

Problemen bij identificeren blootstelling enzymen



Utrecht University

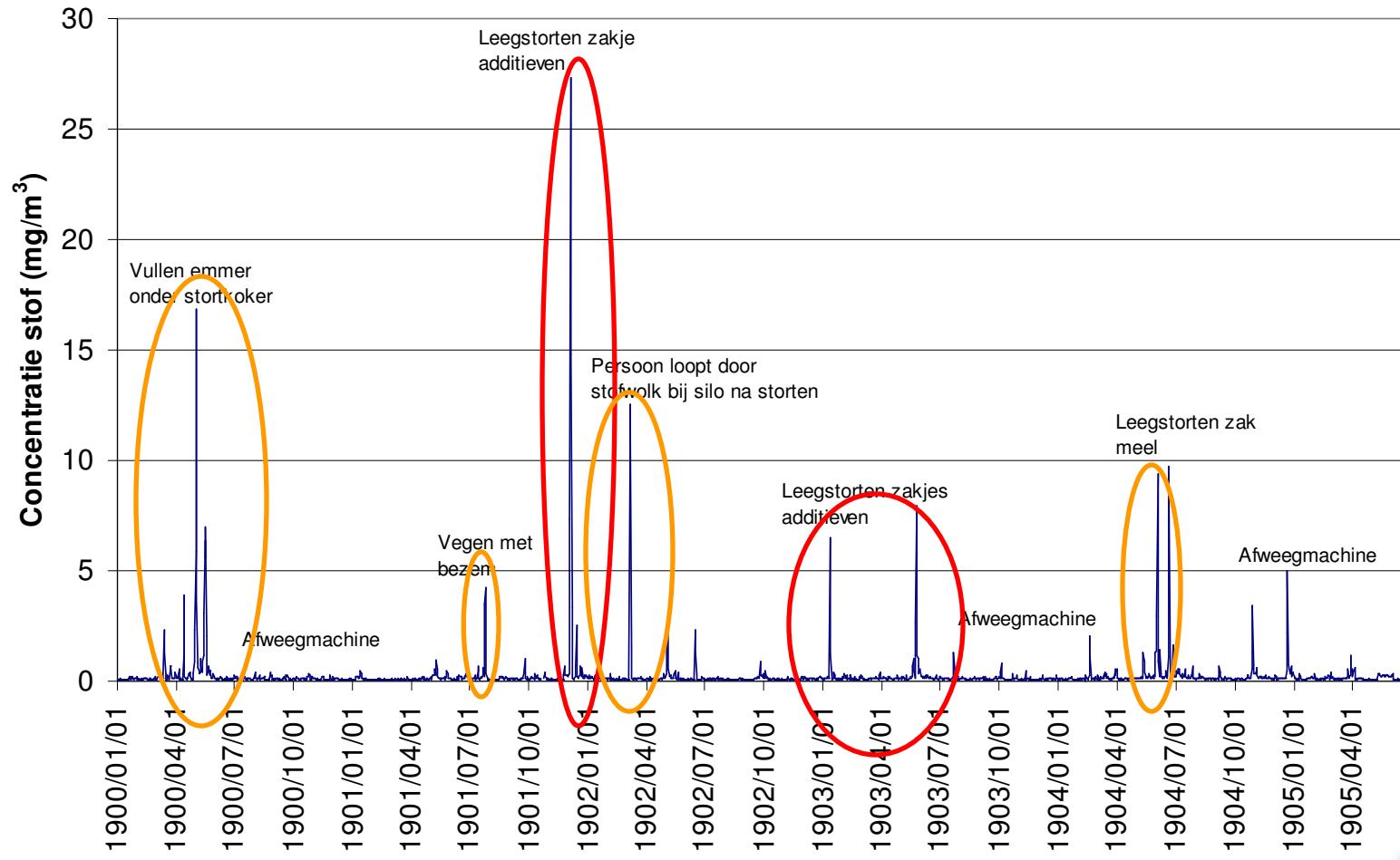
- Belang van piekblootstelling – welke piek bevat het enzym?
- Aard van het enzym
(in kleine hoeveelheden toegevoegd aan product, niet homogeen verdeeld)
- Labelling van producten niet informatief
(blootstelling lastig te voorspellen)





Welke pieken zijn van belang?

DataRam industriële bakkerij (storten zakgoed)





Directe kleuring

- Realtime-metingen gekoppeld aan kortdurende stofmetingen
- Directe kleuringstechniek om aanwezigheid van enzyme of allergeen in het stof aan te tonen
- Traditionele EIA niet gevoelig genoeg



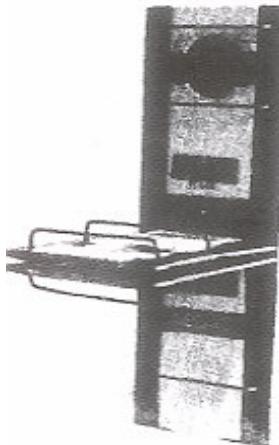


HALOgen immunostaining (Tovey et al.)

