

Samenvatting proefschrift

Measurement of flour and bakery enzyme allergens in the occupational environment

Jelena Bogdanovic¹

Werkgerelateerde luchtwegallergie is een belangrijk industrieel gezondheidsprobleem, veroorzaakt door een specifieke immunologische respons op in de werkomgeving ingeademde allergene stoffen meestal eiwitten van planten, dieren of micro-organismen. Immunologische sensibilisering leidt bij herhaalde blootstelling tot allergische reacties en symptomen, met als meest ernstige vorm beroepsastma, een aandoening die, indien niet tijdig onderkend, kan uitmonden in permanente arbeidsongeschiktheid. Uit klinische ervaring en populatiestudies is duidelijk gebleken dat twee belangrijke factoren het risico om beroepsallergie te ontwikkelen bepalen: 1) een genetische aanleg, fenotypisch gezien als een familiair vóórkomen, en/of een eigen persoonlijke voorgeschiedenis van allergische aandoeningen; en 2) niveaus en duur van blootstelling aan het beroepsallergeen. Epidemiologische studies hebben aangetoond dat het risico van sensibilisatie voor een beroepsallergeen hoger is naarmate de blootstelling toeneemt, en systematisch verminderen van de blootstelling zou dus zijn weerslag moeten hebben op de ontwikkeling van beroepsallergie en -astma. Het vaststellen van blootstellingsnormen voor allergenen, en het invoeren van maatregelen om de blootstelling te verminderen, zijn echter alleen zinvol en goed te realiseren als gevalideerde en gevoelige methodes beschikbaar zijn om allergeenconcentraties in de werkomgeving te meten en zo toezicht te kunnen houden op het niveau van de allergeenblootstelling. In dit proefschrift worden studies beschreven met als doel het evalueren en optimaliseren van analytische procedures voor de meting van allergenen in de lucht van bakkerijen en meelmaaldereien, een tweetal typische voorbeelden van een werkomgeving met een hoge allergeenblootstelling, en daarmee samenhangend een verhoogd risico op beroepsallergie. De studies maakten deel uit van het Europese project MOCALEx (Measurement of OCCupational ALLergen EXposure), waarin zes laboratoria uit verschillende landen werkten aan ontwikkeling en optimalisatie van analyse methoden voor verscheidene belangrijke allergenen van biologische oorsprong (zogenaamde bio-allergenen), waaronder enzymen, tarwe- en sojabloem-eiwitten, en knaagdier-allergenen. Reeds bestaande methodes voor tarwe-eiwitten en het van schimmels afkomstige enzym α -amylase, twee belangrijke bio-allergenen in de bakkerij- en meel-industrie, werden geëvalueerd en met elkaar vergeleken alsmede met nieuw ontwikkelde technieken. De meeste analyses werden uitgevoerd met inhaleerbaar stofmonsters verzameld met behulp van een nieuw ontwikkeld apparaat voor parallelle monstername in bakkerijen en meelmaaldereien in Nederland, Duitsland, het Verenigd Koninkrijk en Spanje.

Allereerst worden de oorzaken van werkgerelateerde luchtwegallergie in de bakkerij en meelindustrie beschreven. Inademing van meelstof van tarwe en aanverwante Triticaceae species, zoals rogge en gerst, is een van de belangrijkste oorzaken van luchtwegallergie bij bakkers. Een ander belangrijk en bekend allergeen is het in bakkerijen veel gebruikte, uit schimmels bereide industriële enzym α -amylase. Dit enzym wordt in kleine hoeveelheden aan bloem in meelmaaldereien en/of bakkerijen toegevoegd om het bakproces te versnellen en de kwaliteit van deeg te verbeteren.

Tevens kunnen ook andere potentiële allergenen in de bakkerij, broodfabriek of aanverwante industrieën, aanleiding geven tot allergieën, zoals andere enzymen en meeladditieven, bakkersgist, noten, enz., maar deze vormen van allergie zijn vooral als incidentele gevallen beschreven, en er is nog weinig systematisch onderzoek naar gedaan.

