

# Samenvatting proefschrift

## Endotoxin exposure assessment – measurement and characterization

Suzanne Spaan<sup>1</sup>

In **hoofdstuk 1** worden de achtergrond en het doel van dit proefschrift geïntroduceerd. Organisch stof, een algemene term die wordt gebruikt om te verwijzen naar plantaardig, dierlijk en microbiologisch materiaal, bestaat uit een complex mengsel van infectieuze en niet-infectieuze agentia. Blootstelling aan organisch stof is geassocieerd met verschillende gezondheidseffecten die worden veroorzaakt door specifieke agentia in het stof, zoals endotoxinen afkomstig van bacteriën, (1→3)-β-D-glucanen afkomstig van schimmels, eiwitten afkomstig uit dierlijke urine, aflatoxinen en bacteriële enzymen. Dit proefschrift richt zich uitsluitend op endotoxinen. Endotoxinen zijn onderdeel van de celwand van Gram-negatieve bacteriën en alomtegenwoordig in het milieu. Gram-negatieve bacteriën zijn bijvoorbeeld aanwezig op het bladoppervlak van planten en in dierlijke uitwerpselen. Endotoxinen zijn een integraal deel van het buitenste laag van de celwand en opgebouwd uit eiwitten, lipiden en lipopolysacchariden (LPS). Endotoxinen komen vrij in het milieu door lysis, wat plaatsvindt tijdens celgroei en nadat de cel sterft. Het voorkomen, de groei en het vermenigvuldigen van deze bacteriën wordt beïnvloed door vele factoren. Hierdoor zijn de endotoxinniveaus in bodem, water en lucht zeer variabel, en vindt blootstelling aan endotoxinen in verschillende industrieën plaats. Inhalatie van endotoxinen wordt gezien als de belangrijkste blootstellingsroute. Zowel experimentele als (epidemiologische) veldstudies hebben verschillende negatieve effecten van blootstelling aan endotoxinen aangetoond, welke kunnen worden verdeeld in 1) inflammatoire reacties in de luchtwegen, die kunnen leiden tot respiratoire klachten zoals droge hoest, kortademigheid en piepen op de borst, klinische symptomen zoals niet-allergisch astma, versnelde longfunctiedaling, en byssinose, en 2) systemische reacties die resulteren in een verscheidenheid aan symptomen zoals koorts, rillingen, gewrichtspijn, malaise en andere griepachtige verschijnselen. De beschermende effecten van endotoxinenblootstelling worden voornamelijk beschreven in verband met de ontwikkeling van astma, en meer recent in verband met het risico op (long)kanker.

In 1998 werd in Nederland een gezondheidskundige grenswaarde van 50 EU/m<sup>3</sup> geadviseerd. Er werd een tijdelijke grenswaarde van 200 EU/m<sup>3</sup> geïntroduceerd, welke uiteindelijk binnen twee jaar tot 50 EU/m<sup>3</sup> zou moeten worden teruggebracht. Deze grenswaarde werd echter ingetrokken, omdat handhaving vanuit een technisch en

sociaal-economisch oogpunt niet haalbaar was. De betrokken industrieën moesten echter wel een plan van aanpak opstellen voor het omgaan met blootstelling aan endotoxinen, dat moest bestaan uit:

1. Een plan van aanpak over de wijze waarop de problematiek van blootstelling aan endotoxinen zal worden aangepakt, waarin naast het toepassen en eventueel ontwikkelen van (aangepaste) beheersmaatregelen tevens moet worden voorzien in onderzoek naar de stand der techniek en voorlichting;
2. Een programma voor het op de juiste manier introduceren en toepassen van de meetmethode zoals beschreven in de CEN-norm 14031 in combinatie met CEN 13098, aangezien een gestandaardiseerde methode noodzakelijk is voor het kunnen vergelijken van gemeten endotoxinenconcentraties met een grenswaarde; en
3. Het aanpassen van de huidige meetstrategie, die is afgestemd op chemische stoffen, aan de problematiek van blootstelling aan biologische agentia, en in het bijzonder endotoxinen.

