



Universiteit Utrecht

Onderzoek luchtkwaliteit in een gebied met veel
nertsenhouders: de Elsendorp studie

Institute *for*
Risk
Assessment
Sciences

Inge Wouters
Esmeralda Krop
Dick Heederik
Utrecht, april 2017

Samenvatting

In de gemeente Elsendorp bevinden zich veel verschillende typen veehouderij bedrijven waaronder ook veel nertsenhouders. Het is niet bekend hoe deze verschillende typen veehouderijen bijdragen aan de luchtkwaliteit in Elsendorp. Om dit te onderzoeken zijn er herhaald over een periode van 8 maanden twee-weeks gemiddelde fijnstof (PM10) metingen verricht op twee locaties in Elsendorp en twee locaties in het buiten gebied van Elsendorp. Ook zijn er metingen uitgevoerd bij verschillende typen veehouderij bedrijven in het gebied. De stofmetingen zijn onderzocht op endotoxine, koe-allergeen en nerts-antigeen. Daarnaast is onderzocht of er een allergische reactie tegen nertsallergenen aangetoond kan worden bij omwonenden van nertsenhouders.

Rond en in Elsendorp is blootstelling aan endotoxine en koe-allergeen afkomstig van veehouderijen meetbaar. Omdat het niet mogelijk was om een test voor het bepalen van nertsallergenen op te zetten door het ontbreken van voldoende nerts positieve sera is niet duidelijk of nertsallergenen ook meetbaar zouden zijn. De concentraties endotoxine en koe-allergeen waren gerelateerd aan nabijheid van veehouderijen respectievelijk rundveehouderijen in de omgeving. Voor endotoxine is dit in overeenstemming met de resultaten van het Veehouderij en Gezondheid Omwonenden (VGO) onderzoek. De gevonden associatie tussen hoogte van koe-allergeen concentraties en nabijheid van rundvee toont aan dat allergenen van dieren vanuit de veehouderij naar de omgeving kunnen verspreiden, ook bij veehouderij systemen met voornamelijk natuurlijke ventilatie. Van dierlijke allergenen is bekend dat deze reeds bij lage concentraties tot een allergische reactie kunnen leiden. Echter, er zijn geen gezondheidskundige grenswaarden of blootstellings-respons relaties voor koe-allergeen bekend. Uitspraken over gezondheidseffecten zijn daarom niet mogelijk.

Er zijn geen aanwijzingen voor een verhoogd risico op ontwikkeling van een allergische reactie tegen nertsen voor omwonenden van nertsenhouders. Echter het aantal deelnemers aan de VGO studie welke op zeer korte afstand van een veehouderij wonen en getest is, is heel beperkt, waardoor deze conclusie met de nodige onzekerheid omgeven is.

Inhoudsopgave

Inleiding	1
Achtergrond.....	1
Doelstelling.....	1
Methoden.....	2
Meetstrategie.....	2
Keuze meetlocaties	2
Informatie veehouderijen	3
Meetmethoden	3
Opzetten van een assay voor het meten van nertsallergeen in de lucht	3
Bulk stof monsters.....	3
Additionele analyse in PM10 samples van VGO locaties.....	4
Bepaling van een allergische respons tegen nertsallergeen in serum.....	4
Resultaten.....	4
Veehouderij rondom meetlocaties	4
Variatie luchtverontreinigende stoffen in ruimte en tijd.....	5
Relaties met bronnen	8
Voorkomen van IgE tegen nertsen	9
Discussie en conclusie.....	9
Literatuur.....	10
Bijlagen.....	13
Bijlage 1: Rapportage over het opzetten van een assay voor nertsallergenen	15
Opzetten van een assay voor het meten van nertsallergeen in de lucht	15
Verzamelen materiaal van nertsen	15
Verkrijgen van humaan bloed.....	15
Testen van humaan bloed op IgE, IgG en IgG4 tegen nertsen	17
Conclusie	18
Appendix 1:	19
Appendix 2:	23
Appendix 3: blots.....	27
Bijlage 2: Overzicht van concentraties luchtverontreinigende stoffen per meetlocatie	31
Bijlage 3 Reactiviteit van stofmonsters uit stallen van de diverse veehouderijen in de koe-allergeen bepaling.....	33

Inleiding

Achtergrond

In 2011 is het project “Intensieve Veehouderij en Gezondheid (IVG)” afgerond. In die studie werd een associatie beschreven tussen door de huisarts geregistreerd astma en nabijheid van nertsenhouders. Gesuggereerd werd dat allergeenblootstelling het in verhoogde mate voorkomen van astma zou kunnen verklaren [1]. Bij werknemers in nertsenhouders is in buitenlands onderzoek, gepubliceerd in de wetenschappelijke literatuur, nertsallergie beschreven [2-4].

In Elsendorp is sprake van een hoge nertsenhouders dichtheid. Onder de bewoners bestaat de nodige onrust over de aanwezigheid van nertsenhouders rond de gemeente en de mogelijke gezondheidsrisico's. In Elsendorp zijn in de afgelopen jaren meerdere malen vragen en klachten over overlast en mogelijke gezondheidseffecten in relatie tot emissies afkomstig van veehouderij en specifiek nertsenhouders gemeld. Met de huidige wetenschappelijke kennis over verspreiding, blootstelling en mogelijke relaties met gezondheidseffecten is het niet mogelijk om de vragen van omwonenden te kunnen beantwoorden. Op verzoek van de gemeente Gemert-Bakel zijn metingen uitgevoerd gericht op het bepalen van de concentraties nertsallergeen in de lucht in Elsendorp, indien er een test ontwikkeld kan worden om nertsallergeen te bepalen. Tevens zijn er ter vergelijking metingen verricht naar fijnstof (PM10), endotoxine (een bacteriecomponent) en koe-allergenen. Fijn stof en endotoxine zijn blootstellingsparameters die ook in de grootschalige studie Veehouderij en Gezondheid Omwonenden (VGO) zijn meegenomen. Koe-allergeen is onderzocht omdat het net als nertsallergeen een dierlijk allergeen is, en de dieren worden net als de nertsen in stallen gehouden met veelal alleen natuurlijk ventilatie. Er is een methode beschikbaar voor de bepaling van de hoeveelheid koe-allergeen in een monster. In de huidige studie is onderzocht in hoeverre de luchtkwaliteit in- en om de dorpskern van Elsendorp beïnvloed wordt door verschillende soorten veehouderij in de directe omgeving van de dorpskern.

Daarnaast is onderzocht of er een allergische reactie tegen nertsallergenen aangetoond kan worden bij omwonenden van nertsenhouders.

Doelstelling

Hoofddoel van het onderzoek luchtkwaliteit Elsendorp was inzicht te verkrijgen in variatie in ruimtelijke zin en over de tijd in gemeten concentraties luchtverontreinigende stoffen die afkomstig zijn van de diverse veehouderijbedrijven. Een sub-doelstelling was of de samenstelling van de luchtverontreinigende stoffen te relateren zijn aan de bronnen in de omgeving.

Om deze doelstellingen te onderzoeken zijn herhaalde blootstellingsmetingen uitgevoerd gericht op luchtverontreinigende stoffen in de buitenlucht bij woningen in Elsendorp, zogenaamde

immissiemetingen, en een aantal veehouderij bedrijven. Door middel van een meetonderzoek in de woonomgeving is inzicht verkregen in de bijdrage van verschillende dierhouderijen op de luchtkwaliteit in Elsendorp.

De volgende luchtverontreinigende componenten zijn betrokken in het onderzoek:

1. Fijnstof (PM10)
2. Endotoxine als een algemene marker voor bacteriële blootstelling en in hoge concentraties aanwezig in varkens- en pluimveehouderij.
3. Koe-allergenen als marker voor allergeen blootstelling van rundveehouderij
4. Nerts-antigenen als marker voor allergeen blootstelling van de nertsenhouderij

Voor de bepaling van PM10, endotoxine en koe-allergeen zijn bestaande methodes beschikbaar. Voor het bepalen van de concentraties nertsallergenen in de luchtmonsters is dit niet het geval. Hiervoor moest een methode ontwikkeld worden op basis van sera van werknemers uit de nertsenhouderijen met duidelijke allergische respons tegen nertsallergenen (zie methode sectie).

Een nevendoelstelling was gericht op het verkrijgen van inzicht in het voorkomen van een allergische respons tegen nertsen bij omwonenden van nertsenhouders. Hiervoor is onderzocht of er een allergische reactie tegen nertsallergenen aangetoond kan worden bij omwonenden van nertsenhouders. Dit is onderzocht bij deelnemers aan het VGO onderzoek die binnen een afstand van 250 meter van een nertsenhouderij woonachtig zijn.

Methoden

Meetstrategie

In een meetcampagne, die liep van mei 2015 tot december 2015, zijn herhaaldelijk tweeweeks-gemiddelde-metingen van PM10 verzameld. Dit is in totaal 10 maal gebeurd op 2 locaties in de woonkern van Elsendorp en op twee locaties bij bewoners in het buitengebied van Elsendorp, gelegen ten zuidwesten en ten noordoosten van de woonkern van Elsendorp. Tegelijkertijd is bij twee nertsenhouderijen gemeten gedurende dezelfde 10 twee-weekse periodes. Eén meetopstelling stond hierbij buiten in de buurt van de nertsenhouderij opgesteld, en één binnen in de nertsenhouderij. Daarnaast zijn ook drie tot vier keer herhaalde tweeweeks-gemiddelde PM10 metingen uitgevoerd bij andere veehouderijen, te weten buiten bij een varkenshouderij, buiten bij een pluimveehouderij en binnen bij een melkveehouderij.

Keuze meetlocaties

De meetlocaties in de woonomgeving zijn uitgekozen in en om Elsendorp. Er zijn twee locaties uitgekozen in de woonkern, en twee locaties die buiten de woonkern liggen. De laatste twee locaties bevonden zich ten zuidwesten en ten noordoosten van de woonkern.

De meetlocaties van de varkens-, pluimvee- en melkveehouderijen bevonden zich buiten de woonkern van Elsendorp in het buitengebied van Elsendorp, de nertsenhouderij-meetlocaties bevonden zich buiten de gemeente Elsendorp in een nabij gelegen gemeente.

Informatie veehouderijen

Voor iedere meetlocatie werden nabijheid en hoeveelheid van veehouderijen en dieraantallen in de omgeving berekend. Hiertoe werd gebruik gemaakt van 'Bestand Veehouderij Bedrijven', gegevensbestanden van de provincies Noord-Brabant en Limburg van het jaar 2015. Locaties van de meetpalen werden gegeocodeerd. Afstanden tussen meetlocaties en alle veehouderijen werden berekend met een geografisch informatiesysteem (ArcGis versie 9.03). Aantallen veehouderijen en dieraantallen in een buffer - cirkelvormige gebied met straal - van 1000m rondom de meetlocatie werden bepaald. Ook is de afstand tot het dichtstbijzijnde veehouderijbedrijf voor alle diertype bepaald.

Meetmethoden

Tweeweeks-gemiddelde metingen van PM10 zijn verzameld met een Harvard impactor (Air Diagnostics and Engineering Inc., Naples, ME, USA) verbonden met een pomp met een debiet van 10L/min. Het PM10 stof is opgevangen op Teflon filters van 37mm doorsnede (SKC, PTFE filter 2.0 µm pore size with PMP ring, USA).

