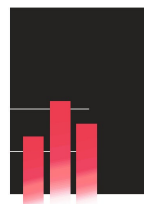


Consultancy & Services



IndusTox

Endotoxine

**Reactie op het
conceptadvies van de
Gezondheidsraad voor een
gezondheidskundige
grenswaarde op de werkplek**

IndusTox Consult is een adviesbureau dat werkzaam is op het terrein van de arbeidshygiëne, milieuhygiëne en toxicologie.

Diensten van IndusTox zijn:

- inventarisatie van toxische stoffen in bedrijven
- opstellen van programma's met frequentie en soort metingen voor bewaking van blootstellen aan toxische stoffen
- uitvoering van monitoringsprogramma's
- haalbaarheidsstudies van biologische monitoring in specifieke situaties
- opstellen van bedrijfsnormen
- beoordelen van de toxiciteit van stoffen en producten
- analyse van gezondheidsrisico's. Vaststellen van omvang van risico's
- statistische bewerking van meetgegevens
- Ontwikkeling van branchespecifieke toetsmethoden voor de beroepsblootstelling.
- Ontwerp van een stofarme productiewijze.
- Beoordeling van de beroepsblootstelling in het verband met beroepsziekten.

IndusTox heeft geregistreerde arbeidshygiënist (SKO) en geregistreerde toxicologen (NVT) in dienst.

IndusTox Consult is gevestigd in het Universitair Bedrijven Centrum Nijmegen,

Toernooiveld 100, 6525 EC NIJMEGEN

Tel: 024-3528842, fax: 024-3540090,

E-mail: info@industox.nl

Internet: www.industox.nl

Opdrachtgevers: Productschap Akkerbouw (PA),
Productschap Diervoeder (PDV),
Productschap Tuinbouw (PT)
Productschap voor Vee, Vlees en Eieren (PVE)
Vereniging Afvalbedrijven (VA)
Koninklijke vereniging voor afval- en reigingsmanagement (NVRD)

Contactpersonen: de heer C. Lommers en mevrouw T. Rens, PA
de heer E. Schokker (VA)
mevrouw C. Waasdorp (NVRD)

Plaats, datum: Nijmegen, 15 mei 2009
Opsteller: F.J. Jongeneelen
Projectnr.: IT-2009.016



Interne controle: J.G.M. van Rooij



Inhoud

1. INLEIDING	4
DOEL ONDERZOEK.....	4
2. UITVOERING ONDERZOEK.....	4
3. KORTE INHOUD ADVIESRAPPORT VAN GEZONDHEIDSRAAD	5
4. ONJUISTHEDEN IN CONCEPTRAPPORT	6
5. COMMENTAAR.....	7
1. ZEER BELANGRIJKE STUDIES GEMIST	7
2. FEV1-VERLAGING WORDT NIET UITSLUITEND VEROORZAAKT DOOR ENDOTOXINE.....	7
3. ONDERWAARDERING VAN DE DOSIS-RESPONS RELATIE VAN DE STUDIE VAN KENNEDY ET AL (1987).....	7
4. INCONSISTENTIE: DREMPEL VAN KORTE TERMIJN EFFECT IS LAGER DAN DIE VAN LANGE TERMIJN.....	8
5. JUISTHEID VAN DE GEEN-EFFECT DREMPEL VAN DE STUDIE VAN CASTELLAN	8
6. PRESTATIEKENMERKEN VAN MEETMETHODE NEN-EN 14031 SCHIETEN TEKORT	9
7. OMREKENFACTOR OUDE VERSUS NIEUWE MEETMETHODE ENDOTOXINE.	10
CONCLUSIES.....	12
REFERENTIES.....	13

1. Inleiding

De commissie Gezondheid Beroepsmatige Blootstelling aan Stoffen (GBBS) van de Gezondheidsraad heeft recentelijk een advies opgesteld voor een gezondheidkundige grenswaarde voor endotoxine op de werkplek¹. Het rapport is een concept-advies. Er wordt een grenswaarde voor endotoxine in de werkatmosfeer geadviseerd van 90 en 135 EU/m³ bij gebruik van de oude, respectievelijk nieuwe meetmethode. Het is een conceptadvies, waarop tot 1 juni gereageerd kan worden. Endotoxine is een bacterieel afbraakproduct en komt voor in bioaerosol. In vele agrarische sectoren is er blootstelling aan bioaerosol en endotoxine mogelijk.