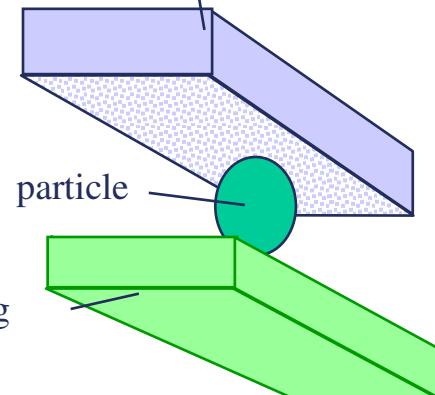
Ontwikkeld voor amylase en tarwe

Utrecht University

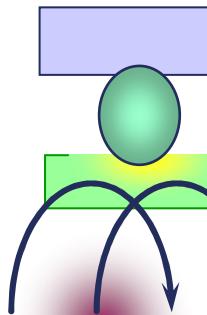
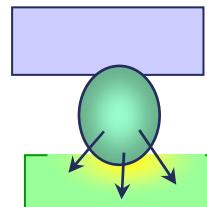
particles collected
on adhesive film in
passive sampler



the particles are then
sandwiched between
the adhesive film and
the protein-binding
membrane

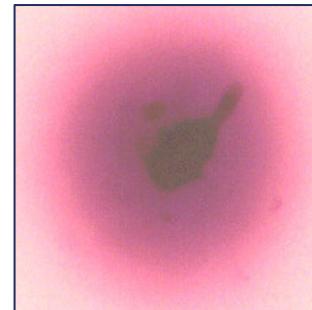
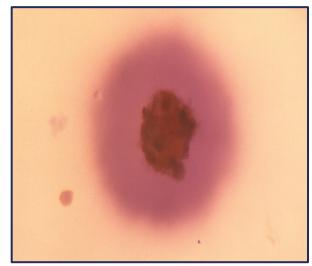
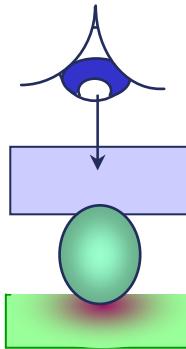