De PM10 concentratie is bepaald door voor- en na-weging in een geconditioneerde weegkamer, gevolgd door het uitvoeren van een tweestaps extractie op de filters, eerst een extractie voor endotoxinen gevolgd door een extractie voor allergenen. Hierdoor is het mogelijk om zowel endotoxine als allergenen op ieder filter te bepalen. Deze methode is eerder beschreven [5]. Endotoxine-concentraties zijn bepaald door middel van het 'Limulus Amoebocyte Lysate assay' [6], koe-allergeen-concentraties zijn bepaald door het IPA in Bochum Duitsland, met behulp van een koe-allergeen-specifieke Enzyme Immuno Assay [7]. Omdat het niet mogelijk was een nerts-allergeenmethode te ontwikkelen (zie hieronder) heeft geen bepaling van nertsallergeen plaatsgevonden.

Opzetten van een assay voor het meten van nertsallergeen in de lucht

Voor het meten van nertsallergeen in de verzamelde luchtmonsters is geprobeerd een Inhibition Enzyme Immunoassay (EIA) op te zetten. Een immunoassay is een biochemische test waarmee de aanwezigheid en concentratie van een bepaald molecuul kan worden gemeten. De test is gebaseerd op het vermogen van antilichamen of Immunoglobulines om specifiek één type moleculen, in dit geval nertsallergenen, in een mix van moleculen te herkennen. Het is tot op heden helaas niet gelukt om deze test op te zetten. Het proces wat is doorlopen staat beschreven in bijlage 1.

Bulkstofmonsters

In de veehouderij bedrijven is een bulk-stofmonster verzameld door neergedwarreld stof in een buis te verzamelen. Dit stof is gebruikt om te onderzoeken of er kruisreactiviteit optreedt in de allergeenbepalingen.

Additionele analyse in PM10 samples van VGO locaties

Omdat er weinig bekend is over allergenen concentraties in de buitenlucht in de woonomgeving zijn de PM10 samples van de metingen in het VGO-onderzoek ten tijde van de metingen ten behoeve van het huidige onderzoek eveneens voor allergenen geëxtraheerd, en is de koe-allergeenconcentratie in de monsters bepaald.

Bepaling van een allergische respons tegen nertsallergeen in serum

Een allergische respons tegen nertsen bij omwonenden van nertsenhouders is onderzocht door het bepalen van antilichamen (immunoglobulines van het type E; IgE) tegen eiwitten van nertsen in het bloed van omwonenden. Via de Nederlandse Federatie Edelpelsdieren (NFE) hebben we verschillende soorten materiaal verzameld (vacht van de nertsen, haarplukken en uitwerpselen; zie bijlage 1). Eiwitten in deze materialen zijn in oplossing gebracht, en daarna gebruikt in de methode om antilichamen in serum die hiermee reageren aan te tonen volgens de methode beschreven door Doekes e.a. [8]

Deelnemers uit het VGO gezondheidsonderzoek die op een afstand van minder dan 250 wonen van een nertsenhouders zijn geselecteerd. Dit betrof 10 personen. Het serum van deze personen is getest op aanwezigheid van IgE antilichamen tegen nertsallergeen. Ter vergelijking en voor het opzetten van een methode om nertsallergenen in de lucht te meten is ook het bloed van 9 personen die beroepsmatig regelmatig aan nertsen blootgesteld zijn onderzocht op aanwezigheid van een allergische respons.

Resultaten

Veehouderij rondom meetlocaties

Het aantal veehouderijen in een straal van 1000m rondom de meetlocaties nabij de woningen betrokken in het meetonderzoek varieert tussen de 13 en 23, het merendeel hiervan zijn veehouderijen met als hoofdcategorie rund/melkveehouderij en varkenshouderij (Tabel 1). De afstand tot de dichtstbijzijnde veehouderij varieert tussen de 167 en 424 meter (Tabel 1). De nabijheid uitgesplitst naar diercategorie staat weergegeven in Tabel 1. De gegevens omtrent aantal en nabijheid voor de meetlocaties bij de veehouderijen staan eveneens in Tabel 1.

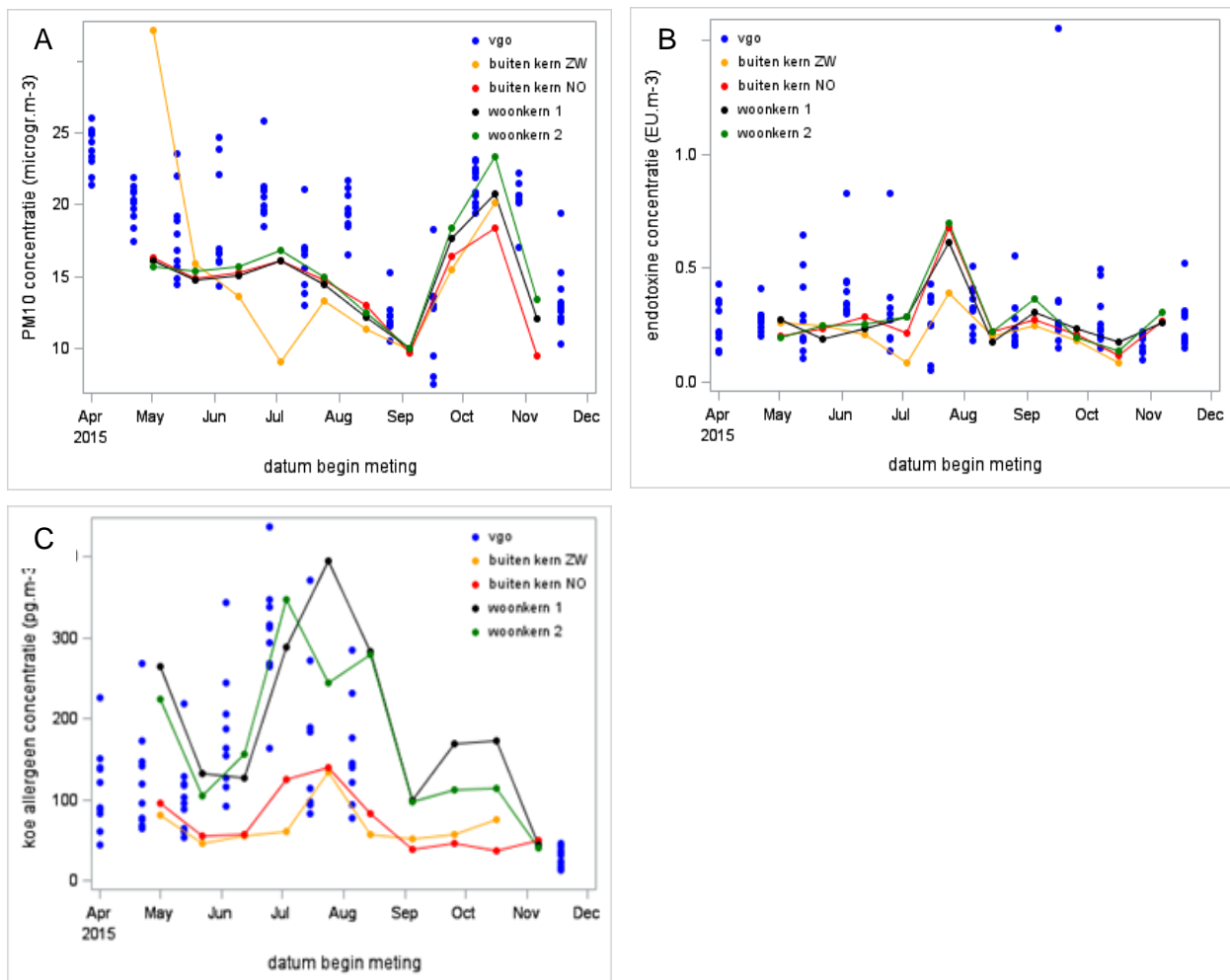
Variatie luchtverontreinigende stoffen in ruimte en tijd

Helaas was het niet mogelijk om met de verzamelde sera een test te ontwikkelen voor nertsallergenen (zie bijlage 1). Een te beperkt aantal personen had een voldoende sterke reactie tegen nertsantigenen. Daarom worden alleen concentraties PM10, endotoxinen en koe-allergeen gepresenteerd. Bijlage 2 geeft een volledig overzicht van de gemeten concentraties luchtverontreinigende componenten per meetlocatie. PM10-concentraties vertonen aanzienlijke variatie over de tijd. De PM10-concentraties in Elsendorp zijn vergelijkbaar met de concentraties gemeten in het VGO-onderzoek. De PM10-concentraties verschillen weinig tussen de locaties in Elsendorp (Figuur 1a). De endotoxineconcentraties gemeten in en nabij Elsendorp verschillen eveneens weinig tussen de locaties in Elsendorp en zijn vergelijkbaar met de concentraties

Tabel 1. Overzicht van aantal veehouderijen en de nabijheid van veehouderijen voor de meetlocaties bij de woningen.