De meest gebruikelijke methodes om allergeenblootstelling in de lucht te meten worden beschreven. Na bemonstering van inhaleerbaar stof wordt het filter gewogen, geëxtraheerd met een waterige vloeistof, en de concentratie allergene eiwitten in de verkregen extractievloeistof kan vervolgens worden gemeten met een specifieke immunoassay. De verschillende op dit terrein actieve onderzoeksgroepen gebruiken echter als regel elk hun eigen methodes om allergenen te meten, wat een bron van variatie is voor door verschillende instituten gemeten en gerapporteerde allergeenniveaus voor in principe dezelfde werkomgeving. De door verschillende groepen beschreven blootstellingsconcentraties kunnen dus vaak niet direct met elkaar worden vergeleken. Het is daarom noodzakelijk om de bestaande meetmethodes te evalueren en te vergelijken, om aldus tot een geoptimaliseerd protocol voor de handelingen voor allergeen-extractie en -analyse te komen, een protocol dat eventueel als standaardprocedure voor toekomstige studies kan worden aanbevolen.

Vervolgens worden twee nieuw ontwikkelde enzym immunoassays (EIAs), een inhibitie EIA en een sandwich EIA, beschreven voor de meting van tarweallergenen met behulp van anti-tarwe konijn IgG antistoffen. De twee nieuwe methodes werden vergeleken met de eerder gevalideerde IgG4 inhibitie EIA, een assay gebaseerd op de anti-tarwe IgG4 reactie van sera van bakkerij-medewerkers. In de EIA vergelijking werden allergeen-concentraties bepaald in extracten van een groot aantal ($n = 432$) inhaleerbaar stofmonsters, verzameld met de nieuw ontwikkelde apparatuur

¹Promotie-instituut: Universiteit Utrecht, Institute for Risk Assessment Sciences. Promotie-datum: 6 september 2006

voor parallele monsternamen. De specificiteit van de drie EIAs en de erin gebruikte antistoffen werd beoordeeld in EIA en immunoblotting experimenten, en vergeleken met die van IgE antilichamen van voor tarwe gesensibiliseerde bakkers. De antilichamen die in deze EIAs worden gebruikt vertoonden allen een sterke reactie met tarwe-eiwitten en enige kruisreactiviteit met extracten van rogge- en gerstemeel, maar bleken verder in ieder geval zeer specifiek voor graan-eiwitten. In het algemeen bonden konijn IgG antilichamen en humaan IgG4 met dezelfde eiwitten als de IgE antilichamen van tarwe-allergische bakkers, en dus worden in de assays klinisch relevante eiwitten gemeten. De humane IgG4 en konijn IgG inhibitie assay hadden een vergelijkbare gevoeligheid met een detectielimiet die varieerde van 18 tot 88 ng/ml, terwijl de sandwich EIA veel gevoeliger bleek (detectielimiet < 0.2 ng/ml). De allergeenniveaus zoals gemeten in de extracten van de inhaleerbaar stofmonsters vertoonden een goede correlatie tussen de verschillende methodes en ook de absolute verschillen in de gemeten concentraties waren gemiddeld genomen niet meer dan 20%. Concluderend kan gesteld worden dat de methodes die gebruik maken van konijn anti-tarwe IgG een goed alternatief vormen voor de tests met humane antilichamen, met bijkomende praktische voordelen, zoals de verminderde afhankelijkheid van eindige en variabele pools van humane sera.