extracted
allergen
binds to
membrane



immunostain allergen
with IgE or m-Ab
through membrane

view HALO of stain
through adhesive film

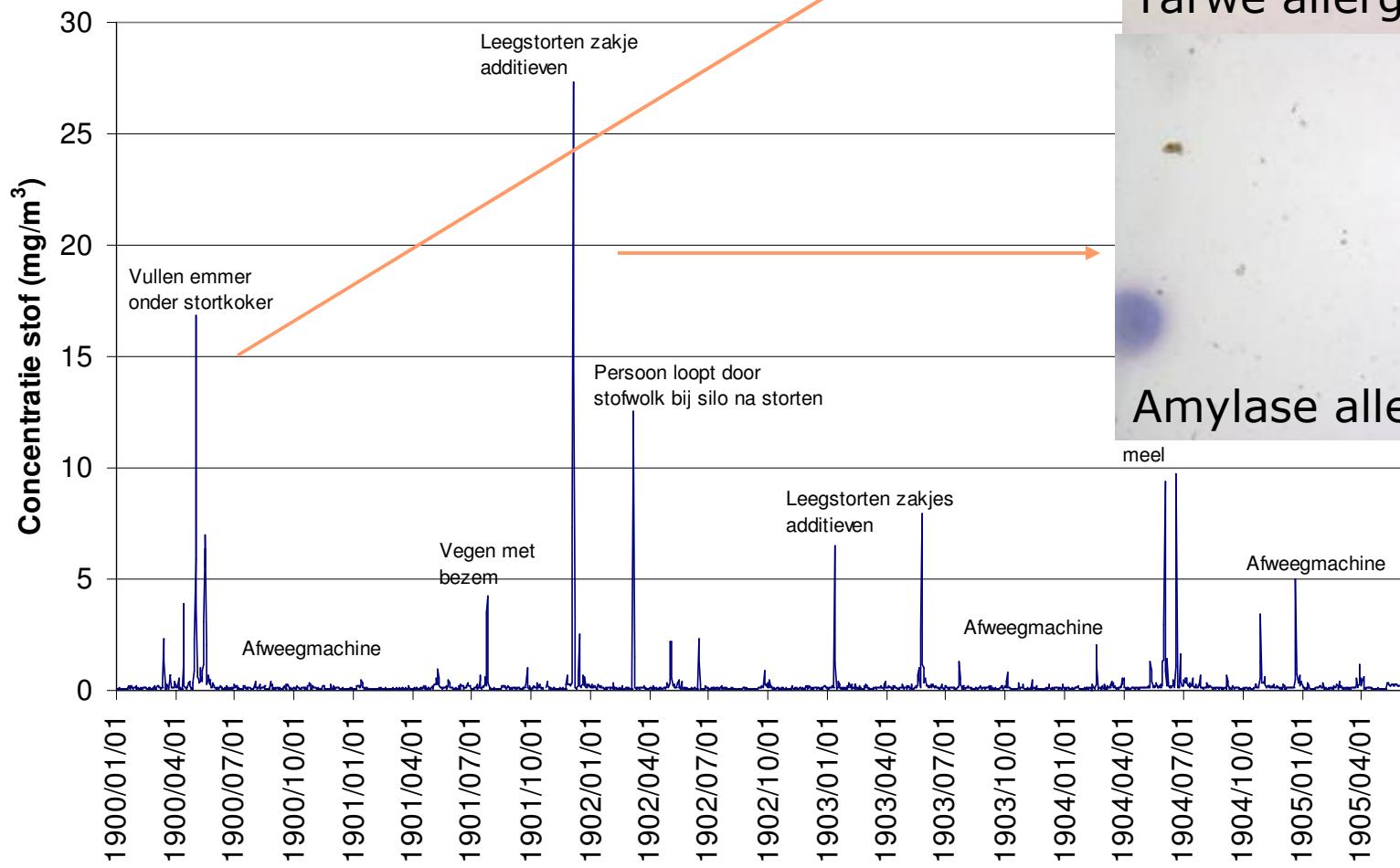


'halos' around
Cat particle &
Alternaria spore



Resultaten directe kleuring

Industriële bakkerij storten zakgoed

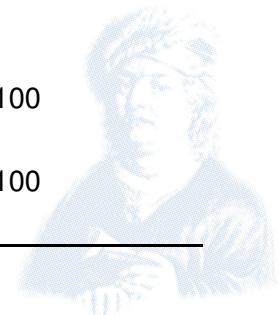


Tarwe allergenen

Amylase allergenen
meel



Overzicht resultaten directe kleuring



Job	Tasks	bijzonderheden	LEV	Amylase positieve	Tarwe positieve deeltjes
Blanco				0	-
ingredient weigher	Afwegen ingredienten		Laminaire flow wall	5-7	-
ingredient weigher	Afwegen ingredienten		Laminaire flow wall	8-10	-
ingredient weigher	weighing ingredients	erg actieve schepper,	Laminaire flow wall	>20-60, overloaded	-
ingredient weigher	wieghing ingredients (incl pure enzyme)			>20-100	-
magazijn medewerker	storten van bulk zakgoed in silo	zeer korte meting	Ringventilatie	0	-
Storter zakgoed (retour)	storten van zakgoed pre-mix met amylose in stortkoker			7-25	-
Storter zakgoed (retour)poederfabriek	storten van zakgoed in stortkoker			4-5	-
Storter zakgoed (retour)	storten van zakgoed in stortkoker	geen amylose		0	-
Tapper	aftappen van zakgoed			1-3	-
tapper	aftappen van zakgoed	weinig ingrijpen		0	>100
tapper	aftappen van zakgoed	met sampler geknoeid		overloaded positief	>100



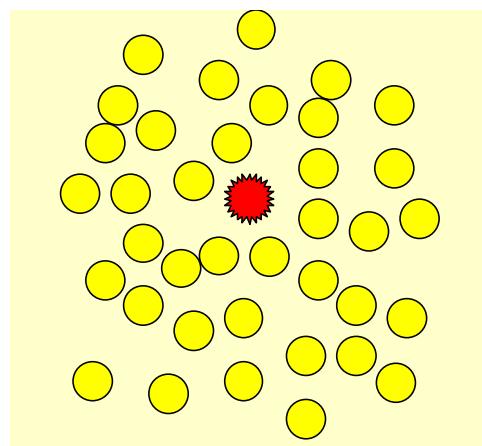
Kenmerken α -amylase in de bakerij omgeving

- Amylase toegevoegd als granulaat enzyme aan tarwe meel, in een verhouding van ~ 1/100,000 w/w
- Bij stofcentraties van > 1-2 mg/m³ >90% is tarwe meel stof

→ *1 op de 100,000 stof deeltjes is een enzyme partikel*

*Sampling → concentreren van
partikels van ~ 0.2 - 1 m³ lucht op filter*

→ ~ 0.1 – 5 mg tarwe
~ 0.1 – 5 ng α -amylase





Identificatie van andere bronnen

- Bekende bronnen zijn de broodverbetermiddelen
- Enzymen komen ook in andere producten voor op de labels maar zijn niet verder gespecificeerd
- Enzymen kunnen dus ook op plaatsen voorkomen waar het niet zo te verwachten is