De agrarische productschappen, zijnde:

- het Productschap Akkerbouw (PA) ,
- het Productschap Diervoeder (PDV) ,
- het Productschap Tuinbouw (PT),
- het Productschap voor Vee, Vlees en Eieren (PVVE)

én

de Vereniging Afvalbedrijven

hebben behoefte aan ondersteuning bij het beoordelen van de kwaliteit en degelijkheid van het advies van de commissie GBBS.

Doel onderzoek

Inhoudelijke beoordeling van het conceptadvies van de Gezondheidsraad voor een grenswaarde voor endotoxine.

2. Uitvoering onderzoek

Dit onderzoek is een bureaustudie waarbij het concept-adviesrapport van de GBBS is bestudeerd. Het concept-adviesrapport is onder de loep genomen en kritisch becommentarieerd met verwijzingen naar relevante literatuur. De uitvoering is verricht door dr. ir F.J. Jongeneelen, senior consultant arbeidstoxicologie.

¹ Gezondheidsraad. Dutch Expert Committee on Occupational Standards (DECOS). Health-based recommended occupational exposure limit for endotoxins. Draft-report 02-03-2009

3. Korte inhoud adviesrapport van Gezondheidsraad

De Commissie Gezondheid Beroepsmatige Blootstelling aan Stoffen (GBBS) presenteert een uitgebreid dossier met gezondheidkundige gegevens in relatie tot blootstelling aan endotoxine. Het adviesrapport laat zien dat het ademhalingsstelsel het belangrijkste orgaan is dat schade ondervindt van blootstelling aan endotoxine.

De commissie GBBS selecteerde de volgende studies voor het afleiden van een advieswaarde:

- een studie waarin gezonde vrijwilligers 6 uur werden blootgesteld aan katoenstof met endotoxine en waarbij effecten op de longfunctie werden gemeten (Castellan *et al.* 1987),
- een cross-sectionele studie naar chronische effecten op de longfunctie van werknemers die werden blootgesteld aan stof van mengvoeder (Smid *et al.* 1992),
- een 5 jaar follow-up studie in de mengvoederindustrie naar chronische effecten op de longfunctie van werknemers (Post *et al.* 1998).

De drempel voor nadelige effecten op de luchtwegen van personen die 6 uur werden blootgesteld, werd vastgesteld bij blootstelling aan katoenstof met een concentratie endotoxine van 90 EU/m³. De drempel van effecten op de luchtwegen als gevolg van lange termijn blootstelling aan endotoxine in katoenstof en veevoerstof ligt hoger. Op basis hiervan adviseert de commissie GBBS een gezondheidkundige grenswaarde voor endotoxine van 90 EU/m³, als 8-uurs tijd gewogen gemiddelde.

Omdat de commissie GBBS schat dat de meettechniek in de loop van de tijd een factor 1,5 - 2,0 gevoeliger is geworden, wordt bij gebruik van de hedendaagse meetmethode, een grenswaarde van 135 EU/m³ geadviseerd.