Daarna werd onderzocht wat het effect is van variaties in extractieprocedures op de opbrengst aan tarwe-allergenen in de extracten. Hierbij werd eveneens gebruik gemaakt van de eerder genoemde reeks van 432 parallele stofmonsters. Van de vier onderzochte, in de onderzoeksopzet bewust gevarieerde extractieparameters - elutie buffer, methode van schudden, het type extractie buis en de snelheid van centrifugeren - bleek alleen de keuze van de elutiebuffer een significant effect op de tarwe-allergeen-opbrengst te hebben. Toevoeging van Tween-20 aan de elutiebuffer gaf een 3 tot 10-voudige verhoging in allergeenniveaus, en dit was het meest uitgesproken bij lage concentraties, waarschijnlijk door een combinatie van een betere elutie van het filter en uit de meelstof-matrix, en het tegengaan van eiwitverliezen tijdens opwerken en opslag van de extracten. De gemeten allergeenconcentraties in de extracten bleven stabiel en waren vergelijkbaar na opslag voor 4 maanden bij -20°C, en toevoeging van het stabiliserend eiwit caseïne - ter voorkoming van verliezen van α -amylase - laat geen interferentie met de EIAs zien. Aldus omvat het geoptimaliseerd protocol voor extractie van tarweallergeen: a) elutie met fosfaat-gebufferd fysiologische zout met een toevoeging van 0.05% (v/v) Tween-20; b) standaard polystyreenbuizen; c) een eenvoudige, weinig arbeidsintensieve schudmethode met gebruik van conventionele apparatuur; en d) een centrifuge-stap na de extractie, waarbij niet opgeloste meelmatrix componenten worden verwijderd en een helder oplossing wordt verkregen. Voor de laatste stap is centrifugering met een conventionele tafelcentrifuge, bij 1,000 G, afdoende.

Optimalisering van elutie- en analyse-methodes voor α -amylase worden beschreven gebruik makend van dezelfde reeks van 432 parallele inhaleerbaar stofmonsters en werd getest op α -amylase met EIA methoden van drie laboratoria: één sandwich EIA met affiniteits-gezuiverde polyclonale konijn IgG antilichamen (IRAS), en twee immunoassays gebaseerd op monoclonale anti-amylase antilichamen (KI/BGFA en HSE). Slechts ongeveer 20% van de filter extracten toonden een detecteerbare reactie in de IRAS en KI/BGFA EIAs, en nog veel minder (5%) in de HSE EIA. De methodes van het IRAS en KI/BGFA zijn dus gevoeliger dan die van het HSE. Allergeen concentraties gemeten in de IRAS EIA correleerden zeer goed met die van de KI/BGFA EIA, hoewel er tot 6-voudige significante verschillen in de absolute waarden gevonden werden. Dit bleek voornamelijk het gevolg van het gebruik van verschillende standaard preparaten, en de verschillende definities van hun allergeen gehalte. Ook werd het effect van verschillende extractie procedures op de allergeen opbrengst bepaald.

Het volgende hoofdstuk beschrijft een nieuwe éénstaps immunoassay, een zogenaamde 'lateral flow immunoassay (LFIA)' voor het snel aantonen van α -amylase, een allergeen dat in nanogram hoeveelheden al sensibiliserend kan zijn, en waarvoor het risico van blootstelling dus - in tegenstelling tot tarwe-allergeen blootstelling die nauw samenhangt met de totale hoeveelheden meelstof in de lucht - zelden direct zichtbaar is. De LFIA methode kan gebruikt worden om onmiddellijk op een werkplek het risico van amylase-blootstelling te demonstreren, zonder dat daarvoor tijdrovende en arbeidsintensieve stofbemonstering, extractie en EIA nodig zijn. De ontwikkelde α -amylase-LFIA maakt gebruik van anti-amylase konijn IgG om het allergeen te immobiliseren, en van koolstof-gelabelde muis monoklonale antilichamen tegen amylase als detectie-reagens. Het gebruik van de ontwikkelde test werd geëvalueerd in een veldstudie in vijf bakkerijen. De detectielimiet was 5 ng/ml, en de test is daarmee een orde van grootte minder gevoelig dan de amylase EIAs, maar het grote voordeel bleek de eenvoud en snelheid van de procedure: binnen 30-60 min na monsternamen kan een semi-kwantitatieve schatting gemaakt worden van de hoeveelheid amylase allergeen in bijvoorbeeld stof dat van een tafel, een meelkuip of ander oppervlak wordt geveegd, of in een monster genomen uit een in de bakkerij gebruikte zak meel of andere grondstof. Vergelijkbare LFIAs zouden ook voor andere beroepsallergenen in andere werkomgevingen gebruikt kunnen worden.