Belangrijk probleem bij allergeen metingen



Utrecht University

Gebruik van pompjes en laboratorium analyses

→ *duur, arbeidsintensief, en tijdrovend:*
'interval' van dagen of weken tussen sampling
en verkrijgen van de data

→ *sensitiviteit:*
allergeen analyse en zeker die van enzymen
moet zeer gevoelig zijn

→ *Behoefte aan direct inzetbare en direct
afleesbare methode voor een grove schatting
and demonstratie van allergeen expositie op de
werkplek*





Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

Utrecht University

- Semi-quantitative method for rapid detection of antigens/allergens
- Easy-to-use, robust
- LFAs for several occupational allergens (mouse, rat, α -amylase) developed in the EU MOCALEX project

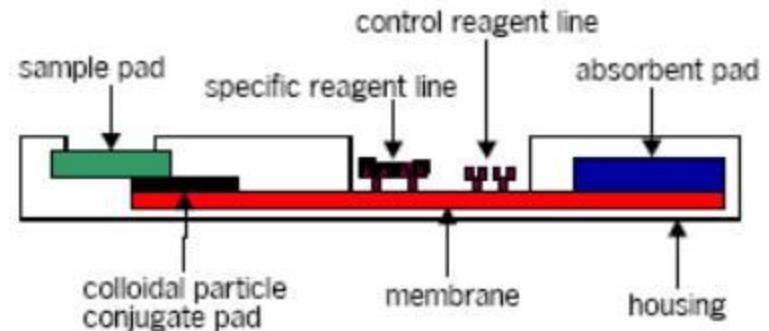
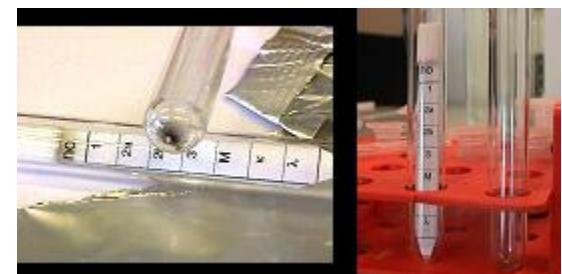


Figure 1. General set up of a rapid one-step lateral flow immunoassay.

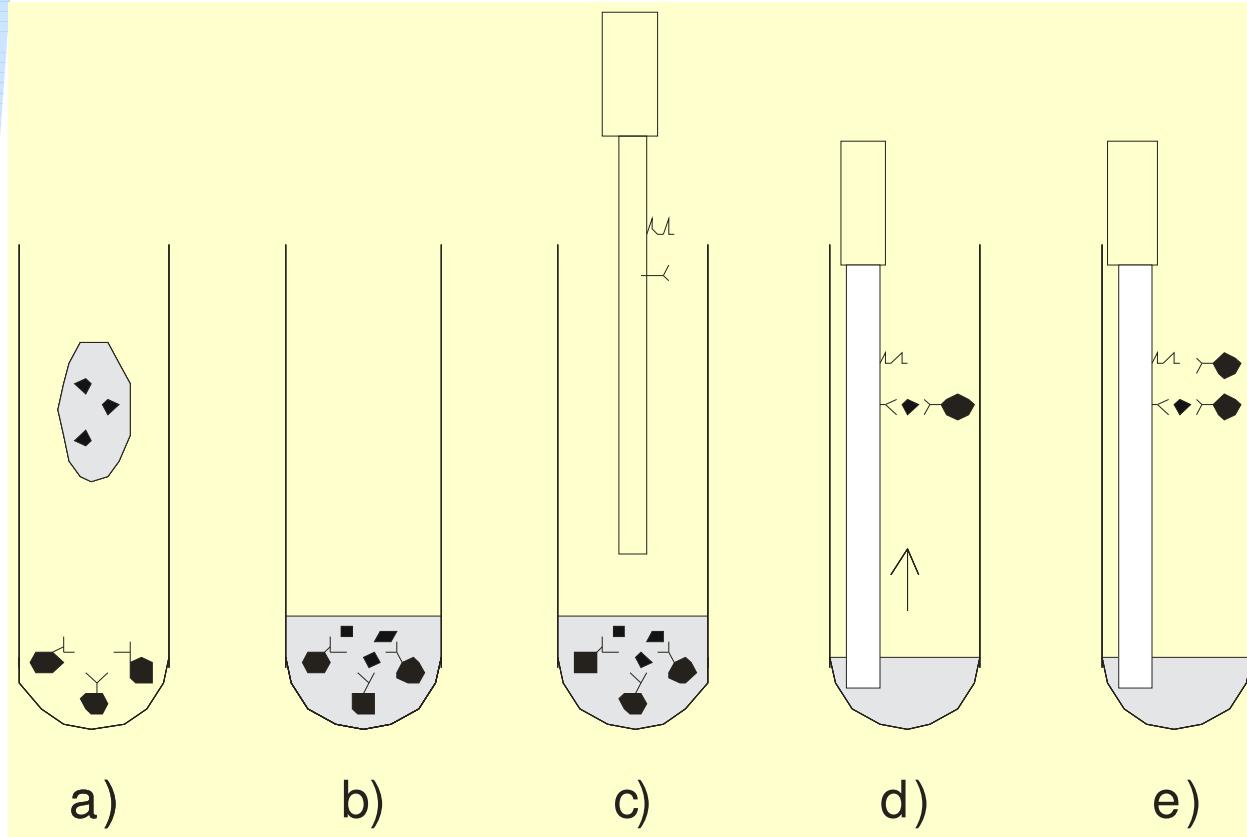
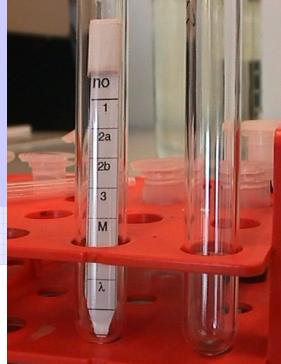
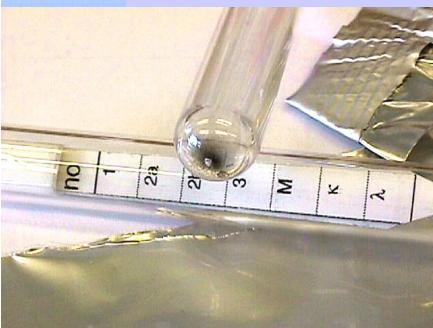