4. Onjuistheden in conceptrapport

Blz.	Regel	Opmerking
5	2-4	De zinsnede: <i>"Er bestaan nog geen algemeen geaccepteerde standaarden voor de luchtbemonsterings- en extractieprocedures"</i> is onjuist. Vanaf februari 2003 geldt normblad NEN-EN 14031: Workplace atmospheres - Determination of airborne endotoxine. Dit punt komt terug op pg 11, regel 11-12.
7,11, 12, 47	divers	Het rapport spreekt consequent van een concept NEN meetmethode. Dit is onjuist. In 2000 is de ontwerp methode EN 14031 gepubliceerd, en in 2003 is de methode door de CEN in Europees verband goedgekeurd en vastgesteld. In Nederland is daarom de meetmethode NEN-EN 14031 vanaf februari 2003 geldig.
6	20	De referentie moet waarschijnlijk Smid et al zijn i.p.v. Kennedy et al Of de mengvoederindustrie = katoenindustrie.
5	11-17	De volgende 3 omschrijvingen zijn opgenomen: <i>"De commissie beveelt een gezondheidkundige advieswaarde voor beroepsmatige blootstelling aan endotoxines aan van 90 EU/m³, gemiddeld over een acht urige werkdag (tgg 8 uur). Indien gebruik wordt gemaakt van de meest recente (concept) NEN-blootstellingsmeetmethode adviseert de commissie een gezondheidkundige advieswaarde voor beroepsmatige blootstelling aan endotoxines van 135 EU/m³."</i> <i>"The recent LAL-assay is approximately a factor of 1.5-2 more sensitive for measuring endotoxin exposure than the older versions"</i>
2, 47	1-2 14-19	<i>"Nowadays, kinetic assays are being applied, instead of older endpoint versions of the LAL-assay. These older assays have probably underestimated exposure levels to some extent. Although limited data is available, the effect of these changes in assay are estimated a factor 1.5-2."</i> Deze 3 beschrijvingen zijn tegenstrijdig. Geldt de factor 1,5 - 2,0 voor de hele meetprocedure (= sampling, opwerking en analyse) of geldt deze factor slechts voor het type LAL-test dat gebruikt wordt?
12	2	De 4 referenties genoemd in deze regel (95, 96,112,113) zijn onjuist.

5. Commentaar

1. Zeer belangrijke studies gemist

Duitse onderzoekers hebben onderzoek gedaan naar de dosis-respons relatie van endotoxine bij katoenwerkers (Latza et al, 2004 en Oldenburg et al, 2006). In deze dwars-doorsnede studies werd zowel de blootstelling aan endotoxine gemeten als effecten op de luchtwegen bij 150 katoenwerkers. Statistisch significante effecten werden gevonden bij de groep werknemers met blootstelling boven de 450 EU/m³. Bij de groep met een blootstelling tussen 100 - 450 EU/m³ was dit niet het geval. Deze studies zijn niet opgenomen in het adviesrapport.

Als deze studies meegewogen worden in de evaluatie, zal de dosis-respons relatie van lange termijn blootstelling aan endotoxine verschuiven.

2. FEV1-verlaging wordt niet uitsluitend veroorzaakt door endotoxine

Door de commissie GBBS zijn key-studies geselecteerd waarbij er sprake was van blootstelling aan stof met daarin endotoxine. Het gaat om studies met blootstelling aan katoenstof en aan diervoederstof. De daling van FEV1 werd in deze studies als effectmaat gebruikt. Bij het vaststellen van de dosis-respons relatie is het effect echter voor 100% toegedicht aan endotoxine. Het is echter bekend dat inhaleerbaar stof de longfunctie nadelig beïnvloed en leidt tot een daling van de FEV1. Ook is bekend dat organisch stof vaak bestanddelen als bacteriën, schimmels, mycotoxinen, glucanen en allergenen bevat die de longfunctie eveneens nadelig beïnvloeden. De vraag is nu welk agens de oorzaak is van de daling van FEV1. Is het een algemene reactie op het inademen van stof, is het een reactie op het inademen van andere componenten dan endotoxine, of is het een effect van uitsluitend het aandeel endotoxine in het stof? Als we uitgaan van het feit dat zowel de stof-matrix als het endotoxine beide een negatief effect hebben op de longfunctie, zal de oorzaak multifactorieel zijn, waardoor het effect van endotoxine overschat wordt.

Organisch stof is stof met een complexe, vaak onbekende samenstelling. Eén van de componenten is endotoxine. Er zijn vele andere componenten in de matrix van organisch stof die van invloed zijn op de longfunctie. Er is sprake van een overschatting van het gezondheidseffect van endotoxine als het gezondheidseffect bij inademing van organisch stof voor 100% wordt toegerekend aan endotoxine. Er is een correctie nodig voor de mate waarin endotoxine verantwoordelijk is voor het effect.

3. Onderwaardering van de dosis-respons relatie van de studie van Kennedy et al (1987)

Op blz. 37 en 38 is onder de kop 'long term toxicity' het volgende vermeld:
"A quick scan of the amount of endotoxins per g dust in the air revealed remarkable differences: In the Kennedy et al. study (origin of endotoxin is cotton) the ratio of ng endotoxin per µg dust is much higher than in the study of Smid et al. (origin of endotoxin is grain). Endotoxin levels covaried with dust levels in both studies. Therefore, it is assumed that (some specific constituents of) (grain-) dust contributed to the steeper decline in FEV₁ in subject exposed in the studies of Post et al. and Smid et al. and that the most accurate dose-response relationship between endotoxin exposure and FEV₁ changes is revealed by Kennedy et al."