Het doel van dit proefschrift is het geven van informatie over enkele van de belangrijkste kwesties rondom het introduceren van een grenswaarde (Maximaal Aanvaarde Concentratie, MAC) voor endotoxinen. De belangrijkste doelstellingen van dit proefschrift waren een overzicht geven van niveaus en variabiliteit in endotoxinenblootstelling en het optimaliseren van de meetmethode en de analyse van endotoxinen in de lucht. Deze doelstellingen werden onderverdeeld in de volgende onderdelen:

- Het bestuderen van inhaleerbaar stof en endotoxinniveaus in verschillende industrieën, met name in de agrarische industrie en waterzuivering, het onderzoeken van determinanten van blootstelling, en het vergelijken van verschillende technieken voor het meten van microbiële blootstelling;
- Het bestuderen van variabiliteit in inhaleerbaar stof- en endotoxinenblootstelling om de bestaande meetstrategie voor chemische agentia (CEN 689) aan te passen en zo geschikt te maken voor de beoordeling van endotoxinenblootstelling;
- Het bestuderen van de aanwezige hiaten in de CEN richtlijnen voor het meten van endotoxin (CEN 13098 en CEN 14031) om zo bij te dragen aan het tot stand brengen van een gestandaardiseerd protocol voor het

<sup>1</sup> Promotie instituut: IRAS, Universiteit Utrecht; promotiedatum: 11 november 2008; email: [suzanne.spaan@rno.nl](mailto:suzanne.spaan@rno.nl)

meten en analyseren van endotoxinenblootstelling.

In **hoofdstuk 2** worden twee blootstellingonderzoeken beschreven. In **hoofdstuk 2.1** zijn persoonlijke endotoxinenblootstelling in een verscheidenheid van agrarische industrieën en mogelijke determinanten van blootstelling onderzocht. Ondanks dat hoge blootstellingen aan organisch stof en endotoxinen regelmatig waren beschreven in deze industrieën, ontbrak zowel een gedetailleerd overzicht van niveaus in blootstelling aan endotoxinen in de lucht, als een systematische vergelijking tussen verschillende specifieke branches met gebruikmaking van hetzelfde protocol. Meer dan 600 persoonlijke inhaleerbaar stofmetingen werden uitgevoerd in 46 bedrijven uit 3 sectoren: Granen, zaden & peulvruchten, Tuinbouw, en Vee, vlees en eieren. De stof- en endotoxinniveaus werden bepaald, en beschrijvende statistiek en uitgebreide variantieanalyse werden uitgevoerd. De gemiddelde blootstellingsniveaus waren hoog, met grote verschillen tussen sectoren en bedrijven binnen sectoren. Er was meer verschil in blootstelling tussen werknemers dan variabiliteit van dag tot dag. De hoogste stof- en endotoxinenblootstelling werd in de sector Granen, zaden & peulvruchten gevonden. In alle drie de sectoren was de blootstelling hoger tijdens de primaire productie dan tijdens de verdere (industriële) verwerking van de producten. De Nederlandse voorgestelde gezondheidskundige grenswaarde (50 EU/m<sup>3</sup>) en tijdelijke grenswaarde (200 EU/m<sup>3</sup>) voor endotoxinen werden regelmatig overschreden. Determinanten als soort bedrijf, stofigheid van het product en contact met dieren/uitwerpselen waren onder andere geassocieerd met een verhoogde blootstelling. 'Natte' processen resulteerden in een minder stoffige werkomgeving en verlaagden dus de endotoxinenblootstelling. Over het algemeen kan worden geconcludeerd dat blootstelling aan endotoxinen in de hele agrarische industrie hoog is. Om aan endotoxinen gerelateerde gezondheidsrisico's te verminderen is een 10-1000-voudige verlaging van blootstelling noodzakelijk.