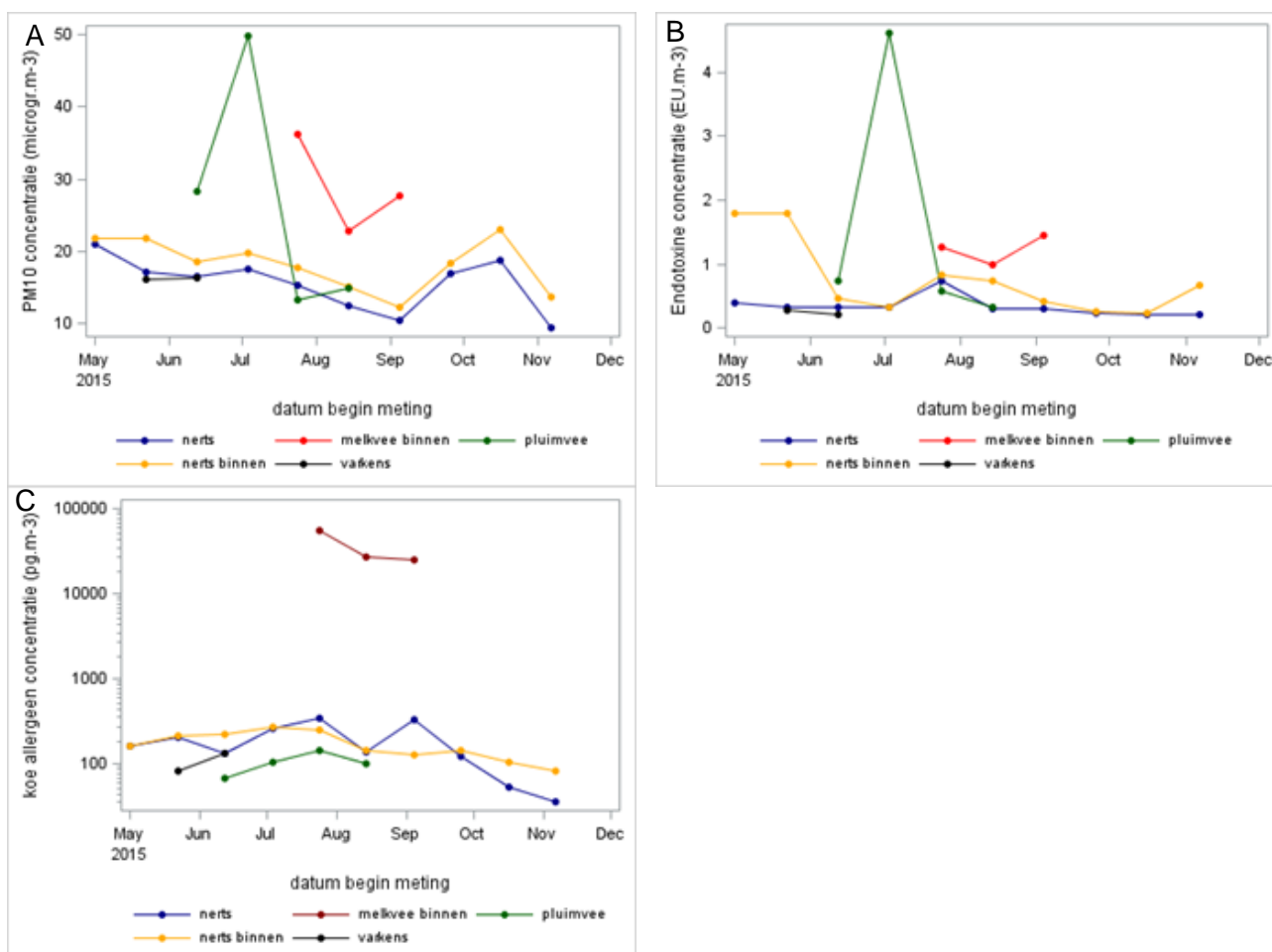
	Meetlocaties woningen				
	ZW buiten	NO buiten	dorp 1	dorp 2	
	dorp	dorp			
Aantal veehouderijen in radius 1000m:					
Alle veehouderijen	13	22	20	23	
Rundveehouderijen	3	6	8	7	
Varkenshouderijen	4	7	6	9	
Pluimveehouderijen	0	4	4	4	
Nertsenhouderijen	3	2	1	1	
Overige veehouderijen	3	3	1	2	
Afstand (in m) tot dichtstbijzijnde:					
Veehouderij	424	167	200	273	
Rundveehouderij	756	512	200	273	
Varkenshouderij	591	167	560	596	
Pluimveehouderij	-	383	552	441	
Nertsenhouderij	424	195	612	470	
	Meetlocaties veehouderijen				
	Nerts buiten	Nerts Binnen	Varkens buiten	Pluimvee buiten	Melkvee Binnen
Aantal veehouderijen in radius 1000m:					
Alle veehouderijen	15	21	24	27	19
Rundveehouderijen	7	9	8	8	6
Varkenshouderijen	4	7	9	12	5
Pluimveehouderijen	1	0	3	3	6
Nertsenhouderijen	3	4	1	1	1
Overige veehouderijen	0	1	3	3	1
Afstand (in m) tot dichtstbijzijnde:					
Veehouderij	<50	<50	<50	<50	<50
Rundveehouderij	666	286	635	446	<50
Varkenshouderij	508	202	<50	115	146
Pluimveehouderij	905	>1000	527	<50	298
Nertsenhouderij	<50	<50	316	371	956

gemeten in het VGO-onderzoek (Figuur 1b). Koe-allergeenconcentraties zijn in het algemeen ook vergelijkbaar met koe-allergeenconcentraties gemeten in het VGO-gebied. Opvallend is dat er stelselmatig hogere koe-allergeenconcentraties optreden bij de locaties in de dorpskern in vergelijking tot de concentraties buiten de dorpskern (Figuur 1c). Voor alle gemeten componenten geldt dat variatie over de tijd aanzienlijk is.



Figuur 1. Verloop van de concentraties PM10 (a), endotoxine (b) en koe-allergeen (c) over de tijd voor de meetlocaties nabij woningen in Elsendorp en in het VGO-onderzoeksgebied.

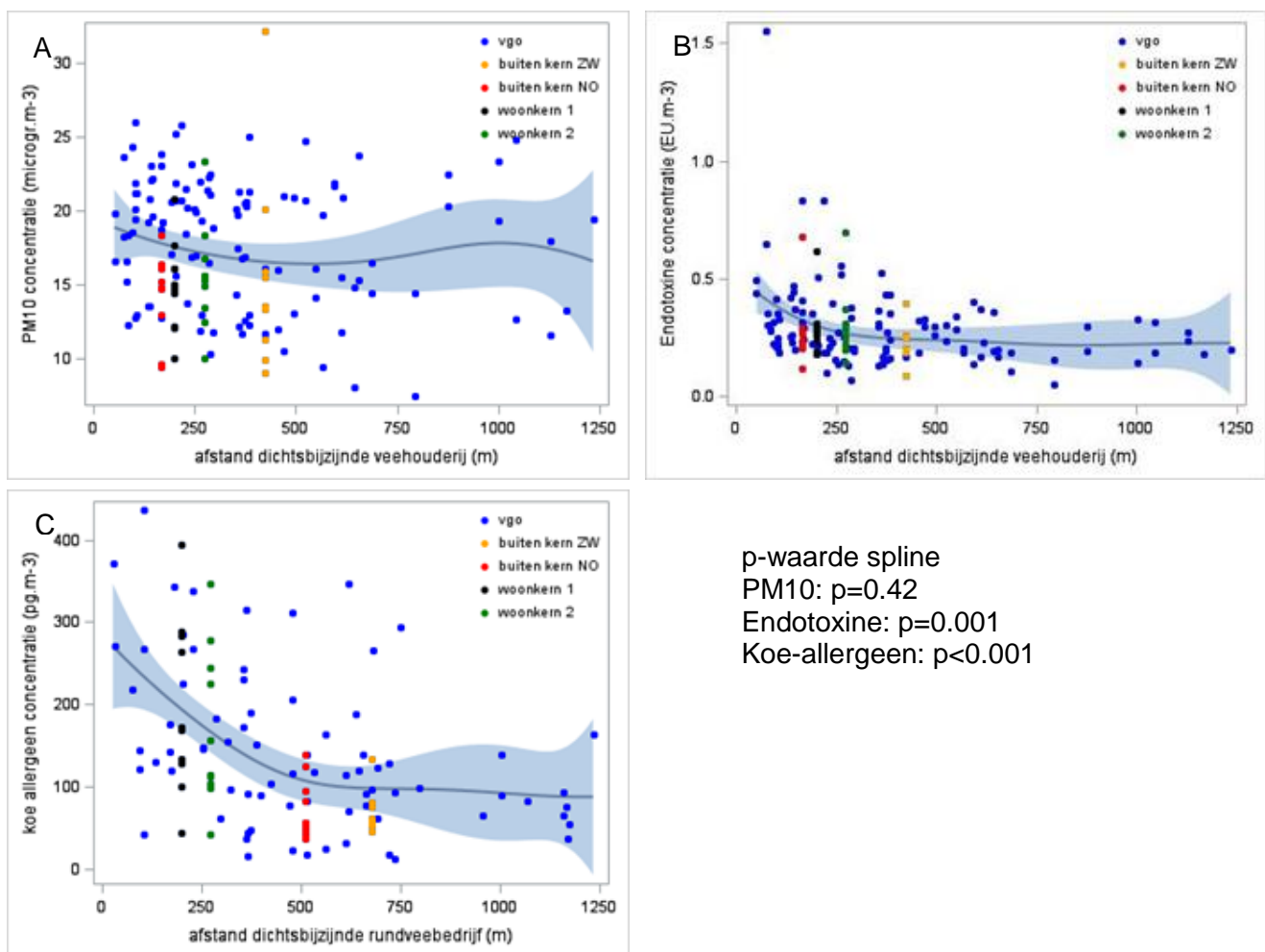
Figuur 2 vertoont het verloop over de tijd van de gemeten luchtverontreinigende componenten voor de meetlocaties bij de veehouderijbedrijven. De meetlocaties bevonden zich buiten de veehouderijbedrijven behalve bij één van de twee nertsenhouderijen en een melkveehouderij, alwaar binnen in de stal gemeten is. Voor de nertsenhouderijen geldt dat de concentraties van de gemeten componenten binnen in de nertsenhouderij veelal vergelijkbaar zijn met de concentraties gemeten buiten de nertsenhouderij. De PM10 en endotoxine concentratie is bij één van de metingen buiten de pluimveestal verhoogd. Koe-allergenen zijn duidelijk meetbaar in de melkvee-stal. Bij de andere locaties worden vergelijkbare koe-allergeenconcentraties gemeten, niveaus hiervan zijn vergelijkbaar als bij de metingen in de nabijheid van de woningen. Ook zijn de metingen binnen- en buiten de nertsenstal vrijwel gelijk, dit duidt erop dat er geen kruisreactiviteit optreedt in de koe-allergeenassay. Dit wordt bevestigd in de test naar het optreden van kruisreactiviteit in de koe-allergeenmeetmethode (zie bijlage 3).



Figuur 2. Verloop over de tijd van concentraties PM10 (a), endotoxine (b) en koe-allergeen (c) voor de meetlocaties bij nertsenhouderijen (binnen en buiten), pluimveehouderij (buiten), melkveehouderij (binnen) en varkenshouderij (buiten).

Relaties met bronnen

Relaties tussen PM10, endotoxine en koe-allergeen-concentraties in de woonomgeving en bronnen zijn onderzocht door een spline te fitten tussen de gemeten concentraties PM10, endotoxine en koe-allergenen en de afstand tot dichtstbijzijnde veehouderij. Voor PM10 en endotoxine is hiervoor geen onderscheid gemaakt in type veehouderij, terwijl voor koe-allergeen de afstand tot dichtstbijzijnde veehouderijbedrijf met rundvee onderzocht is. De PM10 concentratie vertoont geen duidelijke relatie met nabijheid van veehouderij bedrijf, endotoxine en koe-allergeenconcentraties daarentegen wel (Figuur 3). Endotoxine- en koe-allergeenconcentraties zijn in meer variabel wanneer de eerste veehouderij dichterbij gelegen is, en ook zijn de concentraties gemiddeld hoger.



Figuur 3. Relaties tussen PM10- (A), endotoxine-(B) en koe-allergeen (C)- concentraties met afstand tot de dichtstbijzijnde veehouderij. Figuren tonen de waargenomen concentraties en de gefitte splines (blauwe lijn) met 95% betrouwbaarheidsinterval.

Vóórkomen van IgE tegen nertsen

Bij de 10 deelnemers van VGO studie die het dichtst bij een nertsenhouderij wonen (max. 250 meter) is geen allergische respons tegen nerts allergenen in het bloed aanwezig. Van de 9 personen die beroepsmatig regelmatig met nertsen in contact komen werd bij één persoon een geringe allergische reactiviteit waargenomen. Deze persoon met veel contact met nertsen was licht positief voor IgE tegen nertsallergeen.

Discussie en conclusie

De resultaten van het onderzoek naar blootstellingen van aan veehouderij gerelateerde componenten suggereren dat zowel in het VGO-onderzoeksgebied als specifiek in Elsendorp blootstelling aan endotoxine en allergenen van veehouderijen meetbaar zijn. Of dit ook geldt voor van nertsenhouderij afkomstige componenten zoals allergenen is niet te zeggen, omdat het niet mogelijk was om een test voor het bepalen van nertsallergenen op te zetten door het ontbreken van positieve sera.

