig onderzoek. Zowel voor doelgroepen voor wie een veneuze afname niet aangewezen is, bijvoorbeeld kinderen of andere kwetsbare groepen, als moeilijker bereikbare deelnemers.
- Gezien de aard van de staalafname kan het overstappen naar capillair volbloed via vingerprik ook logistieke voordelen bieden bij het opzetten van grootschalig bloedonderzoek, en op die manier toelaten een substantieel grotere dataset te bekomen ten opzichte van een veneuze bloedafname. Het nadeel van de capillaire staalafname zijn de verminderde detectie van PFAS in bloed ten opzichte van serum bij zeer lage concentraties omwille van de serum/bloed concentratieratio (± 2 maal lager in bloed), aangezien beide methode dezelfde LOQ hanteren.
- Op niveau van de deelnemer kan de introductie van een omrekenfactor leiden tot een minder nauwkeurige interpretatie van waarden rond een toetsingswaarde.
- Daarenboven is het (nog) niet mogelijk om voor alle PFAS-moleculen een omrekenfactor te bepalen, waardoor bekomen data moeilijker vergelijkbaar zijn met eerder onderzoek naar PFAS, voornamelijk uitgevoerd op serum.

9. Conclusies

- Het toepassen van een universele omrekenfactor toepasbaar voor alle PFAS-moleculen in dit onderzoek is niet aangewezen gelet op de wisselende mediane ratio's per molecule.

- Voor volgende parameters kan een omrekenfactor serum/capillair volbloed voorgesteld worden op basis van de mediane ratio:

PFOA lineair:	2,12	PFHxS lineair:	2,04	PFOS vertakt:	2,06
PFOA som:	2,12	PFHxS som:	2,04	PFOS som:	1,90
PFNA:	2,12	PFHPS:	2,20		
PFDA:	1,83	PFOS lineair:	1,90		

We stellen voor om de PFAS waarvoor een omrekening toegepast wordt dubbel te rapporteren naar de deelnemer, nl. een capillaire volbloed concentratie en een serumequivalente concentratie. Voor de PFAS-componenten waarvoor geen omrekeningsfactor werd berekend, stellen we voor om enkel de PFAS-concentratie bekomen door analyse van capillair volbloed te rapporteren.

- Voor PFUnDA stellen de auteurs voor om de dataverzameling uit te breiden om zo het onzekerheidsinterval op de bekomen ratio te verkleinen en de huidig bekomen factor verder te bevestigen. Voor het verder verloop van de studie kan als omrekenfactor de huidig bekomen mediane ratio worden gebruikt.

PFUnDA: 1,54

- Voor de volgende moleculen was het niet mogelijk een omrekenfactor serum/capillair volbloed te bepalen wegens het zeer beperkt voorkomen van deze moleculen in de bestudeerde populatie:

PFBA	PFOA vertakt
PFPeA	PFDoDA
PFHxA	PFBS
PFHpA	PFHxS vertakt

Gelet op de lage prevalentie is een uitbreiding van de validatiestudie voor deze PFAS-moleculen in de huidig bepaalde regio niet zinvol.

- Naar analogie van andere routine biochemische bepalingen op capillair bloed, wordt de introductie van een geslachtsafhankelijke omrekenfactor niet aangeraden.
- Actueel zijn de gegevens verzameld in andere humane biomonitoringstudies en de toetsingswaarden HBM-I en II- bepaald op serum. Voor een maximale vergelijkbaarheid stellen we het maximaal gebruik van serum als meetmatrix voor, voor het verdere verloop van de huidige studie, bij volwassenen (≥ 12 jaar).
- Voor de opstart van de staalafnames bij de kinderen (< 12 jaar) in deze studie kan het gebruik van capillaire stalen toegepast worden op basis van deze validatie en met kennis van de vermelde beperkingen.

Referenties

1. Novel volumetric adsorptive microsampling technique for determination of perfluorinated compounds in blood. Koponen J, Rudge J, Kushon S, Kiviranta H. *Analytical Biochemistry* 2018; 545: 49-53.
2. Self-collection blood test for PFASs: comparing volumetric microsamplers with a traditional serum approach. Carignan CC, Bauer RA, Patterson A, Phomsopha T, Redma E, Stapleton HM, Higgins CP. *Environ Sci Technol*. 2023; 57:7950-7.
3. Human Biomonitoring (HBM)-I values for perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) - Description, derivation and discussion. Hölzer J, Lilienthal H, Schümann M. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;121:104862.
4. Human biomonitoring (HBM)-II values for perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) - Description, derivation and discussion. Schümann M, Lilienthal H, Hölzer J. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;121:104868.
5. Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis: M10. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Adopted May 24, 2022. https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf
6. A comparison between haematological parameters in 'capillary' and venous blood from healthy adults. Daae LNW, Halvorsen S, Mathisen PM and Mironska K. *Scan J Clin Lab Invest* 1988; 48:723-6.
7. Distribution of novel and well-known poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) in human serum, plasma and whole blood. Poothong S, Thomsen C, Padilla-Sanchez JA, Papadopoulou E and Haug LS. *Environ Sci Technol* 2017; 51: 133888-96.
8. Comparison of human whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals. Ehresman DJ, Froehlich JW, Olsen GW, Chang SC, Butenhoff JL. *Environ Res*. 2007 Feb;103(2):176-84.
9. Recommendation on reporting results for blood glucose (from an IFCC stage I document) IFCC scientific division working group on selective electrodes. Fogh-Andersen N, D'Orazio P, Kuwa K, Kùlpmann WR, Mager G and Larsson L. *eJIFCC* 2000; 12:114-6.
10. Rifai N, Chiu RWK, Young I, Burnham C-A D, Wittwer CT. 2023. *Tietz Textbook of Laboratory Medicine*, 7th ed. St. Louis, Missouri, USA; Appendix A, table A.4

Dankwoord

De auteurs wensen de deelnemers te bedanken voor hun bijdrage aan deze studie. De leden van de stuurgroep worden bedankt voor de review van dit werk. Mevr. Els Bauwens wordt bedankt voor de actieve ondersteuning aan de data-analyse.

Lijst van afkortingen

IQR: inter quartile range (P25 – P75), **LIS:** Lab informatie systeem, **LOQ:** Kwantificatielimiet, **PFAS:** Per- en polyfluoralkylstoffen, **PFBA:** Perfluorbutaanzuur, **PFBS:** Perfluorbutaansulfonzuur, **PFDA:** Perfluordecaanzuur, **PFDoDA:** Perfluordodecaanzuur, **PFHpA:** Perfluorheptaanzuur, **PFHps:** Perfluorheptaansulfonzuur, **PFHxA:** Perfluorhexaanzuur, **PFHxS** Perfluorhexaansulfonzuur, **PFNA:** Perfluornonaanzuur, **PFOA:** Perfluorocetaanzuur, **PFOS:** Perfluorocetaansulfonzuur, **PFPeA:** Perfluorpentaanzuur, **PFUnDA:** Perfluorundecaanzuur, **VAMS:** Volumetric adsorptive microsampling