Het doel van **hoofdstuk 2.2** was het geven van een overzicht van blootstelling aan endotoxinen en zijn determinanten voor werknemers van rioolwaterzuiveringsinstallaties. Verder werd blootstelling aan levensvatbare en niet-levensvatbare micro-organismen en de toepasbaarheid van de *Limulus* amebocyte lysaat (LAL) assay voor het meten van blootstelling aan endotoxinen in deze werkomgeving onderzocht. In 43 Nederlandse rioolwaterzuiveringsinstallaties werden 470 persoonlijke, 123 taakgerichte persoonlijke en 54 stationaire inhaleerbaar stofmonsters verzameld. De concentratie endotoxinen in deze stofmonsters werd bepaald met behulp van de LAL-assay. Mogelijke determinanten van blootstelling werden onderzocht door middel van mixed effects modellen. Simultaan genomen monsters met parallelle monsternamesapparatuur (filters), impingers en de totale hoeveelheid levensvatbare bacteriën en Gram-negatieve bacteriën werden gebruikt om analysetechnieken te vergelijken. De filter- en impingermonsters werden geanalyseerd met de LAL-assay, gas chromatografie-massa spectrometrie (GC-MS) en fluorescentie micro-

scopie. De blootstellingsniveaus van endotoxinen waren matig, hoewel duidelijke verschillen tussen functies en bronnen van blootstelling en een aantal determinanten van blootstelling konden worden aangetoond. De op filters gemeten concentraties waren hoger en meer consistent dan die gemeten in impingermonsters. Er werden meer schimmels en Gram-positieve bacteriën dan Gram-negatieve bacteriën gemeten. De endotoxinniveaus gemeten met de LAL-assay en GC-MS waren vergelijkbaar. Het onderzoek heeft aangetoond dat de blootstelling aan inhaleerbaar stof en endotoxinen van werknemers van rioolwaterzuiveringsinstallaties vrij laag is, en dat deze werknemers worden blootgesteld aan een verzameling van microbiële agentia. In tegenstelling tot wat eerder werd gedacht suggereert de vergelijking van analysetechnieken dat gebruik van de LAL-assay niet resulteert in veel misclassificatie van blootstelling.

In **hoofdstuk 3** wordt een analyse van de gecombineerde gegevens van verschillende blootstellingonderzoeken beschreven. Variabiliteit in blootstelling aan biologische agentia, en meer specifiek endotoxinen, is zelden onderzocht. Omdat informatie over variabiliteit in blootstelling noodzakelijk is voor het beoordelen van blootstelling, is in **hoofdstuk 3.1** onderzoek gedaan naar variantiecomponenten en determinanten van blootstelling in een grote database met meer dan 2000 persoonlijke inhaleerbaar stof- en endotoxinenmetingen. De database werd opgesteld door middel van het samenvoegen van gegevens van 10 individuele studies die de laatste 10 jaar zijn uitgevoerd. In deze database werden blootstellinggroepen gedefinieerd op basis van functiecategorieën binnen industrieën. Er werd een overzicht gegeven van de blootstellingsniveaus aan inhaleerbaar stof en endotoxinen in 46 industrieën binnen vier breed gedefinieerde sectoren. Voor zowel het totaal als wanneer de metingen werden gegroepeerd in sectoren en subsectoren was de tussenpersoonsvariabiliteit groter dan de binnenpersoons- (dag tot dag) variabiliteit. Verder waren de variantiecomponenten voor endotoxinen groter dan die voor stof. Ook wanneer de metingen werden gegroepeerd op basis van industrie of functiecategorie binnen industrie was de tussenpersoonsvariabiliteit in bijna de helft van de groepen groter dan de binnenpersoonsvariabiliteit voor endotoxinenblootstelling, en voor stofblootstelling in 10% van de groepen. Determinanten van blootstelling, zoals stofigheid van het proces, contact met dieren, bulk productie, aanwezigheid van plantaardig materiaal of een cyclisch proces, verklaarden grotendeels de tussenpersoonsvariabiliteit. Blootstelling aan endotoxin was minder homogeen verdeeld binnen blootstellinggroepen dan blootstelling aan stof. Een grote variabiliteit in gemeten endotoxinniveaus is inherent aan blootstelling aan endotoxinen en wordt deels veroorzaakt door determinanten die samenhangen met de groei van micro-organismen. Dit verschilt van blootstelling aan chemische stoffen, waar de variabiliteit in blootstelling over het algemeen dan ook lager is. Deze bevindingen hebben belangrijke gevolgen voor de opzet