Er lijkt geen evident verhoogd risico aanwezig op ontwikkeling van een allergische reactie tegen nertsen voor omwonenden van nertsenhouderijen. Echter het aantal deelnemers aan de VGO studie welke op zeer korte afstand van een veehouderij wonen en getest is, is beperkt, waardoor enige terughoudendheid geboden is. Voor andere dierallergenen, bijvoorbeeld van rat en muis, is bekend dat blootstelling aan reeds zeer lage concentraties van allergenen het risico op ontwikkeling van een allergische reactie verhoogd. Of dit ook geldt voor nertsallergenen en ontwikkeling van allergische reacties is echter niet bekend. Er zijn geen blootstelling-respons relaties voor nertsallergeen beschreven.

Concentraties endotoxinen zijn vergelijkbaar met de in het VGO-gebied waargenomen concentraties en de eerder in het IVG-onderzoek gerapporteerde endotoxine concentraties [1]. Endotoxine concentraties zijn geassocieerd met nabijheid van veehouderij. Opvallende uitkomst is dat koe-allergeen-concentraties in PM10 meetbaar zijn, welke verhoogd zijn naarmate een veehouderij waar koeien gehouden worden zich meer nabij de woning bevindt. In een eerdere studie in de Verenigde Staten werd reeds eerder gevonden dat concentraties van het koe-allergeen Bos d 2 verhoogd is in luchtmonsters bij woningen op afstanden <400m van een melkveebedrijf ten opzichte van woningen op grotere afstand > 4.8 km van een melkvee bedrijf. Dit werd zowel voor buitenlucht als binnenlucht gerapporteerd. [9] In een andere publicatie laat deze groep zien dat eenzelfde trend ook gevonden wordt voor koe-allergeen en endotoxinen, maar niet voor muisallergeen in neergedwarreld stof buiten en binnen de woningen, wat suggereert dat daadwerkelijk de veehouderij hierin een belangrijke rol speelt [10]. De gevonden koe-allergeen-concentraties in deze studie en de Amerikaanse studie kunnen niet één op één vergeleken worden. De Amerikaanse studie heeft totaal stof verzameld, wat ook deeltjes groter dan 10 micrometer omvat. Het PM10 stof omvat slechts een deelfractie van het totaal stof. Daarnaast zijn de bepalingsmethodes voor koe-allergeen verschillend, de Amerikaanse studie meet alleen het major koe-allergeen Bos d2, terwijl de in deze studie gebruikte methode ook andere koe-allergenen meet. Zahradnik toonde eerder aan dat Bos d2 concentraties goed correleren met de koe-allergeen-concentraties in de gebruikte onderzoeksmethode, maar het

absoluut niveau van koe-allergeenconcentraties is circa een factor 5 lager dan Bos d2 concentraties [7].

Er zijn geen andere omgevingsbronnen van koe-allergeen bekend dan rundveebedrijven en mogelijk ook de toepassing van rundveemest op het land. Dat koe-allergeenconcentraties gerelateerd zijn aan afstand tot de veehouderij suggereert dat het allergeen zich via de lucht vanuit de veehouderij in de omgeving kan verspreiden. Extracten van materiaal van koeien bevat net als de nertspreparaten, meerdere eiwitten variërend in grootte tussen 14 en 100 kiloDalton (kDa). Het major koe-allergeen Bos d 2 is circa 20 kDa groot, maar eiwitten van andere grootte (14, 30, 55 en 67–97 kDa) vertonen ook allergene activiteit [11]. Eiwitgroottes in extracten van nerts materiaal zijn in de zelfde orde van grootte. Dit zou dus kunnen betekenen dat ook deze zich in de omgeving kunnen verspreiden.

Wat zegt het feit dat verhoogde koe-allergeenconcentraties gemeten kunnen worden in de lucht in de woonomgeving voor mogelijke gezondheidsrisico's onder omwonenden? Van allergenen is bekend dat deze reeds bij lage concentraties tot sensibilisatie kunnen leiden. Dit is met name bekend van studies bij proefdierwerkers met knaagdieren. Maar ook koe-allergeensensibilisatie leidend tot luchtwegproblemen is eerder beschreven voor melkveehouders [12], en hoge Bos d 2-concentraties in stof blijken te correleren met de mate van sensibilisatie [13]. Bovendien, is er een verhoogd risico op ontwikkeling van allergie voor gezinsleden van proefdierwerknemers gerapporteerd als gevolg van transport van proefdierallergenen naar de woonomgeving, wat suggereert dat sensibilisatie ook bij reeds zeer lage concentraties kan optreden [14]. Er zijn geen blootstelling respons relaties voor koeallergeen beschreven. Gezondheidskundige grenswaarden kunnen daarom niet afgeleid worden en dus zijn uitspraken over gezondheidseffecten niet mogelijk.

Literatuur

1. Heederik, D. and J. Yzermans, *Mogelijke effecten van intensieve veehouderij op de gezondheid van omwonenden.*, 2011: Utrecht.
2. Savolainen, J., et al., *IgE response to fur animal allergens and domestic animal allergens in fur farmers and fur garment workers.* Clin Exp Allergy, 1997. **27**(5): p. 501-9.
3. Uitti, J., et al., *IgG4 response to fur animal allergens among fur workers.* Int Arch Occup Environ Health, 2005. **78**(1): p. 71-4.
4. Uitti, J., et al., *Respiratory symptoms, pulmonary function and allergy to fur animals among fur farmers and fur garment workers.* Scand J Work Environ Health, 1997. **23**(6): p. 428-34.
5. Schram, D., et al., *Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children--the PARSIFAL Study.* Allergy, 2005. **60**(5): p. 611-8.
6. Spaan, S., et al., *Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin.* Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(12): p. 3804-11.
7. Zahradnik, E., et al., *Development of a sandwich ELISA to measure exposure to occupational cow hair allergens.* Int Arch Allergy Immunol, 2011. **155**(3): p. 225-33.

8. Doekes, G., et al., *Enzyme immunoassays for total and allergen specific IgE in population studies*. *Occup Environ Med*, 1996. **53**(1): p. 63-70.
9. Williams, D.L., et al., *Airborne cow allergen, ammonia and particulate matter at homes vary with distance to industrial scale dairy operations: an exposure assessment*. *Environ Health*, 2011. **10**: p. 72.
10. Williams, D.A., et al., *Cow allergen (Bos d2) and endotoxin concentrations are higher in the settled dust of homes proximate to industrial-scale dairy operations*. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2016. **26**(1): p. 42-7.
11. Heutelbeck, A.R., et al., *Exposure to allergens of different cattle breeds and their relevance in occupational allergy*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2009. **82**(9): p. 1123-31.
12. Ylonen, J., et al., *IgG and IgE antibody responses to cow dander and urine in farmers with cow-induced asthma*. *Clin Exp Allergy*, 1992. **22**(1): p. 83-90.
13. Hinze, S., et al., *Cow hair allergen (Bos d 2) content in house dust: correlation with sensitization in farmers with cow hair asthma*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997. **112**(3): p. 231-7.
14. Krakowiak, A., B. Szulc, and P. Gorski, *Allergy to laboratory animals in children of parents occupationally exposed to mice, rats and hamsters*. *Eur Respir J*, 1999. **14**(2): p. 352-6.

Bijlagen

Bijlage 1: Rapportage over het opzetten van een assay voor nertsallergenen

Opzetten van een assay voor het meten van nertsallergeen in de lucht

Voor het meten van nertsallergeen in de verzamelde luchtmonsters kan een Inhibition Enzyme Immunoassay (EIA) opgezet worden. Een immunoassay is een biochemische test waarmee de aanwezigheid en concentratie van een bepaald molecuul kan worden gemeten. De test is gebaseerd op het vermogen van antibodies of immunoglobulines om specifiek één type moleculen, in dit geval nertsallergenen, in een mix van moleculen te herkennen.

Voor het opzetten van zo een assay is het noodzakelijk om deze specifieke immunoglobulines te hebben, verkregen uit humaan bloed. Ook is materiaal van de bron, in dit geval de nerts, nodig om de immunoglobulines aan te tonen en om de assay te kalibreren.

Verzamelen materiaal van nertsen

Via de Nederlandse Federatie Edelpelsdieren (NFE) hebben we verschillende soorten materiaal verzameld:

- Pootjes van nertsen (voor de vacht)
- Haarplukken uit de tralies van de kooien
- Uitwerpselen

Het kooihaai is verdeeld in grof haar en fijn haar. Van alle materialen zijn extracten gemaakt die zijn gedialyseerd. Van vacht die van de pootjes is geschraapt zijn verschillende extracten gemaakt die iets verschillen in methodes voor het extraheren. Ieder extract is over een gel gescheiden in eiwitten van verschillende grootte en gekleurd met een zilverkleuring. Uitleg over de extractie, gel en kleuring alsmede foto's van deze gels zijn te vinden in appendix 1. Ook staan daar per extract de geïdentificeerde eiwitgroottes. Het materiaal van de nerts bevat verschillende eiwitten in de grootte van 5 tot 115 kDa.

Verkrijgen van humaan bloed

Voor het opzetten van de humane Inhibitie EIA is humaan bloed met voldoende immunoglobulines tegen nertseiwitten noodzakelijk. In eerste instantie hebben we geprobeerd bloed te krijgen van mensen met een mogelijke allergische reactie tegen nertsen. Deze mensen zullen hoogstwaarschijnlijk immunoglobulines (Ig) van het type E in hun bloed hebben. In de

literatuur zijn allergische reacties en IgE tegen nertsen beschreven (1, 2). Uit gesprekken met NFE en met een (bedrijfs)longarts bleek dat er een klein aantal mensen met allergische klachten bekend waren. Via een oproep in het vakblad van de NFE hebben we geprobeerd om van deze mensen een bloedmonster te verkrijgen. We hebben n.a.v. deze oproep met 1 potentiële deelnemer contact gehad maar bij nader inzien heeft deze persoon zich teruggetrokken. Via de genoemde bedrijfsarts hebben we contact gezocht met een ander persoon maar ook deze persoon wilde niet meewerken aan het onderzoek.

De genoemde immunoassay hoeft niet noodzakelijkerwijs opgezet te worden met IgE. Ook Ig van het type G of het type G4 (IgG of IgG4) volstaan. De meeste mensen maken IgG of IgG4 aan bij herhaald contact met een allergeen. Zo hebben eigenaars van katten vaak hoge niveaus IgG(4) tegen kat in hun bloed. Voor het opzetten van een test met IgG is bloed nodig van mensen met veelvuldig contact met nertsen. Niet iedereen maakt veel IgG aan maar we verwachtte dat als we 5 tot 10 bloeddonoren met veelvuldig contact met nertsen vermoedde we toch zeker 3 goede monsters bij zouden zitten. Opnieuw is via de NFE contact gezocht met nertshouders voor bloedsamples. Ook hebben we bij de nertsenhoudereien die voor de luchtmetingen zijn bezocht benaderd. Ondanks veelvuldig contact is het niet gelukt om via deze weg donoren te vinden. Via de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht is ook er ook contact geweest met een nertshouder die betrokken is bij het onderwijs van de UU. Deze nertshouder heeft deelname in overweging genomen maar besloot niet deel te nemen. Er melde zich wel een medewerker van de faculteit Diergeneeskunde en een student, met beide in het verleden veelvuldig nertscontact. Van alle twee is een bloedmonster verkregen. Via een ander onderzoek binnen het IRAS (naar antibioticagebruik) is er ook nog contact geweest met een groep dierenartsen gespecialiseerd op nertsen maar ook hier werd afgezien van deelname aan dit onderzoek. Via de gemeente Gemert-Bakel zijn we in contact gekomen met 4 medewerkers van de Omgevingsdienst Brabant die voor hun werk nertsenhoudereien bezoeken. Hoewel deze mensen geen veelvuldig contact met nertsen hebben, hebben we toch bloed afgenomen. Via deze mensen zijn we in contact gekomen met 2 nertsenhouders en 1 medewerker van een nertsenhouderei die ook hun medewerking aan het onderzoek hebben verleend. In totaal zijn dus 9 sera op IgE en IgG4 voor nertsen getest, waarvan 3 sera van mensen met daadwerkelijk regelmatig contact met nertsen.