Dat houdt in dat de studie van Kennedy et al. gezien wordt als studie met de meest nauwkeurige dosis-repons relatie van endotoxine bij lange termijn blootstelling. Toch worden de studies van Smid et al. en Post et al. in de “Quantative hazard assessment” (na regel 16, pg 46) op een prominente wijze aangehaald. Dat is inconsequent. De gegevens van de studie van Kennedy et al zouden een zwaardere wegingsfactor moeten krijgen.

4. Inconsistentie: drempel van korte termijn effect is lager dan die van lange termijn.

De commissie GBBS stelt vast dat de geen-effect drempel bij kortdurende blootstelling van 6 uur lager is dan bij lange-termijn blootstelling van dagelijks herhaalde blootstelling. Dat is strijdig met de kennis over dosis-tijd-respons relaties. Immers, een effect op de longfunctie over 6 uur blootstelling zal naar verwachting sterker worden bij dagelijks herhaalde blootstelling. Dit vloeit voort uit de regel van Haber, die aangeeft dat de effect-respons afhankelijk is van het product van concentratie en blootstellingduur.

Voor endotoxine is nu vastgesteld dat de NOAEL van kortdurende blootstelling lager is dan die van langdurige blootstelling. Hoe kan dit? Wat is de verklaring? Alleen als het gehanteerde effect na kortdurende blootstelling (= Δ FEV1 over de shift) een reversibel effect is, is dit mogelijk. Maar dan is de geen-effect drempel van korte termijn blootstelling niet juist gekozen.

Er is een inconsistentie in de gegevens waarmee de geen-effect drempel van endotoxine is vastgesteld. Dat vergroot de onzekerheid van de beoordeling. Het is nodig de inconsistentie te adresseren.

5. Juistheid van de geen-effect drempel van de studie van Castellan

De belangrijkste studie met informatie over de relatie tussen de blootstelling aan endotoxine en gezondheidseffecten is de studie van Castellan uit 1987. In deze studie werd bij vrijwilligers een verlaging van de FEV1 over de 6 uur durende blootstellingperiode door inademing van katoenstof gemeten. Inhaleerbaar stof en endotoxine werden gemeten als blootstellingsindicatoren. Aan de hand van relatie tussen de concentratie endotoxine en de Δ FEV1 over de shift werd de drempel van korte-termijn effecten afgeleid (= 9 ng/m³).

Echter, het is de vraag hoe juist de metingen van endotoxine in de studie van Castellan et al zijn geweest. Uit later uitgevoerde ringstudies is gebleken dat de meting van endotoxine zeer gevoelig is voor verstoring. Door Chun zijn in 1995 en in 1998 twee opeenvolgende ringstudies gecoördineerd gericht op het meten van endotoxine in katoenstof. Hierbij waren 13 labs betrokken waren; De ringstudie van 1995 liet zien dat de verschillen tussen labs erg groot waren: als de outliers weggelaten worden was het verschil tussen labs een factor ($10^{1,15} =$) 14. In de tweede ronde van 1998 is dit teruggebracht tot ongeveer ($10^{0,77} =$) 6, na het invoeren van exact dezelfde extractiemethode en dezelfde LAL-test. De conclusie was dat het niet mogelijk bleek dezelfde resultaten in verschillende labs te bereiken (Chun et al, 2006). De vraag is nu hoe juist de metingen van endotoxine in de studie van Castellan et al zijn geweest. Immers de metingen stammen van voor 1987 en er is gewerkt met een oudere assay, in een periode dat er nog nauwelijks kennis was van de

meetproblemen. Gegevens om de kwaliteit van de metingen te beoordelen ontbreken. Als we veronderstellen dat het inter-lab verschil in de periode voor 1987 gelijk is aan dat van 1995, is het aannemelijk dat de door Castellan gerapporteerde concentratie tot een factor $\pm (\sqrt{14} \approx) 3,75$ kan afwijken van de gemiddelde waarde van een serie van labs.