van toekomstige interventiestudies en epidemiologische onderzoeken. Zo zal bijvoorbeeld de meetinspanning groter moeten zijn dan bij beoordeling van blootstelling aan chemische stoffen, zeker wanneer de beoordeling van blootstelling aan endotoxinen is gericht op het toetsen aan een grenswaarde. De gevonden determinanten van blootstelling geven een indicatie voor het beheersen en controleren van deze blootstelling, hoewel meer kennis over de oorzaken van variabiliteit in blootstelling van dag tot dag noodzakelijk is om blootstelling een endotoxinen effectief te kunnen controleren.

Op basis van de informatie over blootstellingsniveaus en variantiecomponenten uit de database met endotoxingegevens wordt in **hoofdstuk 3.2** een voorstel gedaan om de bestaande meetstrategie voor chemische stoffen, de Europese standaard CEN 689, aan te passen voor de beoordeling van blootstelling aan endotoxinen. De meetstrategie heeft 3 fases, en elke fase kan resulteren in de conclusie dat de blootstellingsituatie acceptabel is, advies over beheersmaatregelen, of verder gaan naar een meer precieze schatting van de blootstellingsituatie. De drie fases zijn:

1. Oriënterend werkplekonderzoek – is endotoxinenblootstelling waarschijnlijk? (Is er een voedingsbodemp voor bacteriën aanwezig, zijn er goede groeiomstandigheden om te kunnen overleven, groeien en vermeerderen, en vindt er verspreiding plaats);
2. Globale kwantitatieve schatting – Is grenswaardenoverschrijding waarschijnlijk? (aan de hand van vergelijking met eerder uitgevoerde metingen, literatuuronderzoek, de hoeveelheid endotoxinen in productmonsters, stationaire metingen en/of indicatieve persoonlijke metingen);
3. Gedetailleerde kwantitatieve schatting – Is er sprake van grenswaardenoverschrijding? (herhaalde persoonlijke metingen bij aselekt gekozen werknemers uit een groep op willekeurige dagen)

Deze meetstrategie voor de beoordeling van blootstelling aan endotoxinen moet worden gezien als een manier om rekening te houden met de grote variabiliteit in blootstelling die gewoonlijk wordt gevonden. Voor arbeidshygiënist kan het een nuttig instrument zijn voor de beoordeling van blootstelling aan endotoxinen en de waarschijnlijkheid van 'exceedance' en 'overexposure' in een bepaalde werkomgeving. Bij het protocol ligt de nadruk op beheersmaatregelen wanneer de omstandigheden wijzen op (verhoogde) blootstelling aan endotoxinen.

In **hoofdstuk 4** wordt de procedure voor het meten en analyseren van endotoxinen in de lucht geëvalueerd en worden voorstellen gedaan voor de optimalisatie van deze procedure. Om het vergelijken van resultaten van verschillende studies en het instellen van standaarden mogelijk te maken zou de blootstelling van endotoxinen in de lucht moeten worden beoordeeld met gebruikmaking van gestandaardiseerde methoden. Hoewel de Europese Commissie voor Standaardisatie (CEN) richtlijnen heeft opgesteld voor de beoordeling van blootstelling aan endo-