In de literatuur kwamen we een artikel tegen van een Finse groep die onderzoek heeft gedaan naar allergische klachten bij bontbewerkers (2). In dit artikel beschreven ze testen gedaan met serum. We hebben ook nog contact opgenomen met deze onderzoeksgroep om na te gaan of

we gebruik konden maken van bloedsamples uit deze studie. Helaas waren deze samples niet meer aanwezig.

Testen van humaan bloed op IgE, IgG en IgG4 tegen nertsen

De negen hierboven genoemde bloedsamples zijn getest op IgE, IgG en IgG4 tegen nertsen.

Daarnaast hebben we onder de deelnemers van VGO de 10 mensen geselecteerd die het dichtst bij een nertsenhouderij woonden (max. 250 meter). Deze sera zijn ook getest op IgE, IgG en IgG4. Ook zijn 128 bloedsamples die voor routine-allergieonderzoek naar ons lab zijn gestuurd meegenomen in deze test.

Eén serum van iemand met veel nertscontact was licht positief voor IgE tegen nertsallergeen. Dit IgE was echter te laag voor het ontwikkelen van een test op basis van IgE.

In de testen voor IgG en IgG4 tegen nertsallergeen was één van de sera van de mensen met veelvuldig contact sterk positief voor IgG4. Onder de 128 geteste random bloedsamples reageerden 5 samples voldoende positief op nertsallergeen. Deze sera waren echter ook allemaal positief voor rundallergeen.

Als deze sera gebruikt worden in een methode om de blootstelling te meten, moeten we zeker weten dat er geen kruisreactiviteit is tussen koeallergeen en nertsallergeen in specifiek deze sera. Vandaar dat er inhibitietesten zijn uitgevoerd met de 5 sera die voldoende positief reageerden. Met zo een test wordt gekeken of het IgG4 tegen nertsallergeen kan worden geremd door de aanwezigheid van koeallergeen en andersom. Voor de zekerheid zijn ook andere allergenen, zoals melkeiwit, paardallergeen en graspollen meegenomen in deze test. In appendix 2 staan de resultaten van de inhibitietesten. Hieruit blijkt dat het nerts-IgG4 van deze 5 donoren sterke kruisreactiviteit vertonen met vooral koeallergenen en dus niet geschikt zijn voor het opzetten van een Inhibitie EIA.

De kruisreactiviteit zal mogelijk te maken hebben met IgG4 tegen koealbumine. Albumine is een molecuul uit het serum van ca. 66.5 kDa groot. M.b.v. een immunoblot, een techniek om de reactiviteit van IgE, IgG of IgG4 voor een specifiek eiwit aan te tonen, zal nog worden nagegaan of het IgG4 zowel op nertsalbumine als op koealbumine reageert.

Het sterk positieve serum vertoonde weinig reactiviteit met het koeallergeen maar voor de zekerheid hebben we het IgG4 van dit serum getest op eiwitten uit nertschaar, koe-haar/huidschilfers, BSA (serumalbumine van koe) en varkens-haar/huidschilfers. Zoals in appendix 3 is te zien, is het bandje waar de reactie met nerts te zien is, ook aanwezig in de andere geteste stoffen. Hierdoor is het serum helaas ook niet geschikt voor een goede test. Als

dit serum gebruikt zou worden in een test is het niet met zekerheid te zeggen dat wat we meten afkomstig is van nerts. Het zou ook van varken of koe afkomstig kunnen zijn.

Conclusie

Het is tot op heden niet gelukt sera te bemachtigen die geschikte Ig-antistoffen bevatten specifiek tegen nertsallergeen. Hierdoor is het niet mogelijk een test op te zetten om het nertsallergeen in de luchtmonsters te meten.

Referenties:

- 1 Astma ved arbejde med mink (Asthma among mink workers). Grøntved B, Carstensen O, Petersen R, Sherson D. Ugeskr Laeger. 2014;176(40).
- 2 IgE response to fur animal allergens and domestic animal allergens in fur farmers and fur garment workers. Savolainen J, Uitti J, Halmepuro L, Nordman H. Clin Exp Allergy. 1997;27(5):501-9.

Appendix 1: SDS-PAGE Gels

Methode:

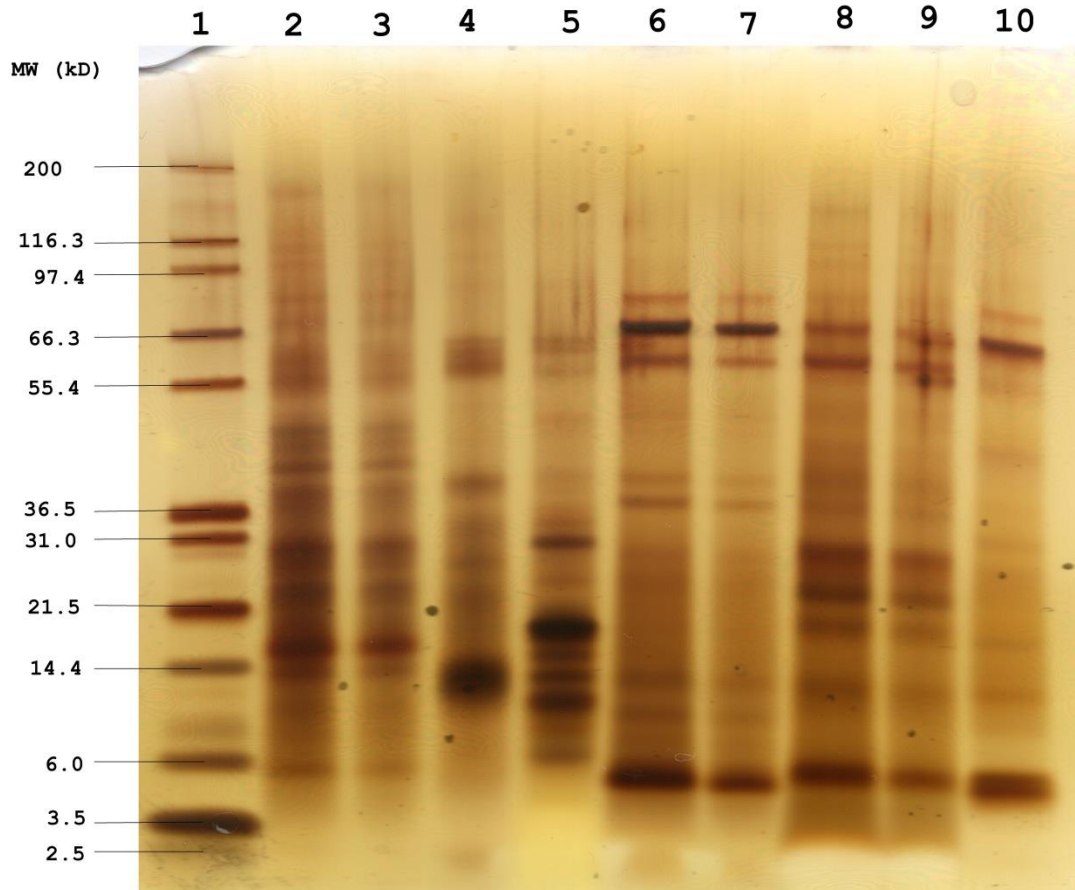
SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) is een elektroforesetechniek om eiwitten te scheiden op basis van hun molecuulgewicht (grootte).

Aan het monster natriumdodecylsulfaat (SDS) toegevoegd. SDS denatureert de eiwitten en geeft een negatieve lading aan de eiwitten in het monster, in verhouding tot de lengte van het eiwit- dat wil zeggen: de gedetermineerde eiwitten worden "staven" van negatieve ladingswolk met gelijke lading of ladingsdichtheid per eenheidslengte. Als een eiwit in het monster uit meerdere onderdelen bestaat, zorgt het SDS er ook voor dat de onderdelen waaruit het eiwit bestaat van elkaar gescheiden worden. Het monster wordt op een polyacrylamide gel aangebracht en er wordt een spanning op de gel gezet. Na verloop van tijd zullen de geladen moleculen zich gaan bewegen in de gel, en vindt er een scheiding plaats. Tevens wordt er een "ladder" op de gel gezet, een monster met bekende stoffen met een bekend molecuulgewicht. Om de bandjes van de eiwitten zichtbaar te maken, wordt de gel gekleurd met een zilveroplossing. M.b.v. de ladder kan het molecuulgewicht van de bandjes worden geschat.

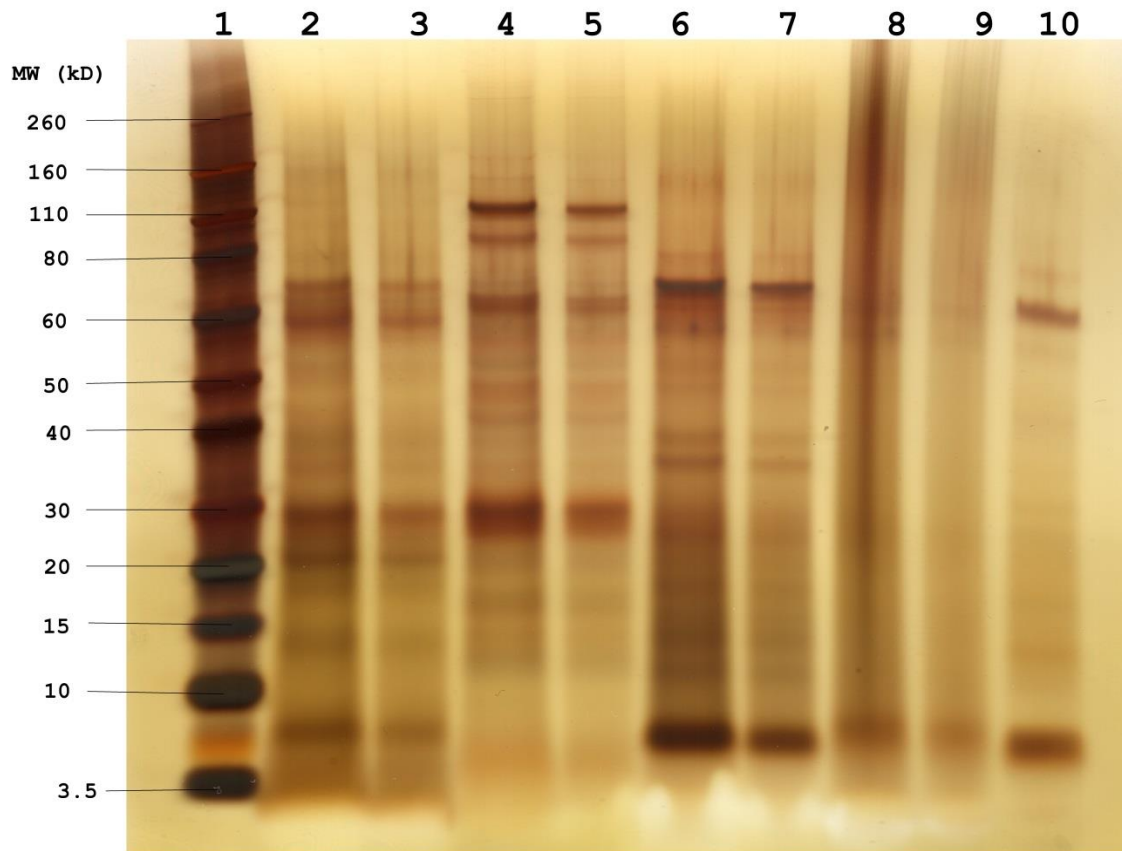
Resultaten:

Op de volgende pagina's staan de plaatjes van de gels.