Een 20 jaar oude studie gebruiken als een key-studie voor het afleiden van een grenswaarde, uitgevoerd in een periode dat meettechnieken voor endotoxine per laboratorium erg verschillende resultaten konden opleveren en er geen kwaliteitscontrole/GLP ingevoerd was, is eerder een gok dan een wetenschappelijk onderbouwd advies.

6. Prestatiekenmerken van meetmethode NEN-EN 14031 schieten tekort

De meting van endotoxine wordt uitgevoerd door inhaleerbaar stof te monstereën, het stoffilter te extraheren en de hoeveelheid endotoxine in het extract te meten met een biologische assay (LAL-test). Door de vele methodische studies van de meting van endotoxine in de werkplekatmosfeer is het inmiddels overduidelijk geworden dat deze test extreem gevoelig is voor minimale variaties in de uitvoering van de monsternamen, de extractie en de analyse.

In de vroege periode van methodeontwikkeling (periode 1980-1990) gebruikte elke onderzoeker zijn eigen variant van dit voorschrift. Als snel bleek dat dit kon leiden tot grote verschillen in meetresultaten. Bovendien bleek de assay extreem gevoelig voor kleine variaties in de uitvoering van de meting. Douwes et al (1995) was een van de eerste onderzoekers die over de verschillen door variaties in de uitvoering rapporteerde. Hij liet zien dat resultaten van een meting tot een factor 17 konden verschillen.

Ringstudies laten zien dat de reproduceerbaarheid binnen één laboratorium goed is, maar bevestigden dat er aanzienlijke verschillen mogelijk zijn tussen laboratoria (tot een factor 14, zie Chun et al. 2006; Reynolds et al 2002).

Om tot standaardisatie te komen is in CEN-verband een normblad voor de meting van endotoxine in de werkatmosfeer ontwikkeld. In 2000 werd het ontwerp-normblad EN 14031 voor de meting van endotoxine in de werkatmosfeer vastgesteld. In februari 2003 is het normblad "NEN-EN 14031 - Meting van in de lucht aanwezige endotoxine" in Europees verband vastgesteld. Een grote beperking van het normblad NEN-EN 14031 is dat slechts globale voorschriften worden gegeven; er blijft aanzienlijke ruimte over voor kleine variaties in de uitvoering. Recente studies laten zien dat kleine variaties in uitvoering van de test - binnen de voorschriften van het normblad - een sterke invloed hebben op het resultaat (Spaan et al, 2007, 2008; Liebers et al, 2007). In deze studies werd vastgesteld dat vooral:

1. Wijze van opslag van monsters en/of extracten
2. Variaties in filter extractie vloeistof;
3. Aard van de vloeistof in de LAL-assay;
4. Fabrikant/leverancier van de LAL-assay.

een significant effect hebben op de resultaten. Ook variaties in procedures voor bewaren van monsters hebben invloed. In tabel 1 is het overzicht gegeven van het effect van variaties in de meetprocedure.

Een duidelijke illustratie van de meetproblematiek is dat in het Duitse voorschrift van de BGIA (meetmethode 9450: Endotoxin in Luft) water wordt gebruikt als extractieoplossing in plaats van 0,05% Tween zoals de commissie CGGS voorstelt.

Dit heeft tot gevolg dat een Duits lab gemiddeld een 4,2 * lagere waarde rapporteert dan een Nederlandse lab (Jongeneelen & v Osch, 2003).

De voormalige werkgroep meetmethoden van de SER heeft in 2006 de meetmethode voor endotoxine in de lucht beoordeeld en kwam tot het volgende conclusie (zie <http://www.ser.nl/nl/grenswaarden/endotoxinen.aspx>):

“Analyse en monsterneming (van endotoxine) zijn gevalideerd in het gewenste meetbereik. Echter, er zijn in ruime mate gegevens beschikbaar van ringstudies van endotoxinen waaruit duidelijk blijkt dat de reproduceerbaarheid van de meting van endotoxinen binnen een laboratorium voldoende is, maar de meetnauwkeurigheid te groot is door te grote systematische verschillen tussen laboratoria. Het huidige normblad NEN-EN 14031 en BIA-methode 9450 zijn onvoldoende gedetailleerd om de systematische verschillen tussen de laboratoria uit te bannen. Deze problemen zijn specifiek voor endotoxinen en worden veroorzaakt door het feit dat endotoxinen worden gemeten met een biologische meetmethode. De werkgroep MM is van oordeel dat de prestatiekenmerken van de bepaling (nog) onvoldoende zijn om meetresultaten van endotoxinen te kunnen toetsen tegen een grenswaarde.”