Closed



Tube

Amylase (LFIA): tube design



- a. Test vloeistof toevoegen aan buis met gelabeld koolstof
- b. Vorming antigeen-conjugaat complex
- c. Strip met detecting antibody toevoegen
- d. Chromatografie
- e. Vorming specifieke lijn + controle lijn





Validation of amylase LFIA in bakeries

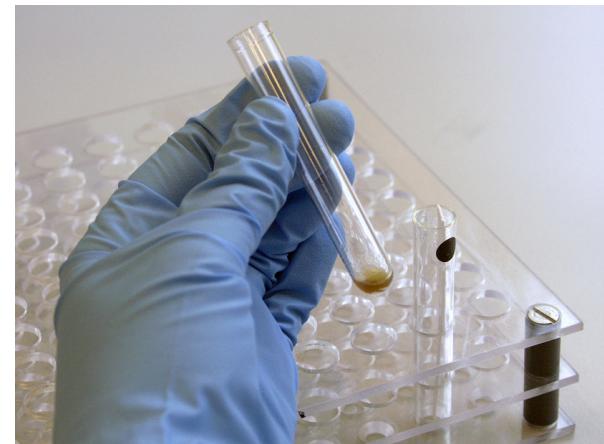
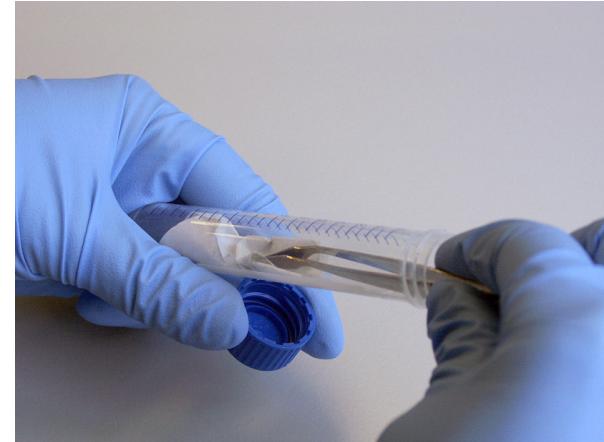
Field study in 5 industrial bakeries in NL:

1. Airborne dust sampling
in high- (dough-making) and
low-exposure (packing) areas:
 - *Stationary high-volume S&S (23.5 L/min)*
 - *Stationary low-volume PAS-6 (2 L/min)*
 - *Personal* low-volume PAS-6 (2 L/min)*
2. Wipe (settled dust) sampling
 - *A4-size surface (mixing bowl, transport track,
floor), with 55 mm pre-wetted paper filters*
3. Collection of flour product samples





Collection of 'wipe samples'



From paper filters:

- add 6 ml of PBT
- brief shaking by hand and 10 sec vortexing
- *no centrifugation*

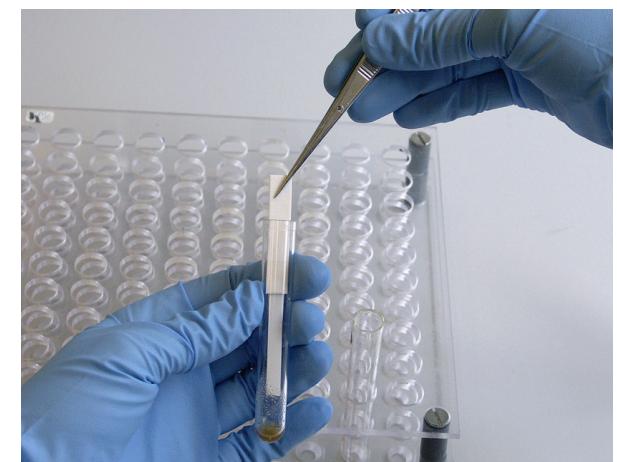
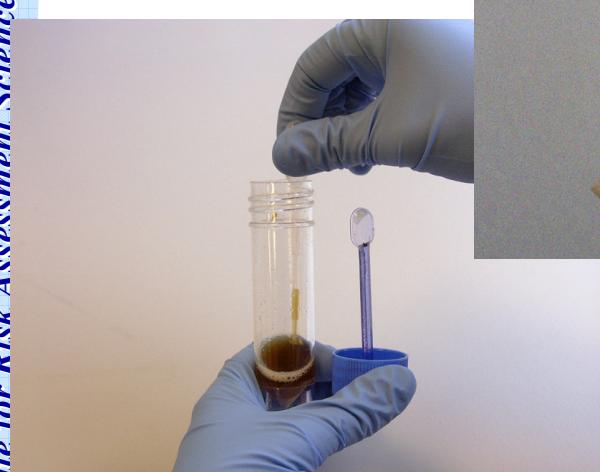
→ extract/suspension ready for LFIA





Validation of amylase LFIA in bakeries: *allergen measurement in flour samples*

Utrecht University



5% (w/v) suspensions in PBT → intermittent vortexing 60 min (*or shaken by hand*)

→ centrifugation (15 min, 3000 g) (*optional*)