Gel 1



- Lane 1; MW 12 1:15 7 μ l
- Lane 2; HDM extract 0.50 μ g protein
- Lane 3; HDM extract 0.25 μ g protein
- Lane 4; Gras pollen 2 extract mix 0.33 μ g protein
- Lane 5; Birch pollen extract 0.42 μ g protein
- Lane 6; Mink fur extract 1 0.50 μ g protein
- Lane 7; Mink fur extract 1 0.25 μ g protein
- Lane 8; Mink cage hair fine extract 1.75 μ g protein
- Lane 9; Mink cage hair fine extract 0.88 μ g protein
- Lane 10; Mink fur extract water dialysate supernatant 1.00 μ g protein



Gel 2

- Lane 1; Pre Stained Marker 2.5 μ l
- Lane 2; Mink cage hair large extract 1.50 μ g protein
- Lane 3; Mink cage hair large extract 0.75 μ g protein
- Lane 4; Mink manure extract 0.50 μ g protein
- Lane 5; Mink manure extract 0.75 μ g protein
- Lane 6; Mink fur extract 2 0.50 μ g protein
- Lane 7; Mink fur extract 2 0.25 μ g protein
- Lane 8; Mink fur extract water dialysate sediment 0.25 μ g protein
- Lane 9; Mink fur extract water dialysate sediment 0.12 μ g protein
- Lane 10 Mink fur extract water dialysate supernatant 0.50 μ g protein

De volgende eiwitgroottes zijn geïdentificeerd:

Nertsvacht: ~ 5 kDa, 10 kDa, 13 kDa, 37 kDa, 40 kDa, 61 kDa, 66 kDa en 73 kDa

Fijn kooihaar: ~ 5 kDa, 13 kDa, 20 kDa, 23 kDa, 30, kDa, 37 kDa, 40 kDa, 61kDa en 66 kDa

Grof kooihaar: ~ 5 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 60 kDa en 73 kDa

Uitwerpselen: ~ 30 kDa, 42 kDa, 49 kDa, 52 kDa, 61 kDa, 66 kDa, 95 kDa en 115 kDa

Conclusie:

De materialen verkregen van de nerts bevatten verschillende eiwitten die qua grootte als allergeen zouden kunnen functioneren. Het bandje van ~ 66 kDa is in de extracten van de vacht het sterkst aanwezig en is waarschijnlijk albumine.

Appendix 2: Inhibitietesten

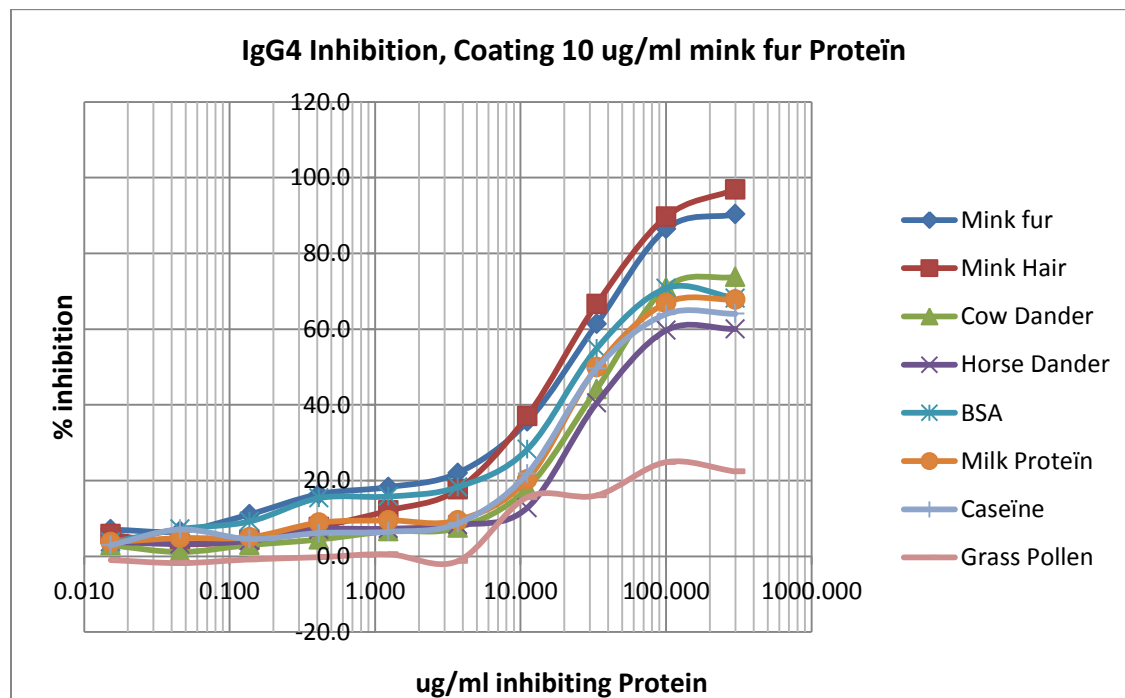
Methode:

Voor het bepalen van mogelijk kruisreactief reageren van een serumsample op koe- en nertseiwitten, wordt de test naar nerts-specifiek IgG4 uitgevoerd in de aanwezigheid van koe-eiwitten. Als er IgG4 aanwezig is dat zowel op de koe- als op de nertseiwitten kan reageren, wordt de uitslag van de nerts-specifieke IgG4 test minder in de aanwezigheid van koe-eiwitten. Er wordt ook gekeken naar kruisreactiviteit met andere allergenen zoals paard, melk en graspollen.

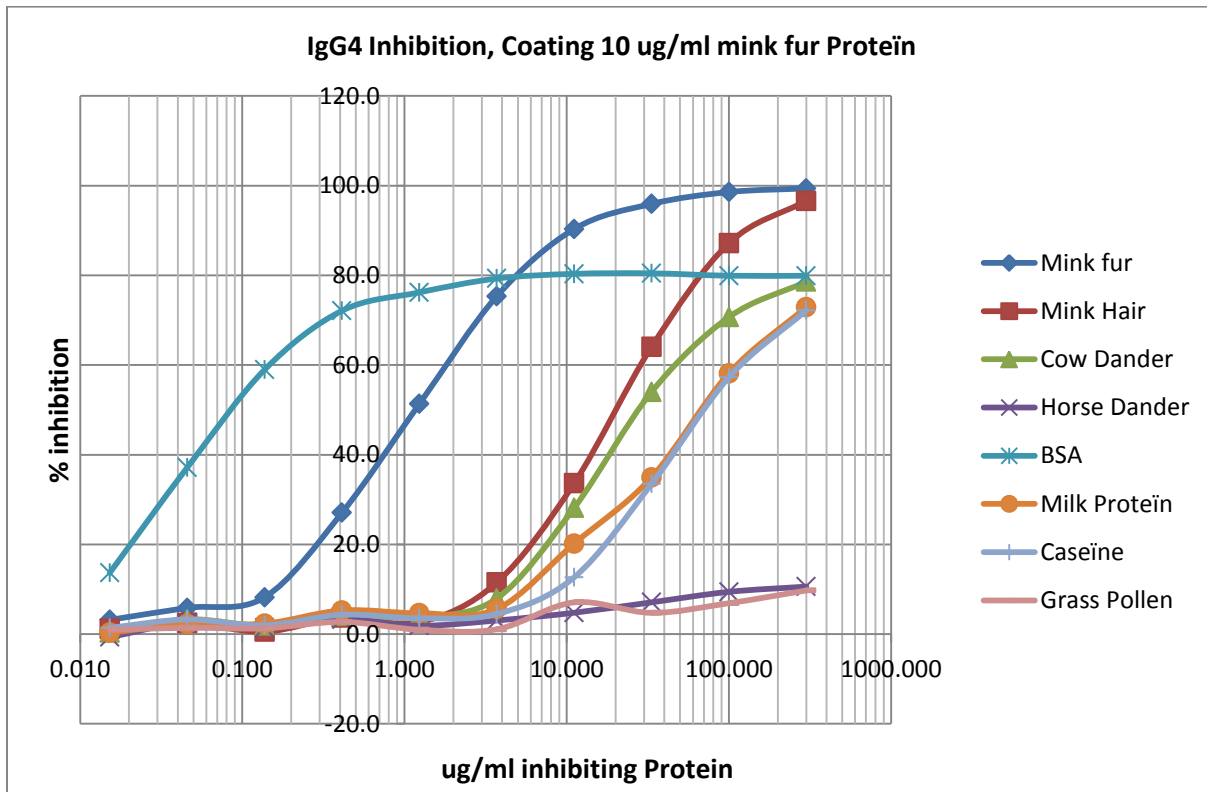
Resultaten:

In grafiek 1 en 2 staan de uitslagen van 2 verschillende sera die representatief zijn voor de 5 geteste sera.

Grafiek 1:



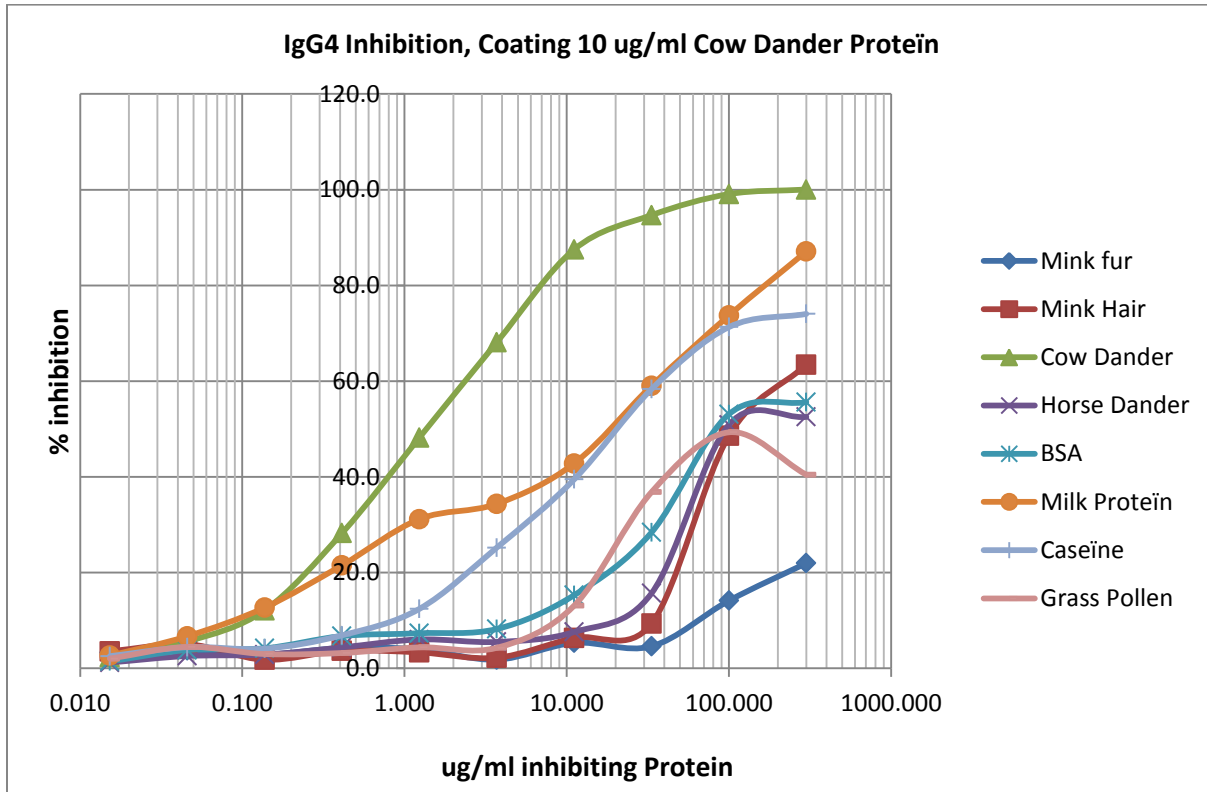
Grafiek 2:



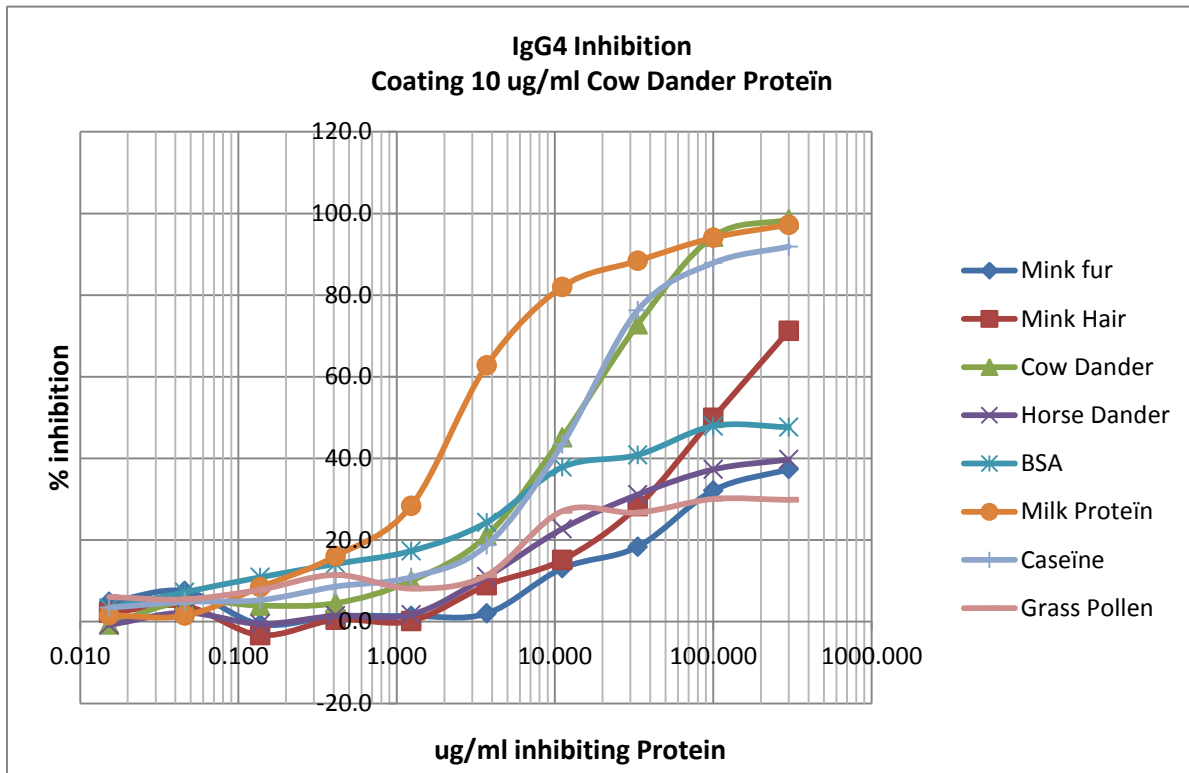
Het is te zien dat vooral BSA (Bovine Serum Albumine, albumine uit runderen) de reactie van de nerts-specifieke IgG4 remt maar ook melkeiwitten (wat ook rundereiwitten zijn), koevacht en in sommige gevallen vacht van paard tonen kruisreactiviteit met het IgG4 tegen nerts. Dit toont aan dat het gevonden IgG4 niet specifiek tegen nerts is.

De testen zijn ook andersom uitgevoerd (koe-reactie remmen met nerts materiaal). Dat is te zien in grafiek 3 en 4:

Grafiek 3:



Grafiek 4:



In deze grafieken is te zien dat nerts materiaal de reactie op de koetest veel minder remt, wat nogmaals bewijst dat de gevonden IgG4's niet specifiek zijn voor nerts. Waarschijnlijk hebben de mensen waarvan deze sera afkomstig zijn een sterke reactie tegen koe- en/of melkeiwitten en reageren ze door de gelijkenis van enkele eiwitten ook op de nertstest. Mogelijk reageren deze mensen op koe-albumine, wat een sterke gelijkenis heeft met albumine van andere diersoorten.

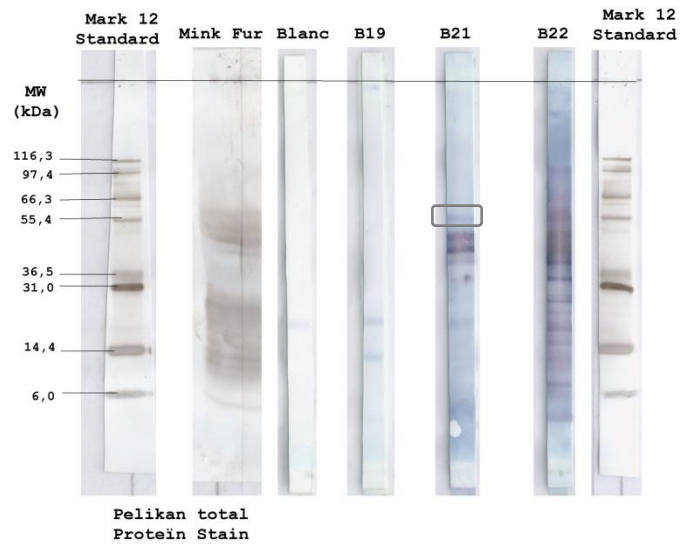
Conclusie:

De sera die positief reageerden op de nertstest zijn niet positief voor nerts-specifiek IgG4 maar vertonen sterke kruisreactiviteit met koe-eiwitten. Deze sera zijn niet te gebruiken in een test om nertsallergieën aan te tonen.

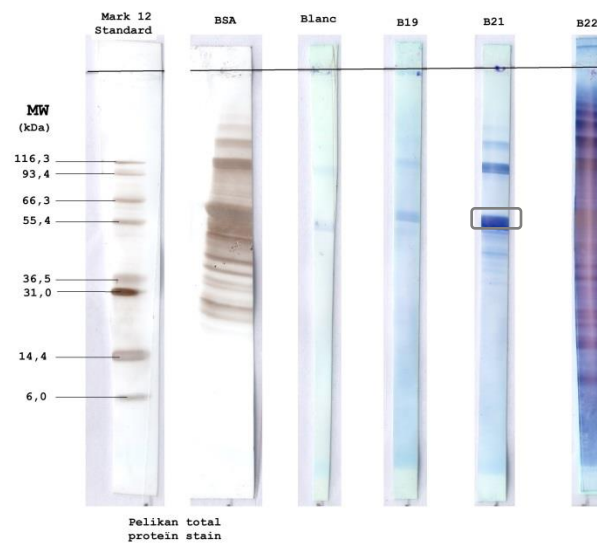
Appendix 3: IgG4-immunoblots

Het IgG4 van serum B21 reageert duidelijk op een eiwit van ca. 55 kDa van de nerts. Dit zelfde bandje is echter ook te zien bij materiaal van varkens (pig), koe (cow) en BSA (serumalbumine van koe). Ook andere bandjes komen overeen, dat er op duidt dat er kruisreactiviteit is en het IgG4 niet specifiek is voor nerts. Controle-serum B19 is negatief in IgG4 en serum B22 reageert heel veel eiwitten, ook op koe en varken (duidelijk veel bandjes te zien).

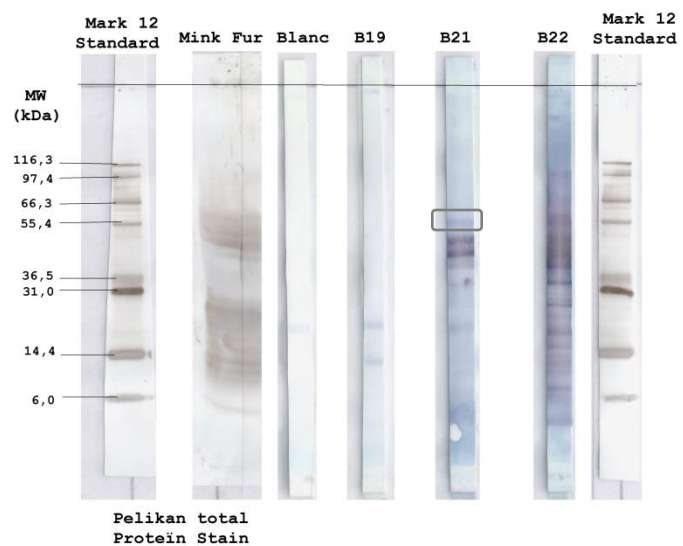
IgG4 Immunoblot after 2-12% Page on Mink Fur



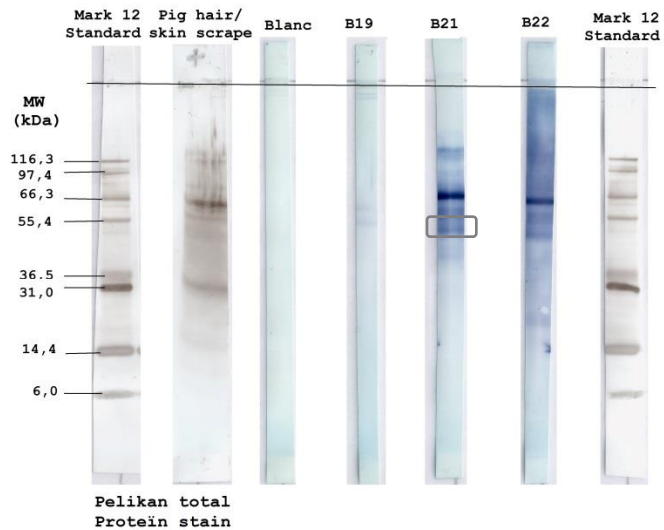
IgG4 Immunoblot after 2-12% PAGE on Bovine Serum Albumin