Dit betekent dat het absoluut noodzakelijk is dat er met gedetailleerde uitvoeringsvoorschriften gewerkt gaat worden en dat deze dwingend voorgeschreven moeten worden middels een aangevuld, vernieuwd CEN-normblad.

Voor het vergelijken van gemeten concentraties met de grenswaarde lijkt het bovendien noodzakelijk om een accreditatie-systeem in te voeren, gebaseerd op resultaten van round-robins. Dat houdt in dat die laboratoria die voldoen aan de kwaliteitseisen van periodieke inter-laboratorium testen, een accreditatie voor de meting van endotoxine ontvangen.

Inmiddels is de CEN (mei 2009) vanuit de Nederlandse NEN-normcommissie verzocht om het normblad EN 14031 te reviewen.

Tabel 1: Relatief effect van variaties in uitvoering van de meting van endotoxine in de lucht.

Aspect van endotoxine meting	Liebers et al (2007)	Spaan et al (2007)	Spaan et al (2008)
Soort filter	-	0,6 - 0,9	-
Opslag beladen filter 4°C versus -18 °C	1,5	0,8 - 1,0	-
Filter extractie Water versus Tween-oplossing	3,0	1,8 - 2,7	2,1 - 6,6
Tussentijds ontdooien extract	-	1,0	-
Assay vloeistof Water versus Tween-oplossing	-	-	0,7 - 4,8
Leverancier LAL test kit	2,7 – 5	-	-

Dit alles betekent dat zolang er nog geen nieuw, verder gedetailleerd Europees CEN meetvoorschrift is voor endotoxine, er geen betrouwbare referentie meetmethode is. Op dit moment kunnen de meetresultaten per laboratorium zeer aanzienlijk verschillen.

7. Omrekenfactor oude versus nieuwe meetmethode endotoxine.

In de loop van de tijd is de meetmethode voor endotoxine in de werkatmosfeer met kleine stapjes aangepast. De key-studies met gegevens over de relatie tussen de

Reactie op conceptrapport Gezondheidsraad endotoxine

blootstelling en gezondheidseffecten zijn van ongeveer 20 jaar geleden. Toen was de uitvoering anders dan nu. De commissie CGGS onderkent dat er systematische verschillen zijn in de meetmethode die in de loop der tijd zijn gebruikt en introduceert een omrekenfactor. De commissie komt tot de conclusie dat de moderne LAL-test een factor 1,5 - 2 gevoeliger is dan de oudere versies van de test. Welke de oudere versies van de test precies zijn, wordt in het midden gelaten.

Om hierin inzicht te krijgen, is een overzicht opgesteld (tabel 2) van details van de meetmethoden die gebruikt zijn in de 3 key-studies die na weging als belangrijkste studies zijn geselecteerd: Castellan et al (1987), Smid et al (1992) en Post et al (1998) (zie tabel 2). De studie van Castellan et al (1987) is de key-studie voor korte-termijn effecten. De studies van Smid et al (1992) en Post et al (1998) zijn de key-studies voor lange termijn effecten. Post et al gebruikte dezelfde meetmethode voor endotoxine als Smid et al. Daarnaast is de meetmethode, zoals aanbevolen door de commissie GBBS – Gezondheidsraad, in tabel 2 opgenomen.

Tabel 2: Vergelijking van uitvoering van metingen van endotoxine in de werkatmosfeer volgens advies Gezondheidsraad en van de key-studies in het adviesrapport GR.