toxinen, laten deze richtlijnen ruimte voor eigen interpretatie. Om het belang van alle facetten van het meten en analyseren van endotoxinen aan het licht te brengen is uitgezocht welke onduidelijkheden er nog zaten in CEN-richtlijn 14031 (beoordeling van endotoxinen in de lucht). Deze zijn in dit hoofdstuk onderzocht met behulp van een volledig experimenteel design en met gebruikmaking van parallel verzamelde inhaleerbaar stofmonsters. In **hoofdstuk 4.1** zijn de effecten van en interacties tussen soort filter (glasvezel of Teflon), transportomstandigheden (met of zonder dehydratie), opslag van monsters (bij -20 of 4 °C), extractievloeistof (pyrogeen-vrij water (PFW) of PFW + 0,05% Tween-20), opslag van extracten (bij -20 of 4 °C) en analysevloeistof (PFW of PFW + 0,05% Tween-20) op de gemeten endotoxinenconcentratie in de lucht in twee werkomgevingen onderzocht. Er werden 400 monsters verzameld en willekeurig verdeeld over de 20 verschillende combinaties van behandelingen. Er werden geen verschillen gevonden voor transportomstandigheden en de temperatuur waarbij extracten werden opgeslagen. Ook werden er geen interacties tussen de onderzochte variabelen gevonden. Monsternamen met glasvezelfilters, opslag van monsters in de vriezer en extractie in PFW + 0,05% Tween-20 leverde respectievelijk een 1,3x, 1,1x en 2,1x hogere gemeten endotoxinenconcentratie. Het gebruik van PFW + 0,05% Tween-20 had een additioneel effect.

Verder werden in **hoofdstuk 4.2** de effecten van vier gangbare media tijdens de extractie en analyse met elkaar vergeleken. Omdat dit onderzoek en eerdere onderzoeken een hogere endotoxinenopbrengst hebben aangetoond bij toevoeging van Tween-20 aan de media die worden gebruikt voor de extractie van filters en tijdens de LAL-assay, werden de effecten van Tween tijdens extractie en analyse ook apart onderzocht. Voor de vergelijking van vier media (PFW, PFW-Tween-20, PFW-Tris en PFW-triethylamine-fosfaat (TAP) en extractie gedurende 10 of 60 minuten werden 250 stofmonsters uit vijf werkomgevingen gebruikt. Een deel van de extracten van monsters die waren geëxtraheerd in PFW of PFW-Tween-20 (n=40) werden geanalyseerd in parallelle LAL-assays met PFW of PFW-Tween-20 als het analyse-medium. In vergelijking met de referentie-procedure (gebruik van PFW met 60 minuten schudden tijdens de extractie) gaven een kortere extractietijd of gebruik van PFW-Tris vergelijkbare resultaten. Het gebruik van PFW-TAP resulteerde in het algemeen in lagere opbrengsten en een afwijkende calibratiecurve. De aanwezigheid van Tween in het extractiemedium resulteerde in significant hogere endotoxinenopbrengsten voor alle soorten stof, onafhankelijk van het effect van Tween in de assay. Gebruik van Tween in de LAL-assay verminderde echter ook sterk de reactiviteit van de lipopolysaccharide (LPS) standaard, waardoor de calibratiecurve naar hogere waarden werd verschoven. De inhibitie van LPS in de feitelijke stofmonsters was minder uitgesproken en varieerde tussen de soorten stof, wat resulteerde in verhoogde berekende concentraties. Dit assay-effect kon worden voorkomen door de extracten minimaal 50x te verdunnen voor te analyseren in de LAL-assay. Er kan

worden geconcludeerd dat van de geteste media alleen het gebruik van Tween de efficiëntie van de extractie van endotoxinen op een consistente manier verhoogd.

Op basis van de resultaten van deze twee studies wordt het gebruik van glasvezelfilters in combinatie met transport met dehydratie, bevroren opslag van monsters, extractie in PFW + 0,05% Tween-20 met schudden, bevroren opslag van extracten, en verdunnen en LAL analyse in PFW aanbevolen. Deze studies voorzien in gegevens waarmee een protocol voor het standaardiseren van de beoordeling van blootstelling aan endotoxinen kan worden gespecificeerd.