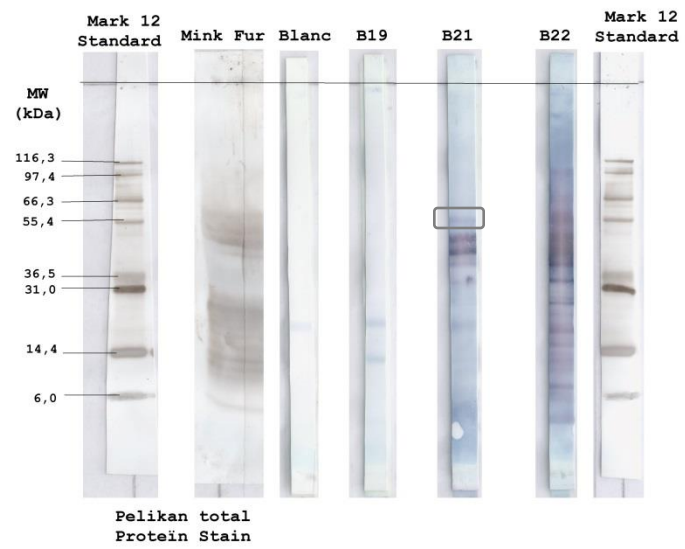
IgG4 Immunoblot after 2-12% Page on Mink Fur



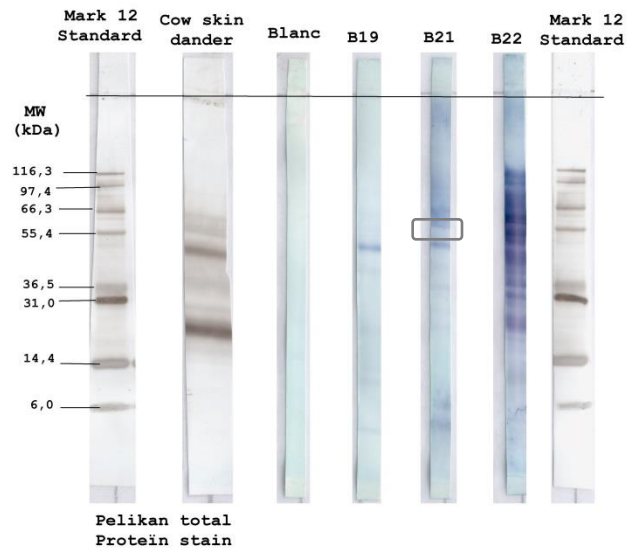
IgG4 Immunoblot after 2-12% PAGE on Pig hair/skin scrape



IgG4 Immunoblot after 2-12% Page on Mink Fur



IgG4 Immunoblot after 2-12% PAGE on Cow skin dander



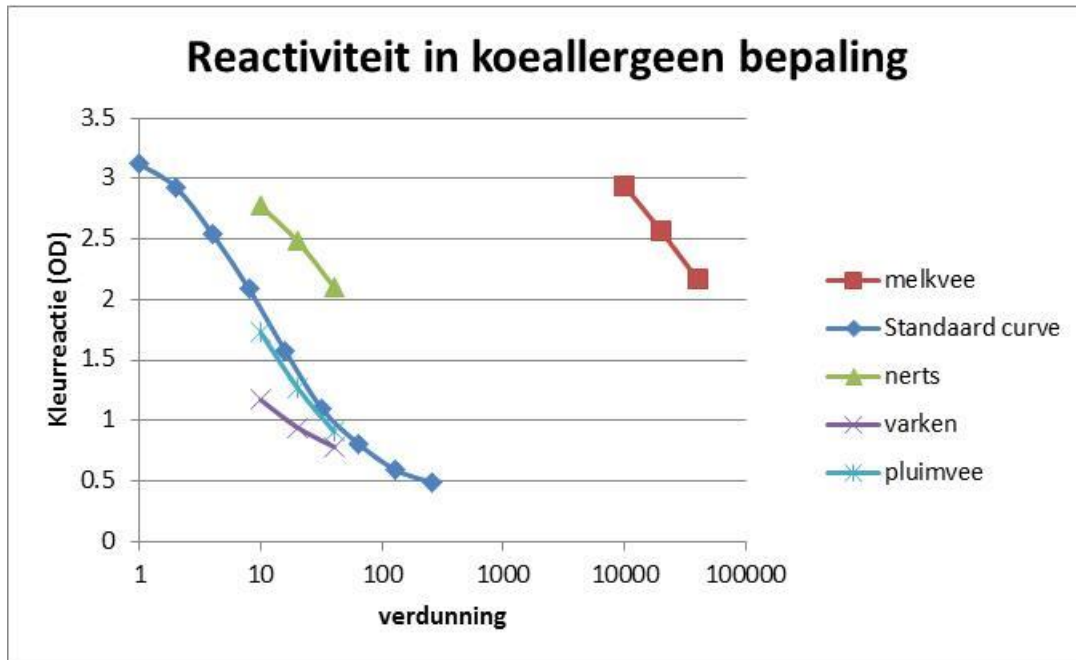
Bijlage 2: Overzicht van concentraties luchtverontreinigende stoffen per meetlocatie

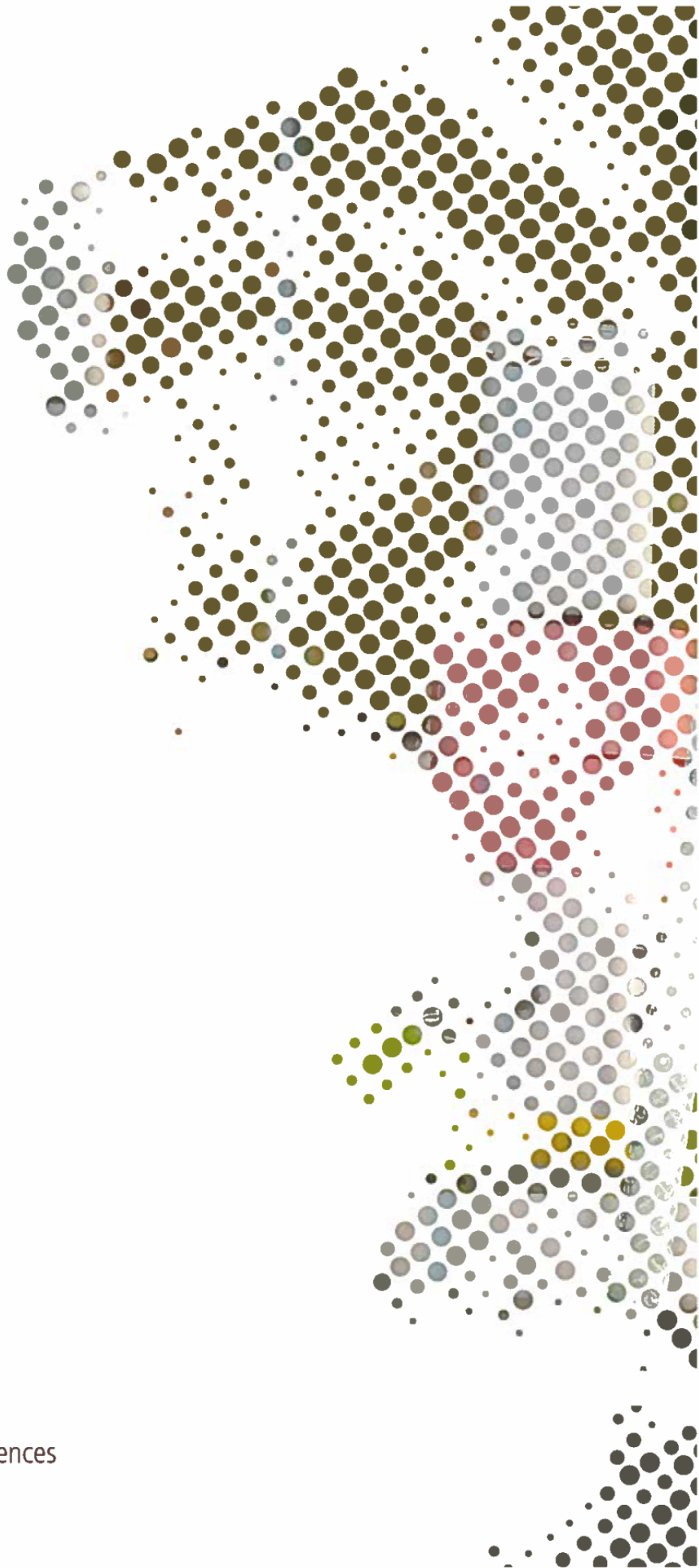
	Locatie	Meetlocaties woningen					
		N	P25	Gem	Std	Mediaan	P75
PM10 (ug/m3)	NO buiten dorp	10	13.0	14.4	2.9	15.0	16.3
	ZW buiten dorp	9	11.3	15.6	7.1	13.6	15.9
	dorp 1	10	12.2	14.9	3.1	14.9	16.1
	dorp 2	10	13.4	15.6	3.6	15.5	16.8
	vgo	115	14.3	18.0	4.3	19.3	21.2
Endotoxine (EU/m3)	NO buiten dorp	10	0.21	0.27	0.15	0.23	0.27
	ZW buiten dorp	9	0.19	0.21	0.09	0.21	0.25
	dorp 1	10	0.19	0.28	0.13	0.25	0.29
	dorp 2	10	0.20	0.29	0.16	0.25	0.31
	vgo	115	0.19	0.29	0.18	0.25	0.35
Koe-allergeen (pg/m3)	NO buiten dorp	10	45	73	36	56	95
	ZW buiten dorp	9	56	69	27	58	75
	dorp 1	10	127	197	107	170	283
	dorp 2	10	104	172	97	135	244
	vgo	76	76	144	97	120	189

		Meetlocaties veehouderijen					
Locatie		N	P25	Gem	Std	Mediaan	P75
PM10 (ug/m3)	melkvee						
	binnen	3	22.9	28.9	6.8	27.6	36.3
	nerts	10	12.6	15.6	3.7	16.8	17.6
	nerts binnen	10	15.1	18.2	3.6	18.5	21.9
	pluimvee	4	14.1	26.5	16.9	21.6	39.0
Endotoxine (EU/m3)	varkens	2	16.1	16.2	0.1	16.2	16.2
	melkvee						
	binnen	3	0.99	1.24	0.2	1.26	1.46
	nerts	10	0.23	0.34	0.2	0.32	0.34
	nerts binnen	10	0.32	0.75	0.6	0.57	0.83
Koe-allergeen (pg/m3)	pluimvee	4	0.45	1.57	2.0	0.66	2.68
	varkens	2	0.22	0.25	0.0	0.25	0.28
	melkvee						
	binnen	3	24802	35739	17187	26866	55550
	nerts	10	118	174	103	147	256
Koe-allergeen (pg/m3)	nerts binnen	10	126	168	62	149	215
	pluimvee	4	83	103	31	101	123
	varkens	2	80	104	35	104	129

Bijlage 3 Reactiviteit van stofmonsters uit stallen van de diverse veehouderijen in de koe-allergeen bepaling.

Nerststof vertoont meer reactiviteit dan varkens- en pluimvee stof in de bepaling, echter de reactiviteit is circa een factor 1000x lager dan de reactiviteit van stof uit een melkveestal. Het is dus niet aannemelijk dat nerstmateriaal de uitkomsten van de koe-allergeen bepalingen zullen beïnvloeden..





Universiteit Utrecht

Institute for Risk Assessment Sciences

www.iras.uu.nl