De resultaten van een klein pilotonderzoek naar de toepasbaarheid van poreus polyurethaanschuim (foam) voor grote-afhankelijke bemonstering van tarweallergeen in de lucht worden beschreven in hoofdstuk 6. Hoewel tarweallergenen al sinds lange tijd worden gezien als één van de belangrijkste oorzaken van beroepsallergie in bakkers, is slechts beperkte kennis beschikbaar over de grootteverdeling van stofdeeltjes waarop zich tarwe allergenen bevinden. Daarom werd

onderzocht of het mogelijk is om grootteafhankelijke meting van tarweallergenen uit te voeren met behulp van foams als bemonsteringsmiddel. Hiertoe werd een zgn. "respirabele" of "thoracale" foam geplaatst in een inhaleerbaar stof-monstername kop, boven de gebruikelijke teflonfilters, waarna zowel persoonlijke als stationaire monsters werden verzameld in een meelmaalterij. Tarwe allergenen konden worden aangetoond in de extracten van zowel de filters als de foams, en werden voornamelijk gevonden in de deeltjesfractie met een aërodynamische diameter van 10µm en hoger (extrathoracale fractie) en de deeltjesfractie met diameter tussen 4 en 10µm (tracheobronchiale fractie). Minder dan 4% van tarweallergeen in de lucht werd aangetroffen in de deeltjesfractie kleiner dan 4µm (respirabele fractie). Meten van tarweallergeen in stoffracties verzameld met respirabele en thoracale polyurethaan foams is dus technisch mogelijk, wat suggereert dat een dergelijke benadering ook voor andere beroepsallergenen toegepast zou kunnen worden.

Ten slotte wordt een meer algemeen overzicht gegeven van de stand van zaken en toekomstperspectieven voor het meten van allergeenblootstelling in arbeidssituaties, en worden suggesties gedaan hoe de resultaten beschreven in dit proefschrift geïmplementeerd kunnen worden. De twee EIA methoden die gebruik maken van konijn anti-tarwe IgG worden aanbevolen voor het meten van tarwe-allergenen in

de toekomst: de inhibitie EIA voor (conventionele) 8 uren inhaleerbaar stofmonsters, en de veel gevoeliger sandwich EIA voor het meten van monsters waarin een lage allergeenconcentratie wordt verwacht. Voor α -amylase allergenen zijn zowel de IRAS polyclonale EIA en de KI/BGFA monoclonale EIA geschikte methodes voor analyse van inhaleerbaar stofmonsters. Er moet echter wel rekening gehouden worden met een omrekeningsfactor van ongeveer 6, als de resultaten van de twee analyses, uitgevoerd volgens hun huidige standaardprocedures, met elkaar worden vergeleken. IJking van beide analyses met dezelfde allergeenstandaard - met een eenduidig bepaalde allergeen- en eiwitconcentratie - zou deze factor kunnen verminderen tot ongeveer 1.5-2.0. Naast de analytische procedures worden tevens geoptimaliseerde extractieprotocollen voor beide allergenen gepresenteerd. Het beschrijven in de proefschrift van de optimale EIA en elutie procedures voor tarwe en schimmel α -amylase zijn belangrijke eerste stappen naar toekomstige normalisatie van deze methodes. Normalisatie van de analysemethodieken voor bio-allergenen in luchtstofmonsters is essentieel om blootstellingsnormen op te kunnen stellen, gepaste blootstelling-verminderende maatregelen te kunnen invoeren en hun effectiviteit te evalueren, om zodoende werkgerelateerde allergeenblootstelling beter te controleren en het vóórkomen van beroepsallergie te verminderen.