Deel van de meetmethode	Aspect	Aanbeveling van commissie GBBS Gezondheidsraad (2009)	Meetmethode gebruikt in studie Castellan et al (1987)	Meetmethode gebruikt in studie Smid et al (1992) en Post et al (1998)
Monstername	Stoffractie	inhaleerbaar stof	Inhaleerbaar stof	inhaleerbaar stof
	Soort filter	glasvezel	PVC	Glasvezel
Extractie en opslag	Opslag filter	Uitsluitend bij -18 °C	Opslag van monsters in een koelkast bij +4 °C.	Opslag van monsters in een koelkast bij +4 °C.
	Extractie vloeistof	Extractie met pyrogeenvrij water met 0,05% Tween	Extractie met steriel en pyrogeenvrij water, zonder detergent	Extractie met steriel en pyrogeenvrij water, zonder detergent
	Opslag extract	Uitsluitend bij -18 °C	Geen	Geen
	Tussentijds ontdooien extract	Niet tussentijds ontdooien	Niet vermeld	Niet vermeld
Analyse	Materiaal labuistrusting	Niet vermeld	Plastic	Niet vermeld
	Analyse	Analyse in pyrogeenvrij water zonder Tween	Analyse in pyrogeenvrij water zonder Tween	Analyse in pyrogeenvrij water zonder Tween
	Type LAL-test en leverancier	Niet vermeld	Pyrostat test	Kabivrium test, eigen aanpassing

Tabel 2 laat zien dat er een belangrijk verschil zit in de extractiestap: in beide key-studies werd water als extractiemiddel gebruikt en de Gezondheidsraad adviseert nu een 0,05% Tween oplossing te gebruiken.

Wat is het gevolg van deze aanpassing? Het lab van Smid (= WUR, later IRAS – UU) heeft deze aanpassing in de periode '94 - '95 doorgevoerd. In plaats van met water

werd voortaan met 0,05% Tween geëxtraheerd. Douwes et al (1995) is nagegaan welke invloed dit had op de opbrengst. Zij stelden vast dat de opbrengst daardoor een factor 7 hoger werd (Douwes et al, 1995). Recentelijk is dit aspect opnieuw onderzocht door Spaan et al (2007, 2008). In de 2007 studie bleek de opbrengst door extractie met een 0,05% Tween oplossing t.o.v. water voor stof van een varkenshouderij een factor 1,8 hoger te zijn, en voor stof van een graszaadbedrijf 2,4 * hoger. Gemiddeld over 2 stofsoorten was dit een factor 2,1. In de 2008 studie van Spaan werd voor 5 stofsoorten het effect van Tween gerapporteerd:

voor stof van een composteringbedrijf	factor 2,1
voor stof van een graszaadbedrijf	factor 3,6
Voor stof van een varkensstal	factor 2,9
Voor stof van aardappelverwerking	factor 3,5
Voor stof van rioolslib	factor 6,6.

Gemiddeld over 5 stofsoorten was de opbrengst door extractie met de 0,05% Tween oplossing een factor 3,5 hoger.

De wijze van extraheren van het endotoxine uit het stof op de filters is de belangrijkste verandering van de 'oude' naar de 'nieuwe' methode. De vraag is nu welke de juiste omrekenfactor is. Gezien het feit dat de vergelijking van Douwes et al. is uitgevoerd in de periode toen de metingen van kritische studies werden gedaan, lijkt een factor 7 het meest betrouwbaar. Dit is veel groter dan de omrekenfactor van 1,5 die de commissie GBBS hanteert. Bovendien is gebleken dat de aard van het stof een zeer sterke invloed heeft op de omrekenfactor. Dat heeft tot gevolg dat de omrekening per stofsoort uitgevoerd zal moeten worden.

Conclusies

- Er is een relatie tussen de blootstelling aan endotoxine en nadelige effecten op de longfunctie, maar een kwantitatief verband kan (nog) niet vastgesteld worden door het ontbreken aan een betrouwbare referentie meetmethode voor endotoxine.
- Agrarisch of biologisch stof (= bioaerosol) is een matrix van stof met bekende en onbekende biologische componenten. Deze componenten hebben in meer of mindere mate een effect op de longfunctie. De samenstelling van bioaerosol is sterk heterogeen, dat wil zeggen dat het per bedrijfstak een geheel andere samenstelling heeft. Dit maakt dat het vaststellen van een grenswaarde voor alle soorten bioaerosol op basis van één enkelvoudig bestanddeel (= endotoxine) niet erg precies is.
- Handhaving van een grenswaarde voor endotoxine zal op meettechnische problemen stuiten omdat de prestatiekenmerken van de meetmethode onder het geldende NEN-EN meetvoorschrift (nog) onvoldoende zijn.
- De gepresenteerde gegevens over de gezondheidseffecten van endotoxine in bioaerosol geven echter alle aanleiding om de blootstelling aan bioaerosol op de werkvloer onder controle te brengen/houden. Preventiestrategieën om de blootstelling te verminderen zijn dringend nodig.