In **hoofdstuk 5** worden de belangrijkste resultaten samengevat. Ook worden de consequenties van het huidige (nieuwe) grenswaardenstelsel voor de beheersing van werkgerelateerde blootstelling aan endotoxinen besproken. Dit stelsel is verschoven van alleen wettelijke grenswaarden naar een combinatie van publieke (wettelijke) en private grenswaarden. Op dit moment is het nog onbekend hoe dit nieuwe stelsel vorm zal krijgen en hoe het functioneren ervan in de gaten zal worden gehouden. Het is ook onduidelijk of werkgevers actief aan de gang zullen gaan met het vaststellen van private grenswaarden. In de hele discussie rond werkomstandigheden kunnen werkgevers ook kiezen voor 'goede praktijken' om gezondheidseffecten bij werknemers te voorkomen, waarbij beheersmaatregelen zeer belangrijk zijn voor het controleren/beheersen van blootstelling aan gevaarlijke stoffen. Daarvoor moet de effectiviteit van de voorgestelde beheersmaatregelen voor de reductie van blootstelling aan stof en endotoxinen worden onderzocht. Op dit moment is het nog onbekend tot welke categorie van het grenswaardenstelsel endotoxinen zal gaan behoren. In het geval van een private grenswaarde zouden in theorie vele verschillende grenswaarden voor endotoxinen naast elkaar kunnen bestaan. Echter, zowel de regering als de industrie kunnen de verwachte gezondheidskundige grenswaarde van de Gezondheidsraad gebruiken, welke hoger zou kunnen zijn dan de eerdere gezondheidskundige grenswaarde van 50 EU/m<sup>3</sup>. De industrie moet zich hoe dan ook inspannen om blootstelling aan endotoxinen te beheersen om zo zijn werknemers te beschermen. Deze inspanning kan worden vertaald in een actieplan en een onderzoeksagenda, bestaande uit:

1. Verhoging van het bewustzijn van de mogelijke gezondheidsrisico's die zijn verbonden met blootstelling aan endotoxinen, wat een belangrijke eerste stap is naar vermindering van de blootstelling;
2. Sommige onderwerpen die te maken hebben met de relatie tussen blootstelling en gezondheidseffecten vereisen extra onderzoek. Het gaat hierbij om specifieke onderwerpen, zoals variatie in reactie op blootstelling aan endotoxinen tussen mensen en tolerantie, en het onderzoeken van effecten veroorzaakt door chronische blootstelling;
3. Ontwikkeling van verbeterde protocollen voor de analyse van endotoxinen op basis van onze huidige inzichten;
4. Ontwikkeling van op maat gemaakte strategieën voor

de beoordeling van blootstelling, waarbij rekening wordt gehouden met de hoge variabiliteit in blootstelling;

5. Onderzoek naar determinanten van blootstelling en beheersmaatregelen. Determinanten van blootstelling, zowel tussen werknemers als over de tijd, kunnen dienen als startpunt voor beheersmaatregelen. Verder zou ook de effectiviteit van beheersmaatregelen moeten worden onderzocht.

Er kan worden geconcludeerd dat endotoxinen alomtegenwoordig zijn in de (werk)omgeving, en verschillende groepen werknemers worden blootgesteld aan hoge concentraties endotoxinen. Er is sprake van een hoge mate van variabiliteit in blootstelling, wat moet worden geaccepteerd en waar op de juiste manier mee moet worden omgegaan. In plaats van een politieke discussie die resulteert in stagnatie van de beheersing van blootstelling aan endotoxinen zou blootstelling aan endotoxinen moeten worden gezien als een potentieel risico voor de werkende bevolking en zou ook als zodanig moeten worden behandeld door deze blootstelling actief te monitoren en te beheersen en zo een gezonde werkomgeving te garanderen.

*Voor het hele proefschrift zie:*

*<http://igitur-archive.library.uu.nl>*