→ supernatant/suspension

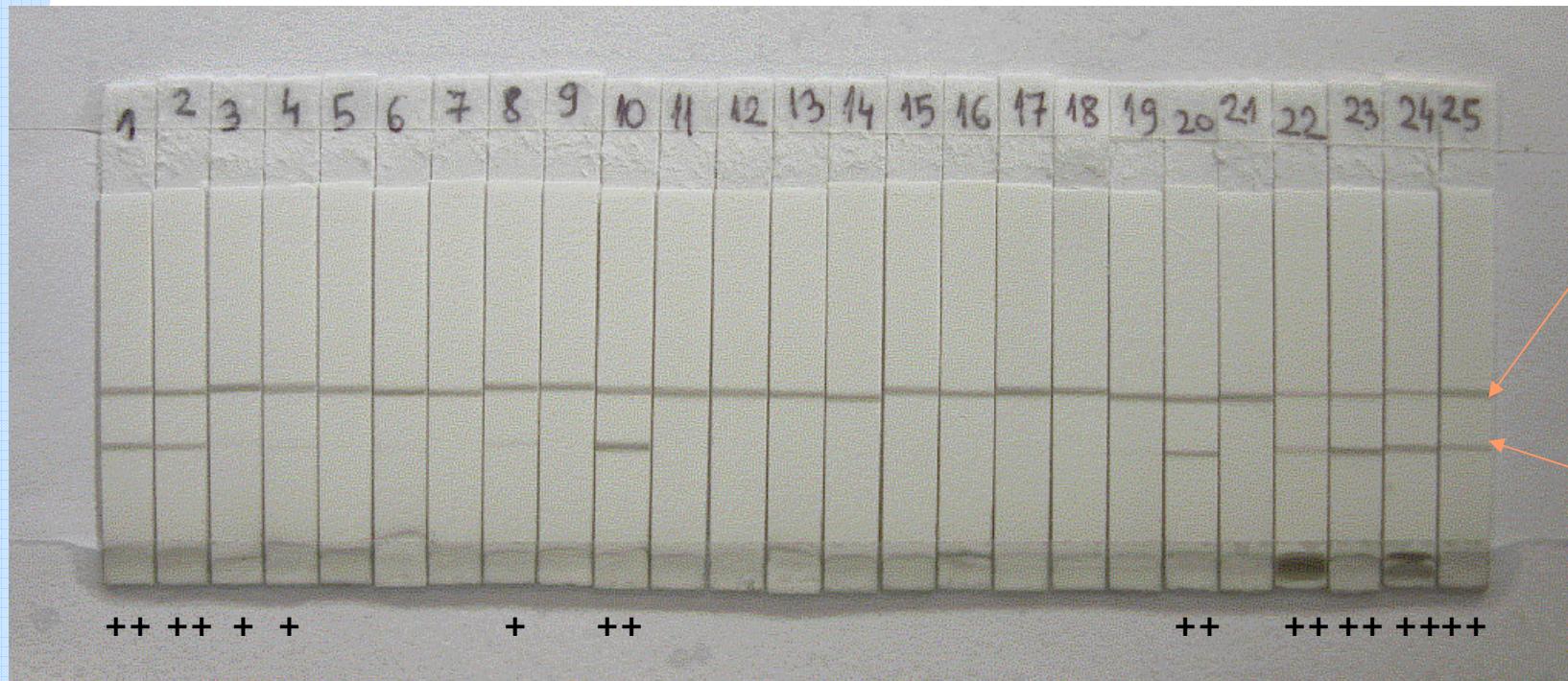
→ LFIA



LFIA analysis of samples from an industrial bakery



Utrecht University



wipe samples:

- dough-making area (1,2)
- packing area (3,4)
- office (5)

flour extracts (20-24);

airborne stationary:

- PAS-6 (7, 12, 13, 16);
- S&S samples (18, 19);

field blanks (6, 11, 17) ;

airborne personal:

- PAS-6 samples (8, 9, 10, 14, 15);

amylase standard (40 ng/ml) (25)



Validation of amylase LFIA in bakeries

Flour product samples:

majority positive

Airborne stationary samples:

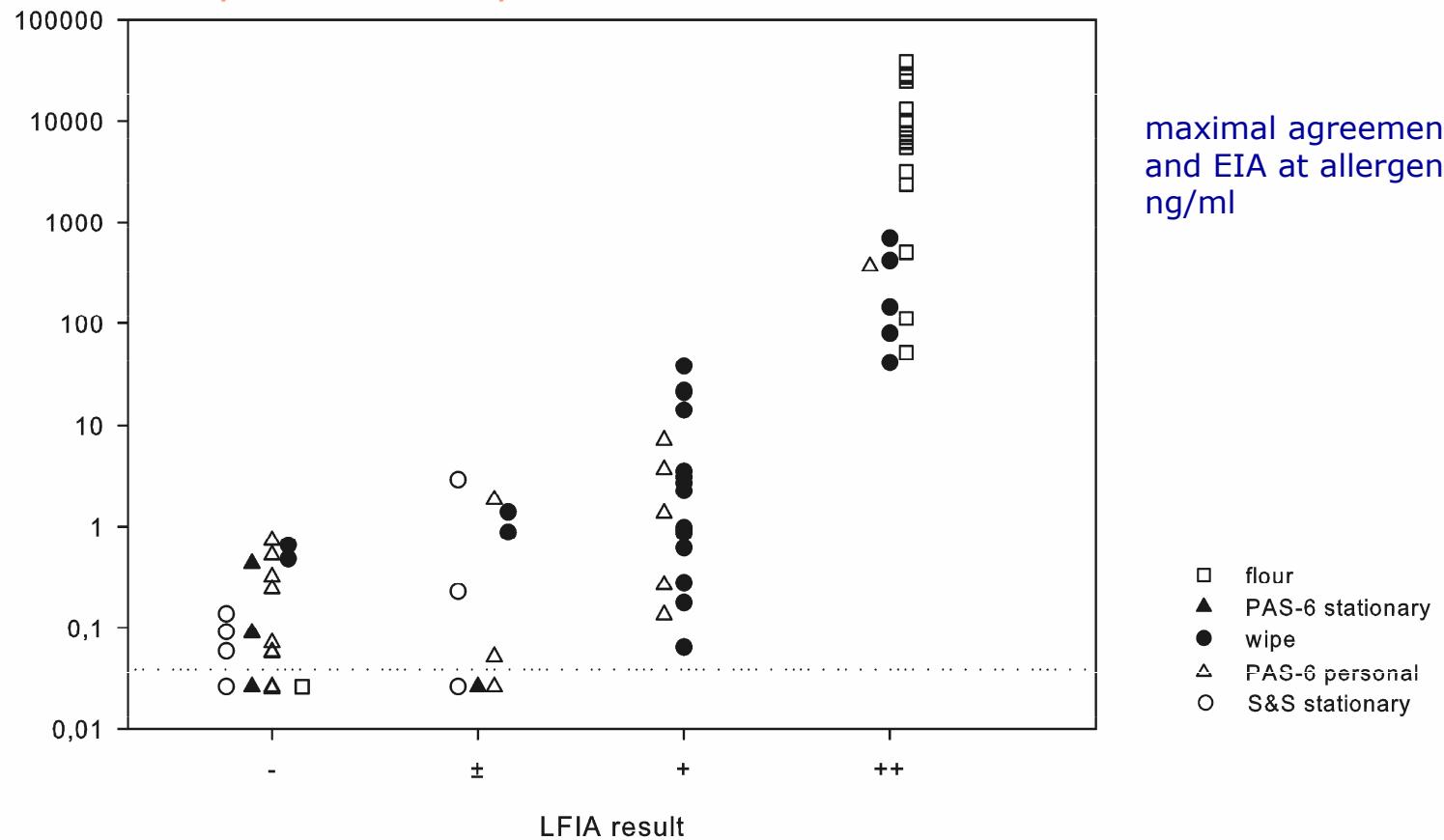
PAS-6 0% , S&S 0%

Wipe samples:

84%

Airborne personal samples:

26%



maximal agreement between LFIA
and EIA at allergen levels > 5
ng/ml





Monstername & Detectiepakket LFIA

Pakket voor het verzamelen van veegmonsters

- PBT (PBS+0.05% Tween20) voor extrahatie (in Greiner 15 ml buisje)
- Greiner 15 ml buisjes (art. no. 18 8271)
- PBT (PBS+0.05% Tween20) voor bevochtiging filter: (in Sarstedt 2 ml buisje)
- Papieren filter (55 mm, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)
- Sarstedt 3.5 ml pipet (art.no. 86 1171)
- Sarstedt 3.5 ml pipet (art.no. 86 1172)



Pakket voor veegmonster



Pakket voor het verzamelen van grondstofmonsters

- PBT (PBS+0.05% Tween20)
- Greiner container met lepel (art.
- Sarstedt 3.5 ml pipet (art.no. 86 1



Pakket voor grondstofmonster



Uittesten van LFIA in de praktijk

- Monstername en detectie pakket zijn samengesteld
- Gebruiksprotocol beschreven
- Daadwerkelijk uittesten niet plaatsgevonden
- Meer informatie neem contact op:

Inge Wouters (030-2539449)
i.m.wouters@iras.uu.nl





Samenvattend

- Verschil in pieken wat betreft blootstelling aan allergenen
- Menselijk gedrag beïnvloedt de blootstelling (persoonlijk vs stationair)
- LFIAs zijn nuttig om risico's te demonstreren op de werkplek en om verspreiding en onvoorziene bronnen op te sporen



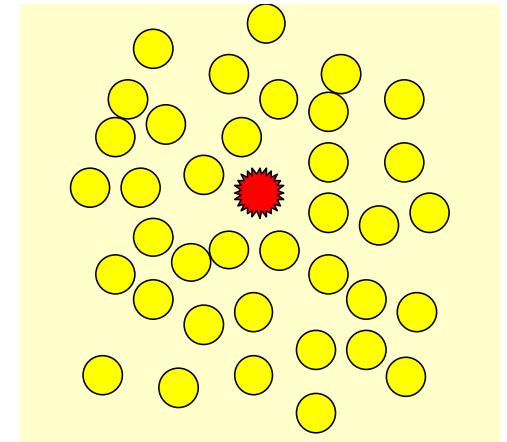


α -amylase allergeen blootstelling

Implicaties van de bevindingen

Amylase zit in 'relatief grote partikels':
die bevatten ~0.04 – 2.0 ng amylose

Verhoogd risico op sensitisatie aangetoond bij lage
nivo's ($70\% < \text{LOD}$ van de ELISA) $\pm 5 \text{ ng/m}^3$



Dit kan dus

*Veroorzaakt door inhalatie van gemiddeld 1-10
partikels/dag*

*Dit heeft een inherent grote variatie in de
blootstellingsmetingen tot gevolg*





Implicaties voor risicoevaluatie

- Slechts enkele kortdurende blootstellingsmomenten op de dag kunnen van belang zijn
- Met name 'onverwachte' blootstellingsmomenten verdienen aandacht
- Blootstellingsmetingen vertonen veel variatie, dus een grote meetinspanning noodzakelijk om risicooverschrijding goed te kunnen schatten
- Dit geldt ook voor andere enzymen en blootstellingssituaties





Utrecht University

Uitgevoerd door



Tim Meijster
Jose Jacobs
Jelena Bogdanovic
Gert Doekes
Dick Heederik



Liesbeth Preller
Evelyn Tjoe-Nij
Erik Tielemans

MOCALEX partners:

A&F Wageningen
Marjo Koets
Aart van Amerongen

BGFA Bochum
Ingrid Sander

Karolinska Institute
Anne Renstrom