Referenties

1. Gezondheidsraad. Draft report HBROEL Endotoxins. DECOS, 2 maart 2009. Den Haag.
2. NEN-EN 14031. Workplace atmospheres - Determination of airborne endotoxine. NEN Delft Februari 2003.
3. BGIA. Methode 9450. Linsel, G.; Kolk, A. Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz. Messung von Gefahrstoffen. Ausgeber: ES-Verlag, Berlin
4. Castellan RM et al. Inhaled endotoxin and decrease of spirometric values. *New Engl J Med*, 317; 605-610, 1987.
5. Smid T, Heederik D, Houba R, Quanjer P H. Dust- and endotoxin-related respiratory effects in the animal feed industry. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146(6):1474-9.
6. Post W, Heederik D, Houba R. Decline in lung function related to exposure and selection processes among workers in the grain processing and animal feed industry. *Occup Environ Med* 1998; 55:349-55.
7. Kennedy S M, Christiani D C, Eisen E A et al. Cotton dust and endotoxin exposure response relationships in cotton textile workers. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135(1):194-21 200.
8. Oldenburg M, Latza U, Baur X. Exposure-response relationship between endotoxin exposure and lung function impairment in cotton textile workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2007 Apr;80(5):388-95.
9. Latza U, Oldenburg M, Baur X. Endotoxin exposure and respiratory symptoms in the cotton textile industry. *Arch Environ Health*. 2004 Oct;59(10):519-25.
10. Jongeneelen & v Osch A. Nauwkeurigheid van het meten van endotoxine volgens nieuw ontwerp-NEN voorschrift. *Tijdschr Toegepaste Arbowedenschap* 2003-01 (supplement) pp 32-33; Also available at www.industox.nl/procNVVA03endo.htm.
11. Chun DTW et al. 2nd Inter-lab study comparing endotoxin assay results from cotton dust. *Ann Agric Environ Med* (2002) 9; 49-53.
12. Chun DT, Bartlett K, Gordon T, Jacobs RR, Larsson BM, Larsson L, Lewis DM, Liesivuori J, Michel O, Milton DK, Rylander R, Thorne PS, White EM, Brown ME, Gunn VS, Würtz H. History and results of the two inter-laboratory round robin endotoxin assay studies on cotton dust. *Am J Ind Med*. 2006 Apr;49(4):301-6.
13. Jacobs RR & Chun D. Inter-laboratory analysis of endotoxin in cotton dust samples. *Am J Ind Med* 2004 46:333-337.
14. Spaan S, Doekes G, Heederik D, Thorne PS, Wouters IM. Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Jun;74(12):3804-11.
15. Spaan S, Heederik DJ, Thorne PS, Wouters IM. Optimization of airborne endotoxin exposure assessment: effects of filter type, transport conditions, extraction solutions, and storage of samples and extracts. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Oct;73(19):6134-43.
16. Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Linsel G, Goldscheid N, Düser M, Stubel H, Brüning T. Evaluation of quantification methods of occupational endotoxin exposure. *J Toxicol Environ Health A*. 2007 Nov;70(21):1798-805.
17. Douwes J., Versloot P., Hollander A., Heederik D., and Doekes G. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1763-1769.
18. Linsel G., Doering C., Duggal S., Hartung J., Koch A., Kottmair A., Lohmeyer M., Schierl R., Weist K., and Zucker B.-A. Ergebnisse eines ringversuches zur messung luftgetragener endotoxine. *VDI-Berichte* 2002:1656:329-339.
19. Reynolds S.J., Thorne P.S., Donham K.J., Croteau E.A., Kelly K.M., Lewis D., Whitmer M., Heederik D.J., Douwes J., Connaughton I., Koch S., Malmberg P., Larsson B.M., and Milton D.K. Comparison of endotoxin assays using agricultural dusts. *AIHA Journal* 2002:63:430-438.